

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
Spécialité : Microbiologie appliquée

THEME

Portage intestinal des Entérocoques chez le poulet de chair. Recherche des facteurs de virulences (Hémolysine, Gélatinase et la formation de biofilm *in vitro*). Résistance des isolats aux antibiotiques

Réalisé par : AOUINE YOUNES

KABAR RAMZI

TALBI CHANEZ

Devant le Jury composé de :

Présidente : M^{elle}. MEGUENNI N. Maitre de conférence A.

Examinatrice : M^{me}. AFIF CHAOUCHE T. Maitre de conférence A.

Promoteur : Mr. TITOUCHE Y. Maitre de conférence A.

Année universitaire : 2021/ 2022

Remerciements

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 guidés 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 gratitudes pour avoir dirigé ce mémoire. Nous le remercions 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, Sans oublier Dr Yatti qui nous a aidés et orientés aux abattoirs où on a fait les prélèvements

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 gratitudes et respects

Dédicace

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

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

A ma petite sœur adorable Lina et ma sœur Bouchra, et toute la famille surtout ma grand-mère et ma tante ainsi tout la famille BISKRI.

A tous mes amis spécialement mon binôme et mon amis proche Younes Aouine

Mes amis rencontrés durant cette période Rahim, Karim, Liza, Thinhinane, Naima, Sihem, Kahina, Chanez, Imene, Yasmine, Salim, Mouloud, Housseem, Sidali, Sofiane et tous mes amis de la résidence universitaire TAMDA 5.

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.

Ramzi

Dédicace

Je dédie ce travail tout d'abord à mes parents, ma mère et mon père, qui m'ont soutenu durant toute cette carrière d'étude.

Et à ma grande mère adorée qui m'a donné le courage de continuer et de ne rien lâcher, mes tantes et aussi mes sœurs et mon petit frère Hassane.

A tous mes amis spécialement mon binôme et mes amis proches Ramzi Kabare, Karim Amrouche et Lila Zerrouki.

Mes amis rencontrés durant cette période Melissa, Mourad, Houssam, Rahim, Thinhinane, Naima, Sihem, Kahina, Yasmine, Chanez, Samira.

Et à la mémoire de mon ami Souhaïbe qui nous a quittés, paix à son âme.

Younes

Dédicace

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

Ma très chère maman qui a été toujours là pour moi, qui est ma source de force et de courage pour affronter la vie, quoi que je fasse ou je dise, je ne saurer guère de la remercier comme il se doit.

Mon père qui sacrifie sa vie pour qu'on ne manque de rien et qui m'épaule pour que je puisse atteindre mes objectifs

Mes chers frères Said et Massy et ma petite sœur Lyna pour leur grand amour inconditionnel, soutien et surtout leurs encouragements, que dieu leur procure une bonne santé et une longue vie pleine de belles surprises.

Mes chères amies qui ont été toujours là pour me soutenir : Mélissa, Tina, Lydia, Louiza et Liza.

Mes adorables amis rencontrés durant la période de mon stage : Kahina, Thinhinane, Siham, Younes et Ramzi.

Chanez

Table de matières

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I : Généralités sur les entérocoques

1 Historique	4
2 Habitat	4
3 Classification	5
4 Caractéristiques bactériologiques.....	6
5 Epidémiologie des entérocoques	7
6 Pathogénicité des entérocoques.....	8
7 Rôles et applications des entérocoques	8
8 Propriétés biochimique des entérocoques et leur intérêt technologique	11

CHAPITRE II : Facteurs de virulences des *Enterococcus*

1 Risques liés aux entérocoques.....	14
2 Définition d'un facteur de virulence	14
3 Facteurs contribuent à la pathogénicité des entérocoques	15
4 La formation des biofilms	18
5 La formation de biofilm chez les entérocoques	20

CHAPITRE III : Résistance des *Enterococcus* aux antibiotiques

1 Définition	22
2 Principaux paramètres influencent sur l'activité d'un antibiotique.....	22
3 Notion de la résistance bactérienne aux antibiotiques	22
4 Critères de classification des antibiotiques	22
5 Classification et mode d'action des antibiotiques	23

6 Résistance des entérocoques aux antibiotiques	27
---	----

Partie expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

1 Matériel	35
Milieux de culture et réactifs.....	36
2 Collectes des prélèvements	36
3 Analyse microbiologique	37
4 Identification des isolats.....	38
5 Identification biochimique	39
6 Caractérisation phénotypique des souches isolés.....	40
7 Formation de biofilms <i>in vitro</i>	41
8 Antibiorésistance des souches isolées	42
9 Conservation des souches testés	42

CHAPITRE II : Résultats et discussion

Résultats	45
1 Prévalences des entérocoques chez le poulet de chair	45
2 Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques	45
3 phénotypes de multirésistance.....	47
4 Facteurs de virulences	48
Discussion	49
Conclusion.....	53
Références bibliographiques	54

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Image d'un <i>Enterococcus faecalis</i> par microscope électronique à balayage.	6
Figure 2 : image microscopique photonique montrant les souches productrices de la gélatinase.....	17
Figure 3 : Biofilm produit par une souche de <i>Enterococcus faecium</i> dans un système en microplaque. Image obtenue en microscopie confocale suite à une coloration du biofilm à l'aide de Film Tracer.....	19
Figure 4 : Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien.	20
Figure 5 : Inactivation des antibiotiques par des β -lactamases.	28
Figure 6 : mécanisme de résistance aux antibiotiques.....	29
Figure 7 : mécanismes de résistances aux quinolones	31
Figure 8 : Profil de résistance de la souche <i>Enterococcus spp</i> (E22-12).....	46
Figure 9 : Profil de résistance de la souche <i>Enterococcus spp</i> (E22-05).....	47
Figure 10 : Résultat de test de la gélatinase.	48
Figure 11 : Résultat du test de l'hémolyse (E22-39).	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : le matériel utilisé lors de la partie expérimentale	36
Tableau 2 : répartition des différents points d'abatage ainsi le nombre de prélèvements effectués dans le cadre de la réalisation de l'étude.	37
Tableau 3 : Classification de l'adhésion des <i>Staphylocoque spp.</i>	42
Tableau 4 : Liste des antibiotiques à testés.	43
Tableau 5 : Prévalence des souches d'entérocoques selon les abattoirs	45
Tableau 6 : Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques testés (n=60).	46
Tableau 7 : Phénotypes de résistance des souches d'entérocoques isolées.	47
Tableau 8 : Capacité des souches d' <i>Enterococcus</i> à former des biofilms (n=60).	49

Liste des abréviations

E : *Enterococcus*

SA : substance agrégation

ESP : Protéine de surface d'entérocoque

MEC : matrice extracellulaire

SI : système immunitaire

Ace : Adhésine du collagène d'*E. faecalis*

ATCC : Américain type culture collection

ELISA : Enzyme-linked immuno Assay

PLP : Protéines liant la pénicilline

CLSI : Clinical and laboratory standards institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine

KDA : kilo dalton

LPS : Lipopolysaccharide

CASFM : Comité française de microbiologie

PB : Paire de base

UFC : Unité formant colonie

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement de souches d'*Enterococcus spp.* Et leur caractérisation phénotypique. Pour cela, 185 prélèvements rectaux chez poulet de chair issus des différents abattoirs de la wilaya de Tizi-Ouzou ont été réalisés.

L'étude de la résistance des souches aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode de diffusion des disques sur la gélose Mueller Hinton. La formation de biofilm des isolats est testée par la méthode de plaque de culture de tissus. Les résultats obtenus montrent une fréquence d'isolement d'*Enterococcus spp* de l'ordre de 32,43%. De fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline (86.66%) et de l'érythromycine (53.33%) ont été observées. Par ailleurs, des résistances relativement faibles sont enregistrées à l'encontre de la pénicilline, l'ampicilline, la ciprofloxacine et de l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole, avec des taux de 33.33%, 31.66%, 23.33%, 20%, respectivement. Une seule souche est résistante vis-à-vis les glycopeptides (téicoplanine).

Pour les facteurs de virulences, huit (13.33%) souches avaient la capacité de dégrader la gélatinase et uniquement 3 (5%) souches étaient hémolytiques. Tandis que, 54 (90%) souches sont capable de former des biofilms *in vitro*.

La présente étude montre bien le risque sanitaire Associé à la présence d'*Enterococcus* chez les animaux de rente. Pour cela, une politique basée sur l'application des règles de biosécurité et les bonnes pratiques d'hygiène, tout le long de la chaîne de production, est nécessaire.

Mots clés : *Enterococcus*, Antibiorésistance, facteurs de virulences, hémolysine.

Partie
bibliographique

Introduction générale

Introduction

Les entérocoques sont des bactéries lactiques utilisés dans la transformation des aliments, des bactéries anaérobies facultatifs, immobiles, dépourvus de capsule et à Gram positif, ils ont une grande capacité à croître et à se développer dans des conditions environnementales hostiles (faibles et hautes températures, pH extrêmes et salinité) (FRANZ *et al*, 2002).

Ils se retrouvent principalement dans l'intestin humain et les animaux à sang chaud (COURVAILIN, 1994 ; SPARO *et al*, 2011). Les plus étudiés sont les animaux d'élevages car ils sont considérés comme source de contamination importante dans l'alimentation humaine. En effet, les animaux d'élevages sont des sources importantes de bactéries contenant des gènes de résistance aux antimicrobiens. Bien que l'utilisation des antimicrobiens dans l'aquaculture et l'élevage a été réduite dans plusieurs pays, ces composés sont encore couramment appliqués en production animale (RODRIGUES *et al*, 2020). De nombreux antimicrobiens administrés aux animaux sont identiques ou apparentés à ceux utilisés en médecine humaine (TOLLEFSON et KARP, 2004), conduisant ainsi à la sélection et à l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR), notamment aux carbapénèmes, aux céphalosporines à spectre étendu, à la colistine, aux fluoroquinolones, à la méticilline et aux glycopeptides (KOUTSOUMANIS *et al*, 2021).

Au cours des trois dernières décennies, les entérocoques sont devenus les pathogènes humains nosocomiaux les plus courants (SELLECK *et al*, 2019). Ils sont apparus comme un agent pathogène nosocomial important après les staphylocoques qui sont la principale cause d'infections nosocomiales dans le monde (SAKKA *et al*, 2008). Aujourd'hui, les infections à entérocoques posent de sérieux problèmes de santé publique liés à la capacité intrinsèque de ces bactéries à tolérer et à résister aux différents antibiotiques, en particulier les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). De plus, les entérocoques peuvent développer rapidement une résistance aux antimicrobiens de dernier recours utilisés pour traiter la résistance aux glycopeptides et à plusieurs médicaments, tels que la quinupristine-dalfopristine, le linézolide, la daptomycine et la tigécycline (AHMED et BAPTISTE, 2018). De plus, les entérocoques sont capables de transférer des déterminants de résistance soit à leur propre espèce, soit à d'autres pathogènes (BORTOLAIA et GUARDABASSI, 2015), soit à des bactéries non pathogènes, dans le tractus humain ou animal, dans l'environnement, voire dans les aliments, contribuant à la diffusion et la persistance de la résistance aux antimicrobiens (PESAVENTO *et al*, 2014).

Introduction

Outre la résistance aux antibiotiques, les entérocoques sont capables de produire des facteurs de virulence potentiels. Ces derniers peuvent renforcer leur pathogénicité en permettant la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte, la translocation à travers les cellules épithéliales et l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte. Ces facteurs de virulence putatifs tels que les substances d'agrégation, les adhésines, l'hémolysine, la hyaluronidase et la gélatinase, jouent un rôle important dans l'établissement de l'infection (RAMOS *et al*, 2020).

Le présent travail a pour objectifs, l'isolement des entérocoques au niveau du portage intestinal chez le poulet de chair et la caractérisation phénotypique des souches isolées, via la mise en évidence de quelques facteurs de virulence, tels que l'hémolyse, la gélatinase, la formation de biofilm *in vitro* et la résistance aux antibiotiques.

Chapitre I

Généralités sur les

Entérocoques

1 Historique

Après Therncelin, le premier à identifier les entérocoques en (1899), également le premier à utiliser le terme diplocoques, viennent ANDREWS et ORDER, qui l'on décrit en 1906 sous le nom de *Streptococcus faecalis*, pour désigner des bactéries potentiellement pathogènes des patients souffrant d'endocardites et des bactéries ayant la capacité de former des courtes chaînes. En 1933, LANCEFIELD décrit les sérogroupes des streptocoques et classe les entérocoques comme des Streptocoques du groupe sérologique D, avec certains *Streptococcus* comme : *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus* et *Streptococcus suis* (GOURNIER *et al*, 1994 ; KLEIN, 2003). En 1937, SHERMAN a classé les genres de *Streptococcus* en quatre sous-groupes : les streptocoques fécaux ou entérocoques, les streptocoques lactiques, le groupe des viridans et les streptocoques pyogènes. En 1970, KALINA suggère que *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium* devraient être transférés au genre *Enterococcus*. Ce n'est qu'avec l'avènement de la biologie moléculaire et de nouvelles techniques, telles que la détermination du pourcentage G+C, le séquençage de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN, que SCHLEIFER reclasse les bactéries *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium* en *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, respectivement (AGUILAR *et al*, 2012).

2 Habitat

Les entérocoques ont des propriétés intrinsèques qui leur permettent de se répandre 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), qui sont les hôtes originaux des *Enterococcus* (ZHONG *et al*, 2017). Les entérocoques sont des germes ubiquistes, capables de survivre sous une gamme de facteurs de stress environnementaux et colonisent une large gamme de niches écologiques (FISCHER et PHILLIPS, 2009). L'estimation de l'horloge moléculaire, ainsi que l'analyse de leur distribution environnementale, la diversité phénotypique et la concordance avec les archives fossiles de l'hôte, situent les origines des entérocoques à l'époque de la territorialisation animale entre 425 et 500 millions d'années (LEBRETON *et al*, 2017).

L'intestin de l'Homme est peuplé d'une concentration d'entérocoques de l'ordre de 10^5 à 10^7 UFC/g (DRASAR et HILL, 1974). Parmi les espèces les plus isolées dans les fèces, on trouve *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* (MURRAY, 1990 ; LECLERC *et al*, 1996).

Dans la plupart des contenus intestinaux d'animaux, on trouve *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. hirae* (DEVRIES *et al*, 1987), et dans les sources environnementales, il a été démontré que *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. raffinosus* et *E. gallinarum* sont les espèces les plus dominantes (PINTO *et al*, 1999).

Dans les produits alimentaires, principalement dans les produits laitiers, les espèces d'*Enterococcus* les plus dominantes sont *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* (GIRAFFA, 2003).

Ainsi, dans les produits carnés, on trouve les espèces suivantes : *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. gilivus* (PIMENTA *et al*, 2007)

Dans les échantillons végétaux d'ensilage d'herbe, *E. munditii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* sont les espèces les plus isolées (LECLERC *et al*, 1996). Dans les olives vertes fraîches et fermentées, c'est *E. faecium* et *E. faecalis* qui prédominent (FERNANDEZ, 1983).

3 Classification

Le genre *Enterococcus* est placé selon la classification phylogénétique de Bergy en 1994 comme suit :

- Domaine : *Bacteria* ou *Eubactéria*
- Phylum : firmicutes
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : lactobacillales
- Famille : *Enterococcaceae*

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

Le genre *Enterococcus* appartient au groupe des bactéries lactiques (LAB) et représente le troisième des plus grands genres des bactéries lactiques après *Lactobacillus* et *Streptococcus* (FRANZ *et al*, 2011 ; HANACHI, 2018).

4 Caractéristiques bactériologiques

4.1 Caractères morphologiques

Les Entérocoques sont des Cocci à Gram positif, qui se présentent sous forme de cellules ovoïdes qui peuvent être isolés, en diplocoque ou encore en chainettes (SCHLEIFER *et al*, 1984). Généralement ils forment des colonies de couleur blanche et rarement jaune comme, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* (HIGASHIDE *et al*, 2005). Les *Enterococcus* ont une taille comprise entre 0,6 et 2 μm , ils sont généralement immobiles, rarement capsulés et non sporulés (HIGASHIDE *et al*, 2005).



Figure 1 : Image d'un *Enterococcus faecalis* par microscope électronique à balayage (x4000) (PORTENIER *et al*, 2003).

4.2 Caractères cultureux

Le diagnostic des entérocoques se fait par culture ou par sérodiagnostic (CARIP *et al*, 2015), Ce dernier peut être séparé des Streptocoques et des Pneumocoques par la modification des milieux de cultures. Ces bactéries sont aptes à survivre dans des conditions hostiles de 6,5 % de Na Cl, dans du lait renfermant 0,1 % de bleu de méthylène, dans des concentrations en sels biliaires de 40 %, ils sont également capables d'hydrolyser l'esculine en "esculétine" (noircissement-caractéristique du milieu bile esculine) et tolèrent une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6 (AGUILAR-GALVEZ, 2012). *E. faecalis* et *E. faecium* peuvent survivre à une température de 60 ° C pendant 30 minutes, ce qui permet de les distinguer des autres genres apparentés tels que *streptococcus* (FOULQUIE *et al*, 2006).

4.3 Caractères biochimiques

Un certain nombre de réactions biochimiques ont été décrites pour le diagnostic des entérocoques et sont généralement catalase négative (SCHLEIFER *et al*, 1984), dépourvus de cytochrome oxydase, de nitrate réductase et nécessitent des facteurs de croissance. De plus, la plupart des entérocoques ne produisent pas d'indole ou de sulfure d'hydrogène. Ils ont été testés positifs pour Voges-Proskauer, (SCHLEIFER *et al*, 1984).

Les entérocoques sont homofermentaires et produisent principalement de l'acide lactique et, dans une moindre mesure, de l'acétate et de l'éthanol. Les produits finaux du métabolisme changent en fonction de la présence ou de l'absence d'oxygène. En milieu anaérobie, l'acide lactique est le principal produit du métabolisme des sucres. Dans des conditions aérobies, les métabolites sont l'acétate et le dioxyde de carbone. Ils sont capables de métaboliser divers types de sucres tels que le lactose, le ribose, le tréhalose, le glucose et le maltose (SCHLEIFER *et al*, 1984).

5 Épidémiologie des Entérocoques

Les entérocoques sont des habitants normaux du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux (FRANZ *et al*, 1999). Les sécrétions orales, les voies respiratoires supérieures, la peau et le vagin peuvent également être colonisés par ce germe (CARIP *et al*, 2015). L'*Enterococcus faecalis* est l'espèce prédominante, la colonisation se produit habituellement au cours de la première semaine de la vie. À l'âge adulte, la colonisation par *E. faecalis* est presque omniprésente, mais ne représente qu'une fraction mineure du microbiote intestinal chez l'hôte normal (ARIAS *et* MURRAY, 2012 ; JONES *et al*, 1997). La colonisation d'*Enterococcus faecium* est moins constante, bien qu'environ 25 % des adultes abritent cet organisme, généralement à très faible concentration. La perturbation du microbiote intestinal normal par l'exposition aux antibiotiques ou la transplantation de cellules souches hématopoïétiques enrichit grandement l'abondance des entérocoques fécaux et augmente considérablement le péril d'infection sanguine subséquente (LECLERCQ, 2006).

E. faecalis est responsable d'environ 80% des infections dites entérocoquiques, (KUHAN *et al*, 2003). Il est rare que d'autres espèces, comme *Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus casseliflavus*, soient associées à une infection invasive, mais ces organismes se distinguent par leur faible résistance à la vancomycine. Le séquençage du génome entier

montre que la flore indigène du patient est la source d'infection entérococcique dans la plupart des cas.

6 Pathogénicité des Entérocoques

Les Entérocoques ne sont pas des microorganismes invasifs coléreux, qui ne causent habituellement la maladie que chez les enfants dont la surface des muqueuses est endommagée ou dont la réponse immunitaire est amenuisée. Leur affleurement spectaculaire comme cause d'infection nosocomiale est principalement le résultat de leur résistance aux antibiotiques couramment utilisés en milieu hospitalier (LECLERCQ, 2001 ; FLAHAUT *et al*, 2011). Les molécules sécrétées et de surface cellulaire sont impliquées dans la pathogénèse. Des facteurs favorisant l'adhésion, comme la protéine de surface EPS, expliquent probablement la propension de ces organismes à causer une endocardite et des infections urinaires. La capacité à former des biofilms facilite censément la colonisation des cathéters urinaires et vasculaires. D'autres facteurs de virulence étudiés comprennent la cytolysine, la substance d'agrégation, la gélatinase et le superoxyde extracellulaire (DRAMSI *et al*, 2005).

7 Rôles et applications des Entérocoques

7.1 Indicateurs de contamination fécale

En raison de leur ubiquité dans les matières fécales et de leur aptitude à résister aux différentes conditions physicochimiques et environnementales les entérocoques ont été approuvés comme des indicateurs de pollution fécale humaine de l'eau et des aliments. Plus récemment, du fait de leurs densités sur les mains, on les utilise comme indicateur d'hygiène des mains. Cependant, l'utilisation des entérocoques comme indicateurs de pollution ou de contamination fécale humaine peut être conflictuelle, parce que les entérocoques sont également présents dans les excréments des animaux (HARWOOD *et al*, 2000 ; Layton *et al*, 2010), dans les sols (FUJIOKA et YAPPANAHALLI, 2004 ; GOTO et YAN, 2011).

7.2 Applications des entérocoques en produits laitiers

L'utilisation des entérocoques dans les fromages est très contestée. Les études sur la microflore des fromages traditionnels dans les pays méditerranéens, qui sont produits singulièrement à partir du lait cru de brebis ou de chèvre, et moins fréquemment à partir de lait de vache, ont montré que les entérocoques jouent un rôle étendu dans la maturation de ces

fromages, probablement par la protéolyse, la lipolyse, et l'utilisation du citrate, contribuant ainsi à leur goût et leur saveur typique, Ils sont également présents dans d'autres produits alimentaires fermentés, tels que les saucisses (FRANZ *et al*, 1999 à 2003 ; GIRAFFA, 2002; HUGAS *et al*, 2003) et les olives (FERNANDEZ-DIAZ, 1983; FRANZ *et al*, 1996, 1999 ; FLORIANO *et al*, 1998 ; BEN OMAR *et al*, 2004). Les entérocoques ont la capacité de produire des bactériocines, qui sont de petits peptides avec une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positive étroitement apparentés, y compris d'altération ou les bactéries pathogènes telles qu'en *Listeria* (DE VUYST et VANDAMME, 1994). D'ailleurs, les Entérocoques sont utilisés dans certains pays comme probiotiques.

7.3 Utilisation des entérocoques comme ferments lactiques

L'étude des souches d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* isolés de divers fromages, avec un bon pouvoir acidifiant et/ou des propriétés protéolytiques (WESSELS *et al*, 1990 ; CENTENO *et-al*, 1999 ; SUZZI *et al*, 2000). Et l'isolement fréquent des entérocoques à partir de culture starter naturel utilisées pour la fabrication de fromages traditionnels (GATTI *et al*, 1994 ; VILLANI et COPPOLA, 1994 ; GIRAFFA *et al*, 1997) ont encouragé certaines applications de ces micro-organismes comme des cultures starter primaires.

7.4 Utilisation des entérocoques en tant qu'adjuvants

Les cultures adjuvantes peuvent être définies comme ceux qui sont ajoutés aux fromagées à des fins autres que la formation d'acide, qui est exclusivement consacré à la culture starter. Des cultures adjuvantes non starters sélectionnés peuvent être ajoutées pour accélérer la maturation, pour produire la sapidité souhaitable, ou à agir en tant que probiotiques. Plusieurs travaux de recherche ont été menés pour évaluer les fonctionnalités technologiques des entérocoques sélectionnés dans la production de fromage. *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* sont les espèces qui ont été proposées en combinaison avec d'autres espèces lactiques mésophiles et thermophiles dans le cadre de la formulation des starters pour différents fromages européens tels que les fromages italiens à pâte demi-cuite (NEVIANI *et al*, 1982), MOZZARELLA (COPPOLA *et al*, 1988 ; PARENTE *et al*, 1989 ; VILLANI et COPPOLA, 1994). FETA (LITOPOULOU-TZANETAKI *et al*, 1993 ; SARANTINOPOULOS *et al*, 2002), VENACO (CASALTA et ZENNARO, 1997), CEBREIRO (CENTENO *et al*, 1999) et HISPANICO (OUMER *et al*, 2001). En général, l'ajout des Entérocoques en tant qu'adjuvant le long du processus de la maturation affecte le goût, l'arôme, la couleur, la structure, ainsi que le profil sensoriel global des fromages

entièrement mûrs. Plusieurs fromages européens sont caractérisés par une flore bactérienne de surface complexe, constituées généralement de levures, de bactéries corynéformes, et de microcoques ou staphylocoques à coagulase négative. Cependant, même les entérobactéries et les Entérocoques sont souvent présents comme contaminants mineurs (BOCKELMANN, 2002). Dans une investigation récente sur la flore bactérienne de surface des fromages lors de la maturation, différentes souches *Enterococcus spp* colonisant la croûte du fromage ont été trouvés. La moitié de ces souches ont montré une activité inhibitrice contre les souches de *Listeria* et ont été signalés comme des candidats prometteurs pour la formulation d'une flore de surface pour la maturation de certains types de fromage. Récemment, *E. faecium* R88 a été utilisé comme culture probiotique adjuvante dans le fromage Cheddar. La souche PR88, qui possède les propriétés requises d'un microorganisme probiotique, y compris la capacité à soulager le syndrome du côlon irritable, non pathogène, et la tolérance à la bile et à l'acide (HUNTER *et al*, 1996)

7.5 Utilisation des entérocoques en tant que probiotiques

Il est connu que le microbiote Intestinal dont ils font partie les entérocoques et les entérocytes ont des éléments indispensables au bon fonctionnement du système immunitaire et son efficacité (WELLS *et al*, 2011).

Le probiotique est un additif qui tire un bénéfice chez les animaux et les humains en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale (ZIGGERS, 2001). Les bactéries lactiques sont les plus utilisées comme probiotiques, celles-ci regroupent les genres bactériens suivants : *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* ainsi que les levures comme *Saccharomyces* (CHAMPAGNE *et al*, 2008).

Chez *Enterococcus faecium*, EF9296 est la souche la plus utilisée possédant une activité antimicrobienne contre *Listeria spp* (MARCINAKOVA *et al*, 2004).

L'efficacité clinique d'*E. faecium* SF68 a été démontrée en Suisse et en Belgique dans la prévention et un raccourcissement de 1 à 3 jours de diarrhée associée aux antibiotiques chez l'adulte et même chez les enfants (BUYDENS *et al*, 1996).

8 Propriétés biochimiques des entérocoques et leur intérêt technologique

8.1 Pouvoir acidifiant

L'un des caractères technologiques essentiels des levains de fromagerie est leur aptitude à l'acidification du lait, qui dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acidité développée. Plusieurs travaux sur l'aptitude des entérocoques à acidifier le lait ont été rapportés. En général, les Entérocoques présentent une faible activité acidifiante du lait. (MOREA *et al*, 1999) ont montré que le pH du lait après 24 h d'inoculation avec des souches isolées à partir du fromage Mozzarella n'a pas baissé en dessous de 5,5. Des recherches récentes sur des entérocoques isolés du lait ont confirmé leur faible pouvoir acidifiant dans le lait avec seulement quelques souches présentant un pH inférieur à 5,0-5,2 après 16-24 h d'incubation à 37 °C (ANDRIGHETTO *et al*, 2001 ; DURLU OZKAYA *et al*, 2001 ; SARANTINOPOULOS *et al*, 2001). Il a été également observé que l'espèce *E. faecalis* est généralement apte à acidifier le lait plus fort que l'espèce *E. faecium*. Chez des souches d'*E. faecalis* isolées d'un fromage traditionnel italien, un pouvoir acidifiant élevé dans le lait écrémé avec un abaissement du pH à environ 4,5 après 24 h de la fermentation a été observé (GIRAFFA *et al*, 1993 ; SUZZI *et al*, 2000). Il semble donc y avoir effectivement chez les entérocoques une aptitude à l'acidification caractéristique de l'espèce

8.2 Activités protéolytiques

L'action protéolytique des Entérocoques au cours de l'affinage peut se manifester soit par une production d'enzymes exocellulaires qui accompagne le développement microbien, soit par une libération d'enzymes endocellulaires après la lyse des corps bactériens. La dégradation de la caséine joue un rôle majeur dans le développement de la texture du fromage. En outre, la dégradation secondaire des acides aminés a un impact majeur sur le développement de la saveur dans le fromage. Certains peptides contribuent à la formation de la saveur, tandis que d'autres, des peptides indésirables, peuvent conduire à des saveurs amères. Jusqu'à présent les études effectuées sur l'activité protéolytique des bactéries lactiques sont principalement limitées aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* (PRITCHARD et COOLBEAR, 1993 ; SOUSA et MALCATA, 2002). Les voies biochimiques qui conduisent à la dégradation de la caséine et du transport des acides aminés et des peptides sont considérées comme étant les mêmes dans les autres bactéries lactiques, y compris le genre *Enterococcus*. Bien que certains auteurs aient signalé une activité protéolytique pertinente chez les espèces *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* isolées à partir de divers

fromages, ces activités sont généralement faibles pour la plupart des espèces d'entérocoques, à l'exception de l'espèce *E. faecalis* étant la plus active (WESSELS *et al*, 1990 ; CENTENO *et al*, 1999 ; SUZZI *et al*, 2000), (DOVAT *et al*, 1970 ; ARIZCUN *et al*, 1997 ; MACEDO et MALCATA, 1997 ; SUZZI *et al*, 2000 ; ANDRIGHETTO *et al*, 2001). Aucune relation claire n'a été observée entre les activités protéolytiques et l'acidification (DURLU-OZKAYA *et al*, 2001).

8.3 Production des bactériocines

Les *Enterococcus* produit avec une grande variété de bactériocines, on parle des 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 plupart de temps thermostable (KLAENHAMMER, 1988 ; KLAENHAMMER, 1993 ; COTTER *et al*, 2005). Plusieurs 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).

Chapitre II : Facteurs de virulence

Le genre *Enterococcus* produit une grande diversité de bactériocines, considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments cuits et non cuits en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Elles constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires (AGUILAR-GALVEZ, 2010).

1 Risques liés aux Entérocoques

Les Entérocoques font partie des bactéries responsables d'infections humaines, qui sont dues principalement aux *Enterococcus faecalis* (80 % à 90 % des cas) et aux *Enterococcus faecium* (5 à 10 % des cas). Tandis que, les autres espèces d'*Enterococcus*, à savoir *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* et *E. hirae*, sont peu impliquées dans les diverses infections (MURRAY, 1990).

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).

Cette virulence est déterminée par plusieurs facteurs, Tels que :

- L'aptitude à coloniser le tractus gastro-intestinal, qui est l'habitat naturel ;
- La capacité d'adhérer à une variété de protéines de la matrice extracellulaire, incluant la thrombospondine, la vitronectine et la lactoferrine ; et
- La capacité d'adhérer à l'épithélium du tractus urinaire, l'épithélium de la cavité orale et les cellules embryonnaires rénales humaines.

2 Définition d'un facteur de virulence

Les facteurs de virulence sont définis comme des éléments qui augmentent la capacité du microorganisme à provoquer un état pathologique. Ils ne sont pas indispensables à la survie de la bactérie, mais diminuent son potentiel pathogène lorsqu'ils sont absents (CASADEVALL et PIROFSKI, 2001).

3 Facteurs contribuant à la pathogénicité des Entérocoques

Les entérocoques adhèrent aux cellules hôtes en raison d'un certain nombre de facteurs qui permettent la colonisation et l'invasion des tissus, ainsi que l'effet sur la modulation immunitaire qui cause des dommages à la médiation des toxines « entérocoques » (FIORE *et al*, 2018).

Deux facteurs de virulence ont été isolés et décrits. Le premier sont les facteurs de virulence qui affectent la colonisation de la surface des cellules hôtes, le second type comprend les facteurs produits par l'entérocoque, qui endommagent les tissus.

3.1 Facteurs de virulence liés à la membrane

3.1.1 Substances agrégatives

L'agrégation est formée lors de la conjugaison afin de permettre le transfert des plasmides, qui portent les gènes codent pour les substances agrégatives (BERGMANN *et al*, 2004). Les substances d'agrégation (SA) sont considérées comme un facteur de virulence très important car il permet de transférer les gènes de résistances aux antibiotiques (DRAMSI *et al*, 2005).

Les SA sont des adhésines de nature glycoprotéique positionnées sur la surface des cellules, ont un poids moléculaire de 137KDa et une structure bouclée en épingles de cheveux (FOULQUIE MORENO *et al*, 2006).

3.1.2 Protéines extracellulaires de surface

La protéine de surface d'entérocoque (Esp) a été identifiée la première fois 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 avec des caractéristiques structurales analogues 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 commun chez les isolats cliniques qui sont à l'origine des infections. Il est supposé que la présence de ce gène *esp* promouvoir l'adhérence. Cette protéine contribue également à la formation du biofilm par les entérocoques, ce qui pourrait conduire à une résistance au stress extérieur de l'environnement et à l'attachement aux cellules eucaryotes (BERGMANN *et al*, 2004).

3.1.3 Protéines de liaison au collagène

L'adhérence des bactéries aux constituants tissulaires et cellulaires de l'hôte, telles que la matrice extracellulaire est apparue en premier ligne du processus d'infection. Plusieurs essais ont montré la capacité de certains *E. faecalis* isolés à adhérer à un certain nombre de protéines de la MEC, telles que le collagène, la laminine, le fibrinogène, la fibronectine, la lactoferrine et d'autres particules. La plupart de ces études ont montré que l'attachement à ces protéines *in vitro* est presque inexistant, sauf pour certains isolats. Des recherches sur des gènes codants pour des adhésines potentielles, ont conduit à la découverte de l'adhésine Ace (adhésine du collagène d'*E. faecalis*), qui est une protéine de surface avec des propriétés adhésives, avec un poids moléculaire d'environ 74 kDa (RICH *et al.*, 1999). Ces adhésines ayant été décrites chez les entérocoques, et permet la liaison au collagène, la laminine et à la dentine (RICH *et al.*, 1999 ; NALLAPAREDDY *et al.* 2003).

3.2 Facteurs de virulence sécrétés

3.2.1 Cytolysine

La Cytolysine, ou β -hémolysine se définit comme une bactériocine, qui est une toxine bactérienne chez l'homme, et bactéricide contre certaines bactéries Gram positives (HALLGREN *et al.*, 2008). Cette toxine de nature peptidique génère des pores dans la membrane cytoplasmique responsable de leur lyse. La production de Cytolysine semble être un facteur de risque important lié aux entérocoques pathogènes (LE BLANC, 2006). Les gènes qui codent 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).

3.2.2 Gélatinase

La gélatinase purifiée par MAKINEN en 1989 est capable de dégrader un certain nombre de substrats, notamment la gélatine, l'insuline, l'endothéline humaine, le collagène, les peptides

liés aux phéromones sexuelles d'*E. faecalis* et plusieurs peptides bioactifs de mammifères (MAKINEN.P. L et MAKINEN.K. K, 1994).

Il a également été démontré que la gélatinase clive les protéines de surface mal repliées d'*E. faecalis* ainsi que la fibrine, pour réduire les taux de phéromones chez cette espèce par activation d'une substance appelée autolysine. Il a été rapporté que des souches d'*E. faecalis* isolées à partir de patients hospitalisés ont une augmentation de production de la gélatinase par rapport aux souches communautaires (COQUE *et al*, 1996).

Chez les entérocoques, la révélation de la gélatinase se manifeste avec une zone claire autour-de la colonie (figure 3).

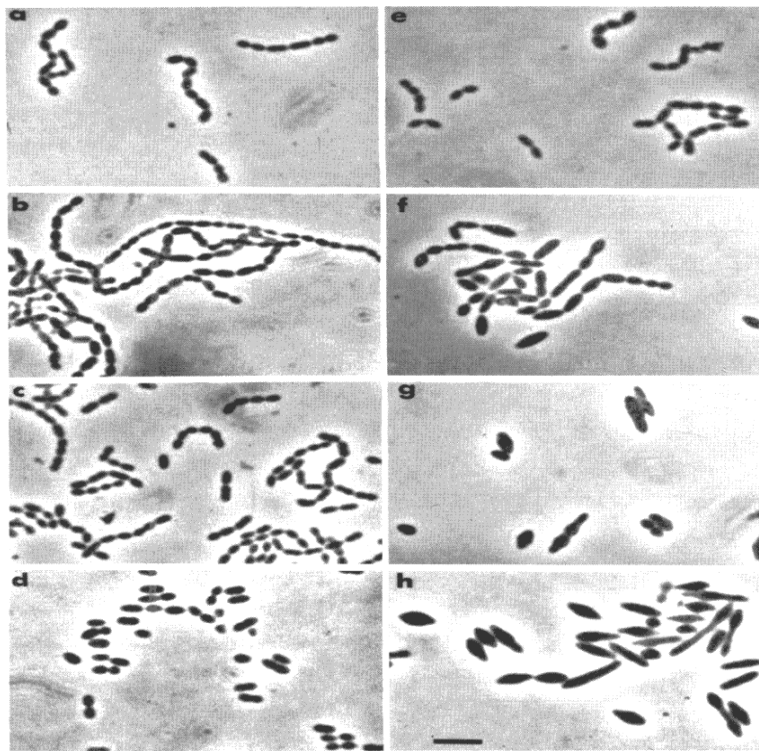


Figure 2 : image microscopique photonique montrant les souches productrices de la gélatinase (ROSELYN, 1973).

3.2.3 Hyaluronidase

L'hyaluronidase est une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, constituant majeur de la matrice extracellulaire (MEC) des cellules animales (KAYSER, 2003). L'enzyme dépolymérise la fraction mucopolysaccharidique des tissus conjonctifs, facilitant 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).

3.2.4 Phéromones sexuelles

Les phéromones sont des peptides (enchainements de 7 à 8 acides aminés), qui facilitent le transfert des plasmides lors de la conjugaison bactérienne (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). Néanmoins, ce n'est pas le seul rôle des phéromones ; ils peuvent aussi être chimiquement attirant pour les neutrophiles et induire la production de superoxydes (substances mutagènes peuvent produire des défauts génétiques) et initier des circonstances inflammatoires (BHARDWAJ *et al*, 2008).

4 La formation des biofilms

Le biofilm est l'agrégat de cellules bactériennes attachées à une surface et enrobées d'une matrice polymérique (HALL STOODLEY *et al*, 2004). Les bactéries peuvent bien adhérer à une surface biotique (ex cellules de la muqueuse), qu'à une surface abiotique (ex plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation). La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm (RICHARDS *et al*, 2007). Sur le microscope le biofilm est observé comme un amas de cellules anarchiques (figure 5)

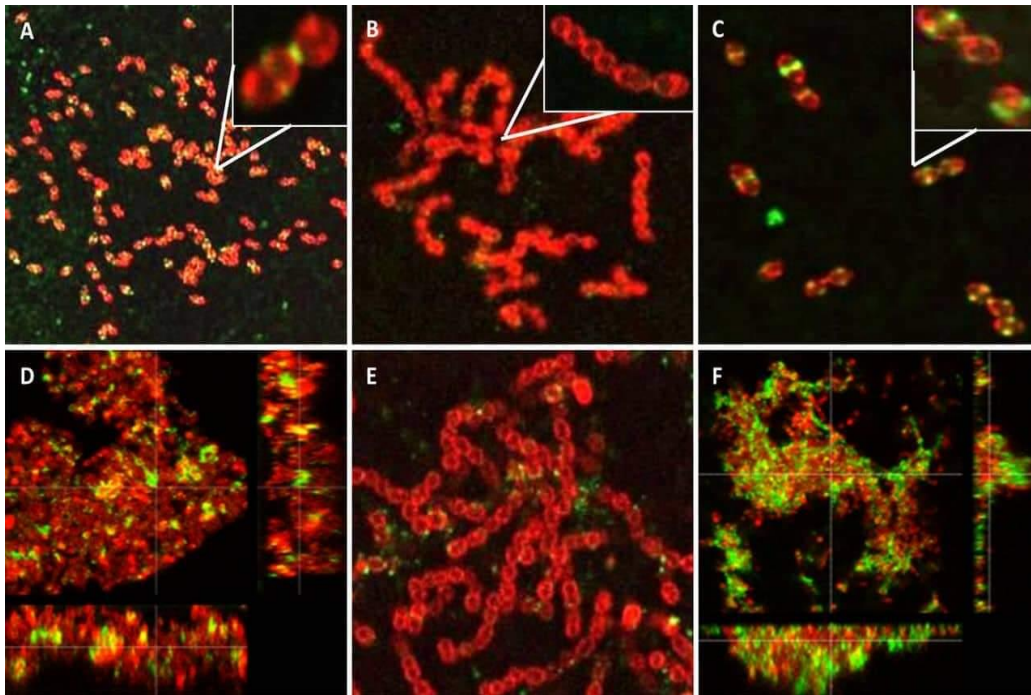


Figure 3 : Biofilm produit par une souche de *Enterococcus faecium* dans un système en microplaque. Image obtenue en microscopie confocale suite à une coloration du biofilm à l'aide de Film Tracer (FERNANDA L *et al*, 2013).

La formation d'un biofilm est rapide. Les bactéries doivent, dans un premier temps, adhérer à une surface biotique ou abiotique. Puis, les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des micro colonies. Lors de l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents. L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes. Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm et jouent un rôle important dans la transmission de bactéries de réservoirs environnementaux à un hôte (animal ou humain), dans la transmission entre les hôtes et dans la propagation de l'infection chez un hôte (KAPLAN *et al*, 2010). (Figure 6)

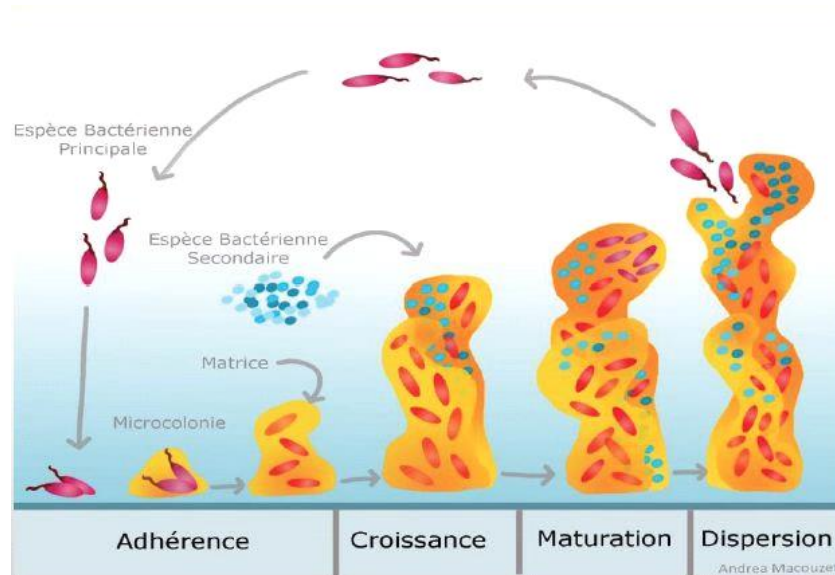


Figure 4 : Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien.
(YANNICK , 2014).

5 Formation des biofilms chez les entérocoques

Les entérocoques dans les biofilms résistent plus aux antibiotiques que la croissance planctonique, donc l'impact potentiel de la formation de biofilm pourrait être important (LEWIS, 2001). *E. faecalis* et *E. faecium* connus comme étant des souches capables de produire des biofilms qui consistent en population de cellules attachés de façon biotique et abiotique, enrobés dans une matrice hydratée de substances exopolymériques (JAMAL A *et al*, 2007).

Esp faecalis impliqué comme facteur contributif dans la colonisation et la persistance de l'infection au sein de la voies urinaires (SHANKAR *et al*, 2001).

Plusieurs études ont confirmé que la gélatinase est essentielle pour la formation de biofilms mais n'ont pas soutenu le lien entre les deux (DI ROSA *et al*, 2006).

Chapitre III :
Resistance des
***Enterococcus* aux**
antibiotiques

1 Définition

Un antibiotique est une substance de nature chimique produite naturellement par des microorganismes (capable d'être bactéricide qui inhibe la prolifération bactérienne, ou bien bactériostatique responsable de la destruction de la souche) ou chimiquement au laboratoire (SINGLETON, 2005).

Les antibiotiques agissent sur un endroit précis (site d'action), en déséquilibrant la biosynthèse de la bactérie (métabolisme), nécessaire à la survie des bactéries (HEGLUND *et al*, 2007).

2 Principaux paramètres influençant sur l'activité d'un antibiotique

L'activité d'un antibiotique repose sur deux paramètres principaux, le premier c'est la notion de la CMI (concentration minimale inhibitrice) qui correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance de germe. Par contre, le deuxième paramètre : CMB (concentration minimale bactéricide), définie comme la concentration minimale qui détruit 99% de la population bactérienne.

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

3 Notion de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Lorsqu'une souche bactérienne supporte des concentrations d'antibiotiques élevées que celles qui inhibent le développement de la plupart des autres souches appartenant à la même espèce, on parle donc d'une souche résistante (MAC GOVAN et WISE, 2001).

4 Critères de classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés selon plusieurs critères :

➤ Selon l'origine

Cette classification est basée sur le moment initial de l'apparition de l'antibiotique. Cette substance a trois origines essentielles, dont le premier est naturel où le microorganisme contient des gènes nécessaires à la synthèse de l'antibiotique, on peut citer la pénicilline (produite

naturellement par le champignon. Le deuxième penicillium s'agit d'un antibiotique qui a origine synthétique, obtenu par voie chimique (fabriqué au laboratoire) on trouve dans cette catégorie les sulfamides. Par contre, le dernier type s'agit d'un antibiotique obtenu par un radical chimique greffé sur une fraction moléculaire naturelle comme la méticilline donc on parle d'un antibiotique semi-synthétique (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

➤ **Selon le spectre d'activité**

Selon gaudy et buxeraud (2005), on trouve :

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.

➤ **Selon le mode d'action**

Les antibiotiques réagissent avec la bactérie cible sur des endroit précis nommes les sites d'action qui inhibent la biosynthèse de la bactérie. Selon le mode d'action, l'antibiotique exerce deux types d'action dont le premier l'antibiotique est dit **Bactériostatique**, inhibant la croissance bactérienne et l'autre s'agit d'un antibiotique **Bactéricide** qui provoque la mort de la bactérie (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

5 Classification et mode d'action des antibiotiques

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

a. **Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi**

➤ **Les beta-lactamines**

Les bêtalactamines constituent une famille très complexe dont la structure du noyau de base comporte toujours le cycle beta lactame, constitués de trois grands groupes : les dérivés de l'acide 6-amino pénicillinique, les dérivés de l'acide 7 aminophalosporanique et les monobactames (BRYSKIER, 1999 ; CAVALLO *et al*, 2004).

Les bêta lactames sont des molécules hydrophobes qui traversent la membrane externe des bactéries par la voie des porines, leur petite taille qui est d'environ 300 à 700Da facilite leur diffusion à travers le peptidoglycane, qui a la capacité de laisser passer les molécules qui ont une taille jusqu'à 100KDa (BUSCH *et al*, 1995 ; CAVALLO *et al*, 2004).

Les bêtalactamines sont des protéines qui lient les pénicillines PLp, qui sont impliqués dans la synthèse des peptidoglycane, transpeptidase, transglycosidases et les carboxypeptidases (SINGLETON, 2002 ; GAUDY et BUXERAUD, 2005).

➤ **Les glycopeptides**

Les glycopeptides se composent principalement de la vancomycine et de la teicoplanine dont le poids moléculaire est respectivement de 1.45KDa et 1.89 KDa (GAUDY et BRUXERAUD, 2005).

Les glycopeptides se fixent de manière non covalente sur la partie D-ala D-ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane, de ce fait la polymérisation est inhibée (LOUM, 2005).

➤ **Les fosfomycines**

La fosfomycine est un dérivé d'acide phosphorique, il s'agit de l'acide L-cis-1-2 epoxy-propyl- phosphorique. Elle peut être synthétisée naturellement par le genre *Streptomyces* (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Avec un spectre d'activité large, elle inhibe la synthèse du peptidoglycane en agissant sur la première enzyme impliquée dans sa synthèse (phosphoénolpyruvate) (BERGOGNE-BEREZIN, 1999 ; GAUDY et BUXERAUD, 2005).

b. antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

➤ **Les aminosides**

Ce sont des antibiotiques à large spectre d'activité, hétérosides, naturels ou d'hémisynthèse, ils peuvent être produits à partir d'actinomycètes ou de *Bacillus* (GAUDY et BUXERAUD, 2005). Ces derniers incluent la kanamycine, la néomycine, la streptomycine, l'amikacine et la gentamicine (SINGLETON, 2002).

Ces antibiotiques sont rapidement bactéricides, Actifs aussi bien sur les bactéries à Gram positives, que sur les Gram négatives (SINGLETON, 2005). Leur effet principal vient de leur fixation à la sous-unité 30S du ribosome bactérien en perturbant la lecture du code génétique menant à l'inhibition de toutes les étapes de la synthèse protéique (VEYSSIER, 1999).

➤ **Les macrolides**

Les macrolides sont utilisés dans le traitement des infections humaines ; ce sont des molécules à propriétés antibiotiques bactériostatiques (JENSEN *et al*, 1999). Ces molécules sont faites d'un grand anneau lactone : plus de 12 atomes, substitué par un ou plusieurs sucres ou sucres aminés (SINGLETON, 2002). Elles se fixent sur la cible ARN ribosomale 23S de la sous-unité 50S du ribosome, ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse protéique (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

➤ **Les tétracyclines**

Ces antibiotiques bactériostatiques, à large spectre d'activité (SINGLETON, 2002) sont de nombre de sept, possèdent tous un noyau à quatre cycles de type « naphtacènegarboxamide » sur lequel divers radicaux viennent se substituer sur les carbones du système cyclique (GAUDY et BUXERAUD, 2005). Le mode d'action de ces cyclines est basé sur l'inhibition de la synthèse des protéines en se liant au ribosome et en inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt au site A ; Ils sont généralement utilisés pour traiter des maladies humaines ou animales provoquées notamment par *Brucella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* et *Rickettsia* (SINGLETON, 2005).

➤ **Les linézolides**

Le premier agent d'une nouvelle classe d'antibiotiques est le linézolide. Il s'agit d'une molécule synthétique. Son mécanisme d'action est l'inhibition de la synthèse protéique bactérienne, en se fixant sur le site P de la sous-unité 50 S empêchant ainsi son attachement à la sous-unité 30 S, elle-même associée à l'ARN messager et à l'ARN de transfert transportant le premier acide aminé, la méthionine. Cela aboutit à un défaut de formation du ribosome 70 S et donc à l'interruption de l'initiation de la synthèse protéique bactérienne (DUTRONC *et al*, 2005).

c. Antibiotiques inhibant le fonctionnement de l'ADN**➤ Les Quinolones**

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides obtenus par voie synthétique, à spectre antibactérien large. Cependant, du fait de leur utilisation importante, les quinolones sont utilisées raisonnablement afin de prévenir l'émergence de souches résistantes (SINGLETON, 2005).

Ces molécules bloquent la réplication de l'acide désoxyribonucléique ADN par la formation d'un complexe enzymatique avec la topoisomérase, qui est une enzyme contrôlant la structure topologique de l'ADN et empêche par la suite la réplication et la transcription bactérienne (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Ils interviennent au niveau de la synthèse de l'ADN gyrase, entraînant ainsi une modification du message génétique (FILIP *et al*, 2011). Cette famille regroupe :

• Les quinolones classiques

Leur spectre est limité aux bacilles à Gram négatif, à l'exception des *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. On distingue : Acide nalidixique, Acide pipemidique, Acide oxolinique et Acide piromidique

• Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones :

Leur spectre est élargi et leur activité antibiotique accrue. Elles sont en effet plus actives sur les Enterobacteriaceae. Elles agissent sur le *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, mais aussi sur les Cocci à Gram négatif et les Cocci à Gram positif. Certaines sont actives sur les Mycobactéries, les Mycoplasmes, les Chlamydiae et les Legionnelles. On distingue : Norfloxacin, Pefloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin et Enrofloxacin (COULIBALY *et al*, 2014).

➤ Imidasolés

Les antibiotiques de cette famille agissent sur la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN), entraînant ainsi une modification du message génétique. Ces molécules agissent uniquement sur les anaérobies stricts et sur certains protozoaires parasites de l'Homme. Quatre molécules sont à ce jour employées : Metronidazole, Tinidazole, Ornidazole et Secnidazole (SEDALLIAN *et al*, 2002).

d. Antibiotiques s'inhibant la membrane cellulaire**➤ La daptomycine**

La daptomycine est un antibiotique de nature lipopeptidique bactéricide agissant contre les bactéries Gram positive. Cet antibiotique réagit par l'altération de l'homéostasie de l'enveloppe bactérienne. La daptomycine s'insère à la membrane plasmique sur la face externe et forme par la suite des oligomères qui vont inhiber la synthèse protéique des acides nucléiques (REISSIER, 2016).

6 Résistance des entérocoques aux antibiotiques**➤ Résistance des entérocoques vis-à-vis les β -lactamines****• Résistance intrinsèque et acquise**

Contrairement aux autres bactéries à Gram positive, les entérocoques sont plus résistants de façon intrinsèque envers des antibiotiques, et cela est probablement dû à leur besoin de survie et de persistance dans des écosystèmes hautement compétitifs et potentiellement défavorable, tels que le tractus gastro-intestinal (TANNOCK et COOK, 2002).

• Résistance naturelle

Les entérocoques présentent une résistance intrinsèque aux céphalosporines et une sensibilité étendue (FONTANA *et al*, 1990). Par contre, la résistance à la pénicilline est principalement liée à des mutations ou surproduction de la *pbp5*, qui une protéine liant la pénicilline (ARIAS et MURRAY, 2012).

• La résistance acquise :

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

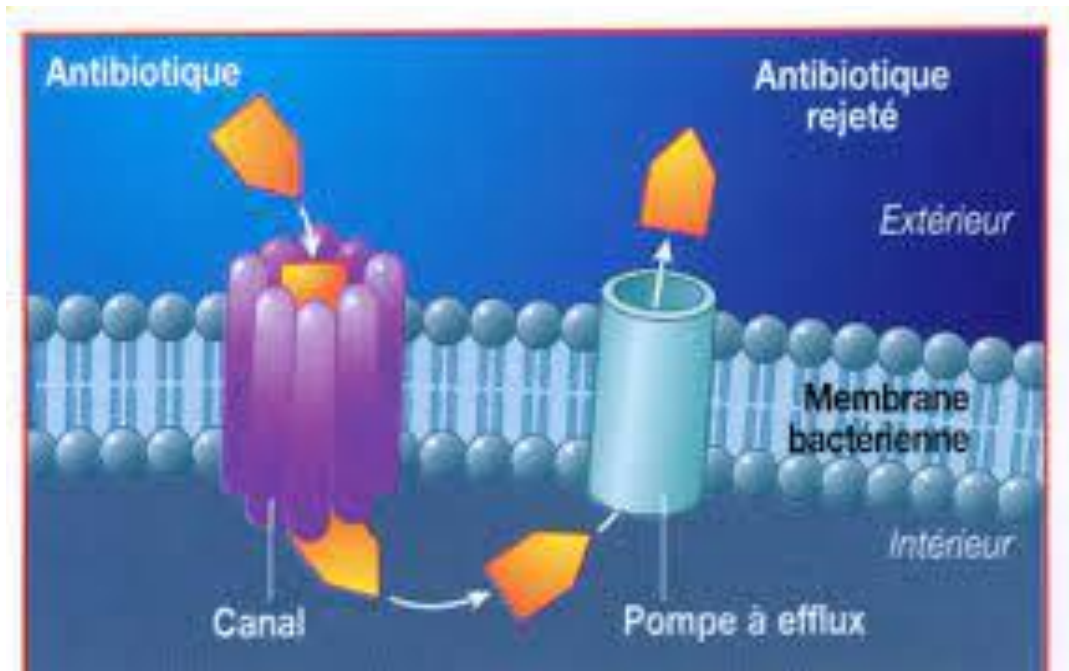


Figure 5 : Inactivation des antibiotiques par des β -lactamases (LAVIGNE, 2007).

➤ **Résistance des entérocoques vis-à-vis les glycopeptides**

La vancomycine est active contre la plupart de Gram positif tandis qu'elle peut y avoir une résistance, chez la majorité des gram négatif (FRENCH, 1998 ; WALSH, 2003).

La vancomycine est un glycopeptide interférant avec la production de la paroi cellulaire, ce qui entraîne une déstabilisation de la liaison D-Ala D-Ala et une lyse des bactéries.

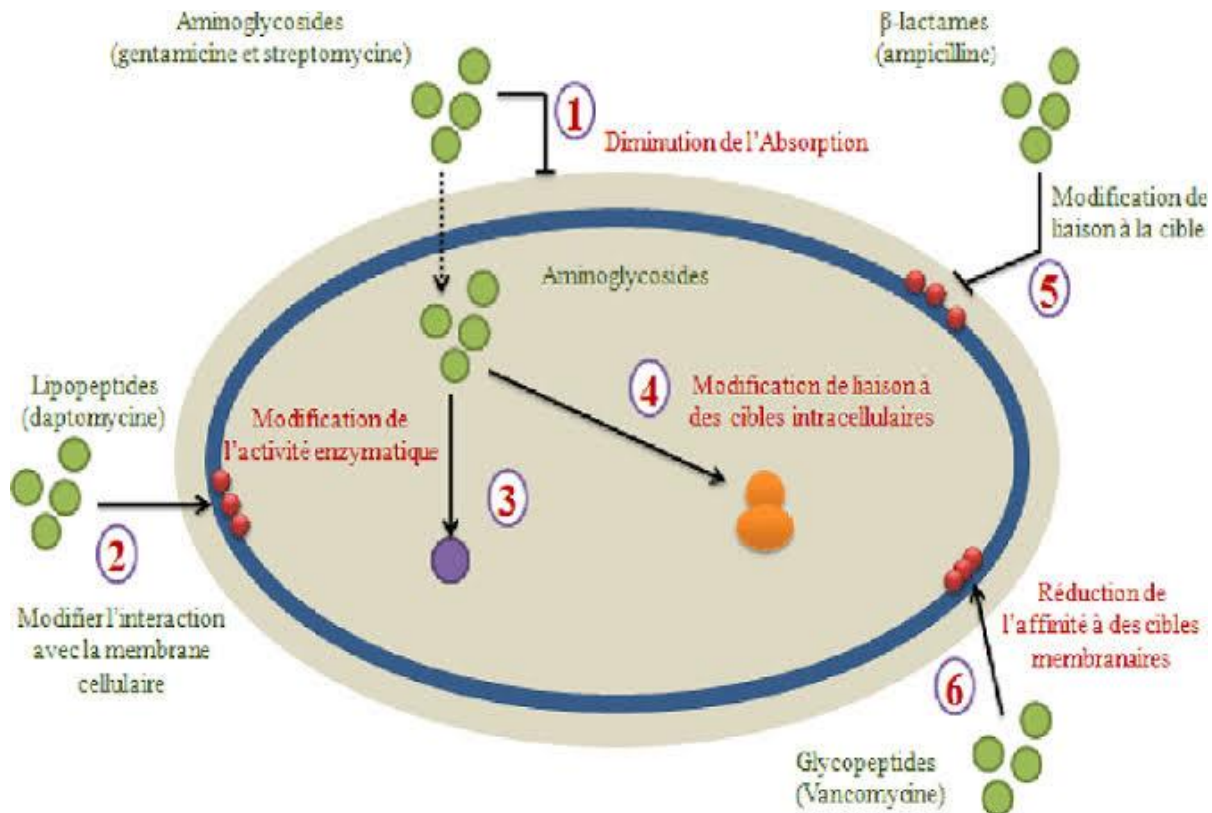


Figure 6 : mécanisme de résistance aux antibiotiques (BOUYAHYA, 2017).

➤ Résistance des entérocoques vis-à-vis les tétracyclines

La résistance à la tétracycline chez les entérocoques est généralement associée à la présence du gène *tet(M)* qui confère une protection ribosomale, mais d'autres gènes apparentés offrant une protection ribosomale ont également été décrits, comme *tet(O)* et *tet(S)* (AARESTRUP *et al*, 2000). Dans les isolats cliniques, *tet(M)* est principalement associé à des éléments transposables de type Tn916, mais il peut également être trouvé dans les plasmides conjugatifs et sur le chromosome. Cependant, d'autres gènes de résistance codent pour des protéines qui se lient au ribosome et modifient sa conformation, empêchant la fixation de la tétracycline (LECLERCQ, 1997).

➤ **Résistance des entérocoques vis-à-vis les quinolones**

Les quinolones présentent généralement une seule activité contre les entérocoques. Les quinolones inhibent la croissance des bactéries en interférant avec la réplication de l'ADN, en particulier en se liant aux topoisomérases de type II, qui contrôlent le surenroulement de l'ADN (ADN gyrase et ADN topoisomérase IV) et en inhibant leur fonction, conduisant à des ruptures mortelles du double brin de l'ADN. La résistance à la quinolone chez de nombreuses espèces de bactéries se produit via des mutations dans les régions déterminant la résistance aux quinolones (des gènes codant pour la gyrase et la topoisomérase IV). Ces mutations empêchent l'attachement de l'antibiotique à l'enzyme, ce qui permet à la réplication de l'ADN de se poursuivre malgré la présence de l'antibiotique (KRISTICH *et al*, 2014). De telles mutations ont été observées chez des isolats cliniques d'*E. faecium* et *E. faecalis* résistants aux quinolones (WERNER *et al*, 2009), mais sont absentes chez *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (LOPEZ *et al*, 2011). L'externalisation de l'antibiotique par des pompes d'efflux est un autre mécanisme bien décrit de la résistance aux quinolones. Parmi elles, NorA et PmrA ont été impliquées dans la résistance aux quinolones et ont été décrites chez *E. faecium* (HAWKEY, 2003). Un troisième mécanisme de résistance, trouvé chez *E. faecalis* est médié par le gène *qnr* et code pour une protéine avec une série de répétitions pentapeptidiques (ARSENE et LACLERCQ, 2007). La présence de cette protéine est susceptible de protéger l'ADN gyrase en diminuant la liaison à l'ADN de la quinolone et la formation ultérieure du complexe quinolone-gyrase (TRAN *et al*, 2005).

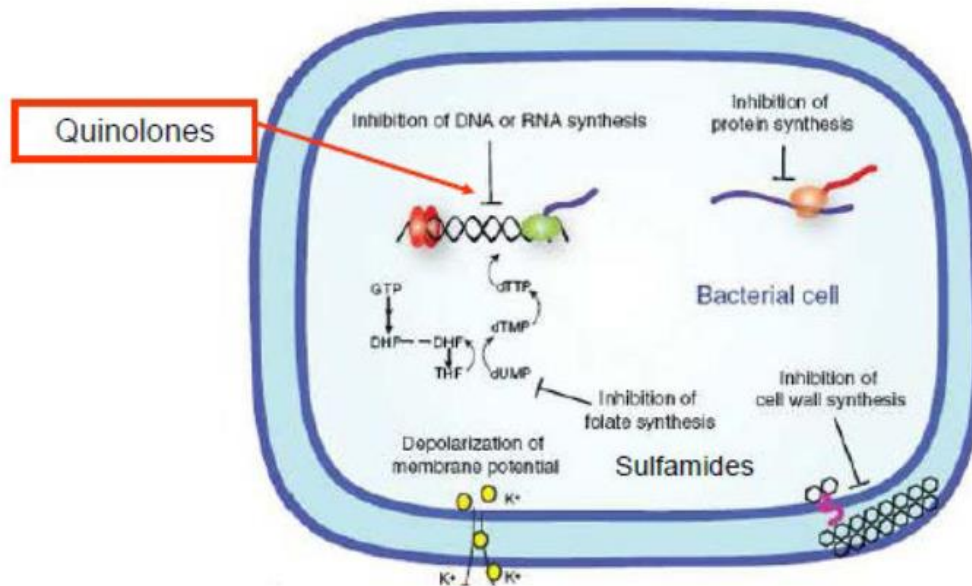


Figure 7 : mécanismes de résistances aux quinolones (BOUTIBA et BEN BOUBAKER, 2012).

➤ Résistance des antibiotiques vis-à-vis les rifampicines

La rifampicine appartient à la famille des ansamycines de type naphthalène, est un dérivé semi-synthétique de la rifampicine B, elle inhibe la croissance bactérienne en se liant à la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (RpoB) et en empêchant l'initiation de la transcription (WEHRLI *et al*, 1968). La plupart des résistances à la rifampicine résultent de mutations de sites spécifiques dans le gène codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase, ce qui réduit l'affinité de la rifampicine pour la polymérase. Des mutations du RpoB responsables de la résistance à la rifampicine ont été identifiées chez de nombreuses et diverses espèces de bactéries. Des études suggèrent que la résistance à la rifampicine découle de l'exposition du commensal microbiote à cet antibiotique pendant le traitement des autres infections bactériennes (KRISTICH *et al*, 2014).

➤ **Résistance des entérocoques vis-à-vis la daptomycine**

La daptomycine est un antibiotique lipopeptidique avec une puissante activité bactéricide contre les bactéries à Gram positif. La résistance des Entérocoques contre la daptomycine est assurée par deux mécanismes qui sont :

Le premier, caractérisé chez *Enterococcus faecalis*, est le détournement de l'antibiotique du septum par redistribution des microdomaines de cardiolipine loin du plan de division au niveau du septum. Contrairement aux souches sensibles, la daptomycine est incapable de se fixer au niveau du septum, site de fixation préférentiel, sur les souches résistantes. La fixation se fait alors en périphérie de la bactérie, rendant la daptomycine inefficace (TRAN *et al*, 2013).

Le deuxième mécanisme, observé chez *E. faecium*, est la répulsion électrostatique du complexe daptomycine / calcium chargé positivement de la membrane cellulaire. Plusieurs gènes peuvent être impliqués dans ce mécanisme (MILLER *et al*, 2014).

➤ **Résistance des entérocoques vis-à-vis les oxazolidines**

L'antibiotique le plus connu qui représente ce groupe est le linézolide, qui montre une activité antimicrobienne élevée contre les bactéries à Gram positif (DIEKEMA, 2001). Des mutations dans la sous-unité ribosomale 23S confèrent une résistance à cet antibiotique. Les niveaux de résistance dépendent du nombre d'allèles pour les gènes d'ARNr mutés. Les souches résistantes au linézolide peuvent aussi présenter une Co-résistance à d'autres antibiotiques tels que la vancomycine, l'ampicilline, les macrolides, les fluoroquinolones, le chloramphénicol, la rifampicine, la gentamicine et d'autres antibiotiques (JONES *et al*, 2002).

Partie expérimentale

Chapitre I : matériel et méthode

But de cette étude

Les objectifs principaux de cette étude sont l'isolement des souches d'*Enterococcus spp* à partir du portage intestinal chez le poulet de chair, également l'étude de la sensibilité des isolats vis-à-vis d'un panel de molécules d'antibiotiques utilisées en thérapeutique vétérinaire et humaine, dans le but de prévoir l'existence des souches résistantes à la vancomycine (ERVA), et enfin rechercher des facteurs de virulence, à savoir l'hémolyse, la gélatinase et la capacité des souches à former des biofilms *in vitro*.

Durée et lieu d'étude

L'étude microbiologique s'est déroulée du mois de février au mois de juin 2022 au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie analytique et de Biotechnologie (LABAB) au sein de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1 Matériel

Le tableau suivant montre le matériel utilisé lors de la réalisation de la partie expérimentale au niveau du laboratoire.

Tableau 1 : matériel utilisés lors de la partie expérimentale

Appareils	Verreries	Outils	Matériels biologiques
-Autoclave (pbi international, Italie)	-Tubes à essai	-Micropipettes (1000µl et 100µl)	-Souches de références :
-Bain Marie (Memmert, Allemagne)	-pipettes Pasteur	-Microplaque	<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM00009.
-Vortex (Heidolph, Allemagne)	-Eprouvettes	-Embouts stériles	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
-Etuves (Memmert, Allemagne)	-Flacons	-Anse à boucle	
-Spectrophotomètre (Medline, Grande Bretagne)	- Lames	-Boites de Pétri	
-Séchoir (Gerhardt, Germany)	-Pipettes graduées	-Eppendorf	
-Réfrigérateur (Maxipower, Algérie)	-Bécher	-Cryotubes	
-Lecture ELISA		- Seringues	
		- Ecouvillons	
		-Pince métallique	
		-Bec bunsen	

Milieux de culture et réactifs

Gélose BEA (Biokar, France)

Bouillon Muller-Hinton (Biokar diagnostics, France)

Bouillon coeur-cervelle (Biokar diagnostics, France)

Gélose au sang (humain ou animal)

Bouillon TSB+ 1% Glucose

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

Eau physiologique stérile et eau distillée stérile

Violet de Gentiane, Lugol, alcool, fushine

Glycérol

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

Tampon phosphate salin (PBS), Méthanol, Ethanol, Crystal violet (0.1%)

2 Collecte des prélèvements

Au cours de cette étude nous avons réalisé 185 prélèvements rectaux chez le poulet de chair, au niveau de trois abattoirs de la wilaya de Tizi-Ouzou.

Ces prélèvements proviennent de différents élevages de plusieurs régions sachant que 10 à 11 prélèvements ont été effectués dans chacun et ils sont repartis comme suit :

Tableau 2 : répartition des différents points d'abatage ainsi le nombre de prélèvements effectués dans le cadre de la réalisation de l'étude

Abattoirs	Période de réalisation	Nombre de prélèvement
Draa Ben Khedda	06 Mars à 8H00	61
Tala Athmane	17 Avril à 8H00	62
Tizi Rached	08 Mai à 8H00	62

3 Analyses microbiologiques**3.1 Prélèvement et Enrichissement**

Le prélèvement est effectué en introduisant de 2 à 3 cm un écouvillon stérile dans le sphincter anale, suivi de mouvement de rotation contre la muqueuse rectale, par la suite il faut retirer l'écouvillon qui porte une charge importante de micro-organismes pour augmenter les chances d'avoir des résultats positifs vis-à-vis les entérocoques.

L'écouvillon ainsi recueilli est mis dans le bouillon Muller Hinton qui est un milieu liquide non sélectif d'une concentration en NaCl de 6,5% (Milieu d'enrichissement) qui favorise le développement des entérocoques Réaliser une incubation des échantillons à 45° pendant 24 heures pour inhiber d'autres germes.

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

La gélose BEA permet la sélection des entérocoques grâce à la présence de deux agents sélectifs, l'azoture de sodium et la bile de bœuf. En effet, le premier agent inhibe la croissance de certaines bactéries à Gram négatifs. Tandis que, le deuxième celle des bactéries à Gram positif. Un ensemencement de ce milieu est réalisé à partir des tubes positifs du milieu d'enrichissement (bouillon MH). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies d'entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies noires ou grisâtres.

3.3 Purification des souches isolées

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

4 Identification des isolats

Le principe de l'identification repose sur l'étude morphologique et l'identification biochimiques des isolats.

4.1 Etude microscopique

Un frottis bactérien, préparé à partir des colonies obtenues en culture pures, puis fixé et colorés par la méthode de coloration de Gram selon les étapes suivantes :

- 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 ($G \times 1000$)

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

5 Identifications biochimique**5.1 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 (H_2O_2) formé au cours des réactions d'oxydation.

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.

5.2 Test de l'oxydase

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

disque qui contient un incolore, le N-diméthyl-paraphénylène diamine (PDA), en un dérivé rose violacé. Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles à Gram négatif.

5.3 Tolérance de la salinité et la thermorésistance

Les entérocoques sont capables de résister à une concentration de 6,5% de chlorure de sodium et à une température de 45°C pour la réalisation de ce test il, suffit de repiquer les cultures à tester sur du bouillon BHIB additionné de 6,5% de NaCl. Après incubation à 45°C pendant 24 heures la lecture se traduit par l'apparition d'un trouble bactérien. Néanmoins, les entérocoques capables de résister à la chaleur. Ce test repose sur l'ensemencement des entérocoques sur un bouillon BHIB et le mettre dans un bain marie pendant 30min puis, on incube à 37°C. les résultats traduits par l'apparition d'un trouble.

5.4 Dégradation de l'esculine

L'esculine est un hétéroside, son hydrolyse est catalysée par une β - Glucosidase et l'esculinase, libère 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 qui est lié à la dégradation de l'esculine par les souches d'entérocoques.

6 Caractérisation phénotypique des souches isolées

6.1 Test de la gélatinase

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

6.2 Test de l'hémolyse

L'un des caractéristiques des entérocoques est la dégradation des composants du sang, la souche est hémolytique. Pour la réalisation de ce test nous avons utilisé de la gélose au sang frais.

Les souches ainsi à tester sont repiquées sur cette gélose. L'apparition d'une zone claire autour des colonies est un signe direct de l'hémolyse.

7 Formation de biofilms *in vitro*

La détermination quantitative de la formation de biofilms dans les microplaques à 96 puits est basée sur la mesure colorimétrique du cristal violet fixé par les cellules sessiles. Cette méthode a été réalisée selon le protocole décrit par ACHEK *et al* (2020), avec quelques modifications.

Brièvement, quelques colonies d'*Enterococcus* ont été inoculées dans 5 ml de TSB +1% glucose, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h. Les suspensions bactériennes obtenues ont été ensuite diluées à 1/50 avec du bouillon TSB-1% glucose. Ainsi, 200µl de la suspension bactérienne diluée ont été transférés dans un puit d'une microplaque en polystyrène à 96 puits, trois puits sont réservés pour chaque souche. Le TSB-1% glucose a servi de contrôle négatif. Tandis que, la souche de *S. aureus* ATCC 25923 a servi de contrôle positif. La micro plaque est recouverte puis incubée à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation, le contenu des puits a été délicatement retiré et lavé avec 200µl du tampon phosphate salin (PBS). Les cellules bactériennes adhérentes ont été fixées avec du méthanol pendant 15 min et colorées avec du cristal violet à 0,1 % (150µl /puits) pendant 15 min. Trois lavages doux ont été appliqués pour éliminer l'excès du colorant. Le cristal violet fixé a été solubilisé en ajoutant dans chaque puit 150µl d'éthanol à 96 %. La microplaque est couverte et maintenue sans agitation pendant 30 min. La mesure de la densité optique (DO) a été réalisée à 560nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

L'interprétation de la production de biofilm a été faite selon les critères décrits par Achek *et al* (2020), les souches ont été classées comme suit :

Tableau 3 : Classification de l'adhésion des *Staphylocoque spp* (ACHEK *et al.*,2020).

Valeur de la DO	Formation de biofilm
ODs < ODc	Non formatrice
ODc < ODs < 2 ODc	Faible
2 ODs < ODc < 4 ODc	Modérée
ODs > 4 ODc	Forte

ODs : la valeur moyenne de la densité optique pour chaque souche.

ODc : Cut-off value, avec ODc = valeur moyenne de la densité optique du control négatif + 3 fois l'écart type du contrôle négatif.

OD negative control = la valeur moyenne de la densité optique pour chaque témoin négatif (cette valeur est calculée pour chaque microplaque lors de chaque essai).

8 Antibiorésistance des souches isolées

L'antibiogramme est une technique de laboratoire qui a pour but de déterminer le profil de sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité a été testée par la méthode de diffusion des disques sur Muller-Hinton. Les souches d'entérocoques isolées ont été soumises à une liste de molécules d'antibiotiques. L'interprétation des résultats a été faite selon le manuel du CLSI (2020).

Les souches isolées d'entérocoque sont repiquées sur le milieu BEA, et incubées pendant 18 heures à 37°C pour avoir des cultures jeunes. Des suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau physiologique. La densité optique de la suspension bactérienne est comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de $\lambda=625\text{nm}$. L'antibiogramme est réalisé par l'ensemencement de la suspension bactérienne sur les boîtes du milieu Muller-Hinton par des écouvillons stériles, en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la gélose. Par la suite,

des disques d'antibiotiques sont appliqués sur la surface de la gélose Mueller-Hinton, préalablement ensemencée.

L'incubation des boîtes est 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.

Tableau 4 : Liste des antibiotiques à testés.

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge
B-lactamines	Pénicilline G	P	10
	Ampicilline	AMP	10
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30
	Téicoplanine	TEC	30
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
Phénicolos	Chloramphénicol	C	30
Macrolides	Erythromycine	E	15
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5
Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique	Sulfaméthoxazole	SXT	25

9 Conservation des souches analysées

La conservation des souches d'entérocoques s'effectue après les avoir identifiées et codifiées, de sorte que ces dernières seront toutes repiquées sur des bouillons BHIB puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Par la suite un volume de cette suspension bactérienne sera additionné de deux volumes de glycérol dans des cryotubes qui seront maintenus à -20°C dans le but de la conservation à long terme.

Chapitre II : Résultats et discussions

Résultats

1 Prévalences des entérocoques chez le poulet de chair

Durant la période s'étalant du mois de mars au mois mai 2022, 185 échantillons ont été prélevés au niveau de trois abattoirs de la wilaya de Tizi Ouzou et soumis à la recherche des entérocoques chez le poulet de chair. Sur la totalité des échantillons analysés, 103 échantillons contenaient des colonies caractéristiques d'Enterococcus. Tandis que, 79 échantillons étaient négatifs. Après identification biochimique des isolats, 60 échantillons sont confirmés positifs par le genre Enterococcus, soit une prévalence de 32.43%.

Tableau 5 : Prévalence des souches d'entérocoques selon les abattoirs.

Abattoirs	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs par <i>Enterococcus spp</i>	Prévalences
Draa Ben Khedda	61	19	31.14%
Tala Athmane	62	22	35.48%
Tizi Rached	62	19	30.64%
Total	185	60	32.43%

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 de 9 antibiotiques. L'analyse des résultats obtenus a montré des fortes résistances vis-à-vis de la tétracycline (86.66%) et de l'érythromycine (53.33%). Des résistances relativement faibles sont enregistrées à l'encontre de la pénicilline, l'ampicilline, la ciprofloxacine et de l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole, avec des taux de 33.33%, 31.66%, 23.33%, 20%, respectivement. Une seule souche est résistante vis-à-vis la teicoplanine. En revanche, aucune souche résistante à la vancomycine n'est observée dans cette étude (Tableau 6).

Tableau 6 : Résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques testés (n=60).

Antibiotiques	Sensibles	Intermédiaires	Résistantes
	Nombre (%)	Nombre (%)	Nombre (%)
PEN	23 (38.33%)	17 (28.33%)	20 (33.33)
AMP	41 (68.33%)	0 (0%)	19 (31.66%)
VAN	60 (100%)	0(0%)	0(%)
TEC	58 (96.66%)	1(1.66%)	1 (1.66%)
ERY	20 (33.33%)	8(13.33%)	32 (53.33%)
TET	5 (8.33%)	3 (5%)	52 (86.66%)
CIP	26 (43.33%)	20 (33.33%)	14 (23.33%)
CHL	55 (91.66%)	2 (3.33%)	3 (5%)
SXT	48(80%)	0 (0%)	12 (20%)

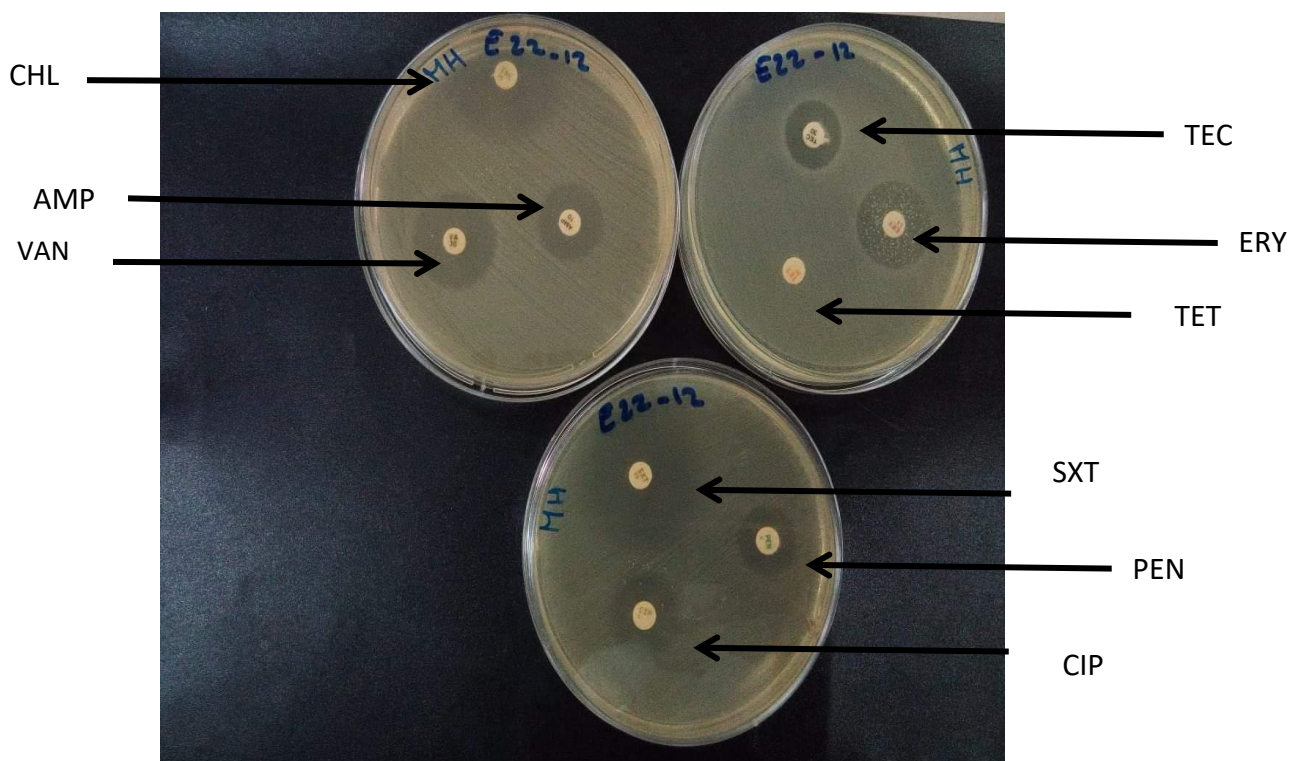


Figure 8 : Profil de résistance de la souche *Enterococcus* spp (E22-12).

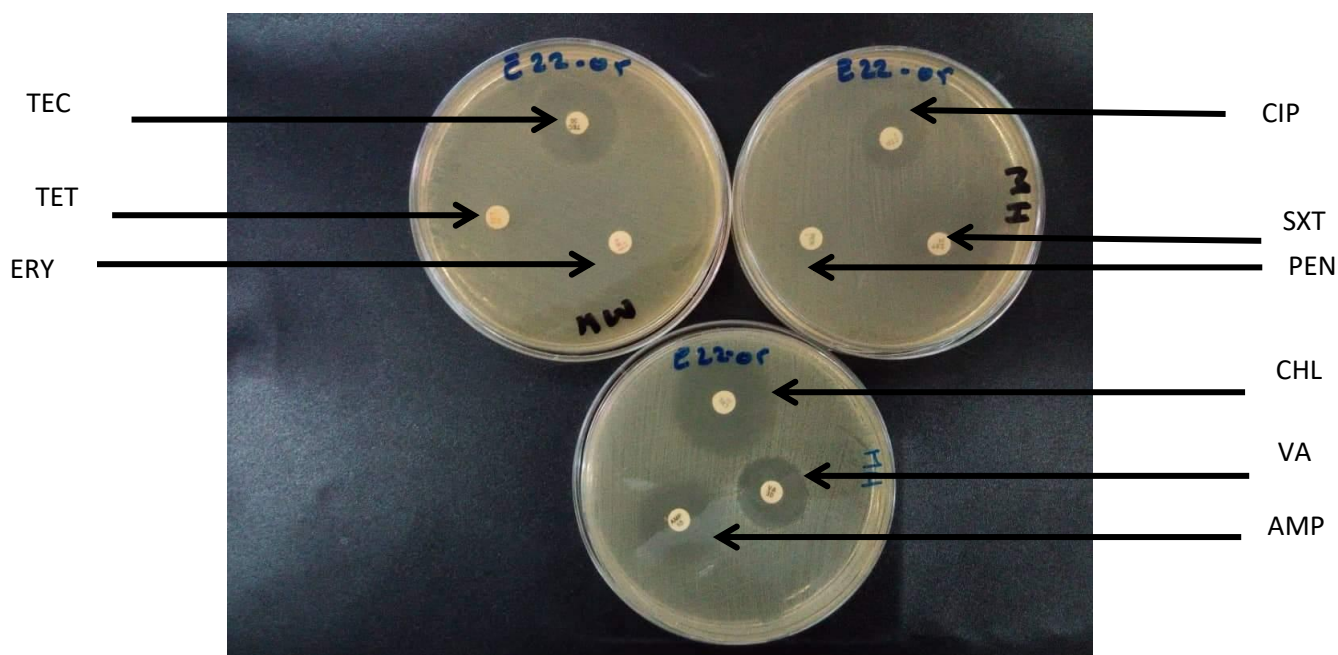


Figure 9 : Profil de résistance de la souche *Enterococcus spp* (E22-05).

3 Phénotypes de multirésistance

Afin de déterminer les phénotypes de multirésistance des *Enterococcus*, nous avons déterminé d'abord le profil de résistance de chacun souche isolée et nous avons pu ressortir les souches multirésistantes. Les résultats des profils de multirésistance est illustré dans le Tableau 8.

Tableau 7 : Phénotypes de résistance des souches d'entérocoques isolées.

Profil de multirésistance	Nombre de souches
TET- ERY- PEN	10
TET- ERY- PEN -AMP	7
TET-ERY-PEN-AMP-CIP-SXT	5
TET-ERY-CIP-SXT	2
TET-ERY-CIP	2
TET-ERY-AMP-CHL-SXT	1
TET-ERY-AMP-CIP-PEN	1
TET-ERY-PEN-CIP	1
TET-ERY-PEN-AMP	1
SXT, TET-ERY-PEN-CHL	1
TET-ERY-CIP-CHL-SXT	1
TET-ERY-CIP-CHL	1
TET-ERY-CIP	1
TET-AMP-ERY-SXT	1
TET-PEN-SXT	1

4 Facteurs de virulences

4.1 Recherche de la gélatinase

Les résultats de la recherche de la gélatinase dans notre étude montrent que huit souches testées dégradent la gélatine, Soit une fréquence de 13.33%.

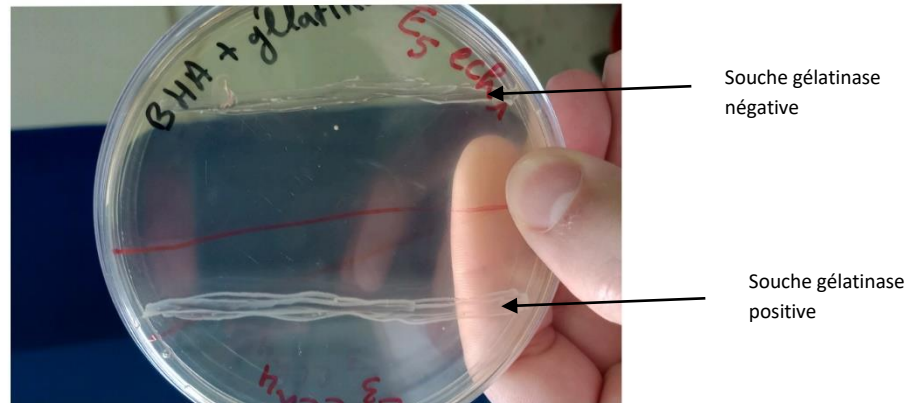


Figure 10 : Résultat de test de la gélatinase.

4.2 Recherche de l'hémolyse

Dans notre étude montrent-Uniquement trois (5%) souches d'*Enterococcus* spp sont β -hémolytiques.

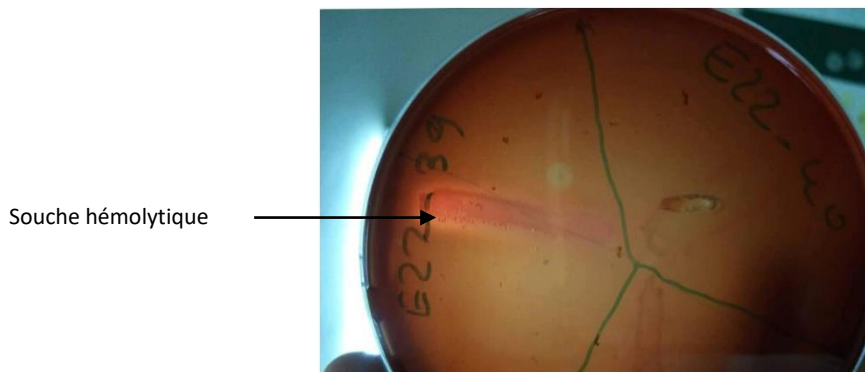


Figure 11 : Résultat du test de l'hémolyse (E22-39).

4.3 Formation de biofilm sur microplaque

Les souches identifiées ont été soumises à l'étude de leur capacité à former des biofilms sur des microplaque ELISA. Les résultats obtenus ont montré que 54 (90%) souches sont capables de former des biofilms *in vitro*. En revanche, 6 (10%) souches sont non-

formatrices. Cette capacité de formation est variable d'une souche à une autre. En effet, plus de la moitié des souches, 38 (70.37%), ont une faible formation. 15 (27.77%) souches ont une formation moyenne. Tandis que, seulement une seule (1.85%) souche avait une forte formation (Tableau 8).

- **Tableau 8** : Capacité des souches d'*Enterococcus* à former des biofilms (n=60).

	Nombre de souches testés							
	Non Formatrice		Faiblement Formatrice		Moyennement Formatrice		Fortement Formatrice	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Souche <i>Enterococcus</i>	06	10%	38	70,37%	15	27.77%	01	1.85%
TOTAL	60							

Discussions

La prévalence des entérocoques dans nos échantillons analysés est relativement élevée. En effet, sur 185 échantillons testés, 34.43% sont contaminés. Cette fréquence d'isolement est faible à celle rapportée par NGBEDE *et al* (2017), qui ont annoncé une prévalence de l'ordre de 64.6% dans le fumier du poulet en Nigéria. En turque, KASIMOGLU-DOGRU *et al* (2010) ont rapporté un taux d'isolement d'*Enterococcus* de 78.3% sur la peau des coux de poulets de chair. ASLANTAS (2019) a obtenu un taux de 78.1%, sur un total de 430 écouvillonnages cloacaux chez le poulet de chair.

La caractérisation phénotypique des souches d'*Enterococcus*, nous a permis de mettre en évidence quelques facteurs de virulence chez les souches isolées. Nos résultats ont montré que seulement 5% des souches testés sont β -hémolytiques. Notre résultat ne corrobore pas avec celui de NGBEDE *et al* (2017), qui ont montré que 14.6% des souches sont capables de produire des hémolysines. Dans l'étude menée par SEMEDO-LEMSADDEK *et al* (2021), aucune souche d'*Enterococcus* hémolytique n'est détectée.

Dans cette étude 13.33% des souches sont considérées comme gélatinases positives. Notre résultat ne rejoint pas ceux de plusieurs auteurs qui ont signalé des taux élevés de souches d'*Enterococcus* productrices de gélatinases (DIARRA *et al*, 2010 ; ASLANTAS, 2019 ; OSMAN *et al*, 2019). En revanche, NGBEDE *et al* (2017) ont rapporté un taux faible de l'ordre de 10.6%. Notons que la gélatinase est une sérine protéase, dont le rôle principal est

de fournir des nutriments aux bactéries en dégradant les tissus de l'hôte. De plus, la gélatinase a un rôle important dans l'élimination des protéines mal repliées (RAMOS *et al*, 2020).

Nos résultats ont montré que presque la totalité (90%) des souches isolées ont la capacité de former des biofilms *in vitro*, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par DIARRA *et al* (2010), qui ont montré qu'aucune souche n'est capable de former des biofilms. En revanche, OSMAN *et al* (2019) ont rapporté que toutes les souches d'*Enterococcus* isolées avaient la capacité de former des biofilms. Dans les environnements de transformation des aliments, la formation des biofilms par les entérocoques, pourrait être porteur de facteurs de virulence et même de gènes de résistance aux antibiotiques. Pour cela, les producteurs doivent nettoyer et désinfecter le matériel et les instruments afin d'éviter l'adhérence des souches virulentes et leur transmission lors des process technologiques (BARBOSA *et al*, 2010).

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 sensibles à la pénicilline (38.33%) et à l'ampicilline (68.33%). Nos résultats rejoignent ceux de ASLANTAS (2019) et KASIMOGLU-DOGRU *et al* (2010), qui ont rapporté des faibles résistances vis-à-vis de l'ampicilline et de la pénicilline, respectivement. En revanche, de fortes résistances vis-à-vis de l'ampicilline ont été observées par certains auteurs (NGBEDE *et al*, 2017 ; MOLECHAN *et al*, 2019 ; OSMAN *et al*, 2019).

De fortes résistances ont été observées vis-à-vis de la tétracycline et de l'érythromycine. Nos résultats corroborent avec ceux de plusieurs auteurs (MOLECHAN *et al*, 2019 ; OSMAN *et al*, 2019 ; ASLANTAS, 2019 ; SEMEDO-LEMSADDEK, 2021). L'utilisation excessive et incontrôlée d'antimicrobiens en production animale favorise la sélection et l'émergence des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Les tétracyclines et les macrolides sont les antibiotiques les plus utilisées. En effet, ils font un bon marché, facilement utilisables en production animale, parfois sans aucune consultation des vétérinaires praticiens (NGBEDE *et al*, 2017).

Les résultats de cette étude montrent l'existence d'une seule souche d'*Enterococcus* résistante au glycopeptides (téicoplanine). Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs auteurs qui ont signalé la présence d'entérocoques résistants aux glycopeptides chez la volaille (OSMAN *et al*, 2019 ; MOLECHAN *et al*, 2019 ; ASLANTAS, 2019). L'avoparcine n'a jamais été utilisée en Algérie (BOURAFI *et al*, 2016). La colonisation par des souches

d'entérocoques résistantes à la vancomycine été rapportée en milieu hospitalier et chez des personnes hospitalisées (DJAHMI *et al*, 2012 ; BOURAFI *et al*, 2016 ; BENAMROUCHE *et al*, 2021 ; ZERROUKI *et al*, 2021). Par conséquent, la propagation des souches résistantes à la vancomycine du milieu hospitalier ne peut pas être exclue.

Quant aux autres molécules d'antibiotiques (chloramphénicol (3%), ciproflaxine (14%) et le sulfaméthoxazole (12%)), de faibles taux de résistances ont été aussi rapportés Par NGBEDE *et al* (2017). Selon TORRES *et al* (2018), les fluoroquinolones n'ont jamais été utilisés comme promoteurs de croissance, néanmoins leur utilisation en thérapeutique vétérinaire est commune.

Conclusion

Conclusion

Cette étude avait comme objectifs : l'isolement des entérocoques à partir du portage intestinal chez le poulet de chair et la caractérisation phénotypique des isolats, via la mise en évidence de quelques facteurs de virulence tels que l'hémolyse, la gélatinase, la formation de biofilm et l'étude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques. Les résultats de cette étude ont montré une prévalence relativement faible des *Enterococcus* chez le poulet de chair, qui est de 32.34%.

L'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis quelques de molécules d'antibiotiques a révélé l'existence de fortes résistances vis-à-vis de l'érythromycine et de la tétracycline. De faibles résistances à l'encontre des autres antibiotiques (le sulfaméthoxazole, ciprofloxacine, pénicilline, ampicilline le chloramphénicol) ont été observées. En revanche, une souche résistante aux glycopeptides a été détectée. Des souches β -hémolytiques et productrices de gélatinase ont été observées. Presque la totalité (90%) des souches avaient la capacité de former des biofilms *in vitro*. Ce travail indique la nécessité d'un contrôle continue de l'utilisation des antibiotiques au sein de la production animal, compte tenu du rôle que ces molécules exercent dans la sélection de bactéries multi-résistantes.

Cette étude pourra avoir comme perspectives :

- L'identification des souches isolées par le biais de PCR ou de technique rapide (MALDI TOF MS) ;
- Recherche des gènes de résistances par des PCRs

Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches isolées contre certaines bactéries pathogènes.

Références bibliographiques

- **Aarestrup Fm, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen Lb (2000).** Comparison Of Antimicrobial Resistance Phenotypes and Resistance Genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Humans in The Community, Broilers, And Pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 37:127-37.
- **Aguilar-Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain, J, Campos D, Thonart P (2012).** « Les Entérocoques : Avantages Et Inconvénients En Biotechnologie (Synthèse Bibliographique). », *Biotechnol. Agron. Soc. Environ,* 16(1), 67-76.
- **Ahmed, M.O, K.E. Baptiste (2018).** Vancomycin-resistant enterococci : A review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microb. Drug. Resit.* 24(5) : 590-606.
- **Andrewes F, Horder J (1906).** A Study of Streptococci Pathogenic for Man. *The Lancet.* 168 (4335) :852–855.
- **Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F, (2001).** Phenotypic And Genetic Diversity of Enterococci Isolated from Italian Cheeses. *Journal Of Dairy Research* 68, 303– 316.
- **Arias C, Murray E, (2016).** «The Rise of The Enterococcus: Beyond Vancomycin Resistance. », *Nat Rev Microbiol;* 10(4):266–278.
- **Arsène S, Leclercq R (2007).** Role Of a Qnr-Like Gene in The Intrinsic Resistance of *Enterococcus faecalis* to Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 51 :3254–8
- **Bergogne-Berezin.1999.** « Fosfomycine Et Dérivées. In : Bryskier, A Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongique », Ellipses, Paris. P 1216.
- **Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif K, Franz C.M.A.P, Holzapfel W.H, Perez-Pulido R, Martinez-Canamero M., Galvez A (2004).** Functional And Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Systematic And Applied Microbiology* 27, 118– 130.
- **Benjamin Bonnard, Ernesto Martínez-Martínez, Amaya Fernández-Celis, Marie Pieronne-Deperrois, Quoc-Tuan Do, Isbaal Ramos, Patrick Rossignol, Faiez Zannad, Paul Mulder, Antoine Ouvrard-Pascaud, Natalia López-Andrés & Frédéric Jaisser. (2020).** Antifibrotic Effect of Novel Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Inhibitors in Cardiac and Renal Disease Models-*Scientific Reports-* Volume 11, 2591.
- **Bhardwaj A, Malik K, Chauhan P, (2008).** Functional And Safety Aspects of Enterococci in Dairy Foods. *Indian Journal of Microbiology,* 48, 317-325.

Références bibliographiques

- **Bockelmann W, (2002).** Development Of Defined Surface Starter Cultures for The Ripening of Smear Cheeses. *International Dairy Journal*, 12, 123– 131.
- **Borgmann S, Niklas D. M., Klare I, Zabel L. T, Buchenau P, Autenrieth I. B, & Heeg P, (2004).** Two Episodes of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Outbreaks Caused by Two Genetically Different Clones in A Newborn Intensive Care Unit. », *Int J Hyg Environ Health*, 207,386–389.
- **Bortolaia V, Guardabassi (2015).** Zoonotic transmission of antimicrobial resistant enterococci : A threat to public health or an overemphasised risk ? In : Sing, A. (Eds), *Zoonoses- Infections affecting humans and animals, Focus on public health aspects*. Springer Link, pp. 407-431.
- **Bryskier A, (1999).** Antibiotiques, Agents Antibactériens et Antifongiques. Ellipses, p.101.
- **Buydens P, & Debeuckelaere S, (1996).** Efficacy Of Sf 68 In the Treatment of Acute Diarrhea. A Placebo-Controlled Trial. *Scand J. Gastroenterol*, 31(9), 887-891.
- **Carip C, Salavert H, Tandeau A, (2015).** Microbiologie, Hygiène et Droit Alimentaire. Lavoisier, 107-109pp.
- **Casadevall A, Pirofski L, (2001).** Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence», *J. Infect. Dis*, 184 :337-344.
- **Casalta E, Zennaro R, (1997).** Effect Of Specific Starters on Microbiological, Biochemical and Sensory Characteristics of Venaco, A Corsican Soft Cheese. *Sciences des Aliments* 17, 79– 94.
- **Centeno J.A, Menendez S, Hermida M.A, Rodri'Guez-Otero, J.L, (1999).** Effects Of the Addition of *Enterococcus Faecalis* in Cebreiro Cheese Manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 48, 97– 111.
- **Champagne C, & 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 & Francis Group, 71-88.
- **Chandler Jr, Hirt H, Dunny G.m, (2005).** A Paracrine Peptide Sex Pheromone Also Acts as An Autocrine Signal to Induce Plasmid Transfer and Virulence Factor Expression *in vivo*. *PNAS*, 102, 43.
- **Chantalmolechanadaniel G, Amoakoabakebe Luther Kingabiaanou M, Somboroablinda A, Besterbsabiha Y, Essacka, (2021).** Molecular Epidemiology of Antibiotic-Resistant *Enterococcus* spp. From The Farm-To-Fork Continuum in Intensive Poultry Production in Kwazulu-Natal, South Africa. *Science of The Total Environment- Volume 692(20)*, 868-878.

Références bibliographiques

- **Chow J.W, Thal L. A, Perrin M. B, Vazquez J. A., Donabedian S. M., Clewell D. B, & Zervos M. J, (1993).** Plasmid-Associated Hemolysin and Aggregation Substance Production Contribute to Virulence in Experimental Enterococcal Endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(11), 2474-2477.
- **Clewell Db, (1993).** Bacterial Sex Pheromone-Induced Plasmid Transfer. *Cell*, 73:9- 12.
- **Coppola T.M, Parente J.E, Dumontet S, La Peccerella A, (1988).** The Microflora of Natural Whey Cultures Utilized as Starters in The Manufacture of Mozzarella Cheese from Water Buffalo Milk. *Lait*, 68, 295– 310.
- **Coque T.M, Patterson J. E, Steckelberg J. M, Murray B. E, (1995).** Incidence Of Hemolysin, Gelatinase, And Aggregation Substance Among Enterococci Isolated from Patients with Endocarditis and Other Infections and From Feces of Hospitalized and Community-Based Persons. *Journal Of Infectious Diseases*, 171, 1223–1229
- **Cotter P.D, Hill C, & Ross R.P, (2005).** Bacteriocins: Developing Inmate Immunity for Food. *Nature Microbiology Reviews*, 3, 777 -778.
- **De Vuyst L, Foulqui E, Moreno M R, & Revets, H, (2003).** Screening For Enterocins and Detection of Hemolysin and Vancomycin Resistance in Enterococci of Different Origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 299-318.
- **Devriese L, Van De Kerckhove A, Kilpper-Bälz R, & Schleifer K, (1987).** Characterization And Identification of *Enterococcus* Species Isolated from The Intestines of Animals. *Int. J. Syst Bacteriol*, 37(3), 257-259.
- **Diekema Dj, Jones Rn (2001).** Oxazolidinone Antibiotics. *Lancet*, 358 : 1975-1982.
- **Dogru K, Ayaz D, Gencay E, (2010).** Identification and Antimicrobial Resistance Profiles of Salmonella Spp. Isolated from Chicken Carcasses. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 893–897.
- **Dortu C, & Thonart P, (2009).** Les Bactériocines des Bactéries Lactiques : Caractéristiques et Intérêts pour la Bioconservation des Produits Alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13, 143-154.
- **Dovat A.M, Reinbold G.W, Hammond E.G, Vedamuthu E.R, (1970).** Lipolytic And Proteolytic Activity of Enterococci and Lactic Acid Group Streptococci Isolated from Young Cheddar Cheese. *J. Milk Food Technol*, 33, 365– 372.
- **Dramsi S, Trieu-Cuot P, & Bierne H, (2005).** Sorting Sortases: A Nomenclature Proposal for The Various Sortases of Gram-Positive Bacteria. *Research in Microbiology*, 156, 289-297.

Références bibliographiques

- Drasar, B., Hill, M. (1974). The Distribution of Bactérial Flora in The Intestine, In Press A, Ed Human Intestinal Flora. », Chapitre 3, London: Acadimie Press, 6-43.
- **Durlu-Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tunail N & Litopoulou-Tzanetaki E, (2001).** Technologically Important Properties of Lactic Acid Bacteria Isolate from Beyaz Cheese Made from Raw Ewes' Milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 861–870.
- **Dutronc, H., Bocquentin, F., Galperine, T., La Farie-Castet, S., Dupon, M. (2005).** Linézolide, Premier Antibiotique De La Famille Des Oxazolidinones ». *Médecine et Maladies Infectieuses*, 35(9), 427-434
- **Fernández M, (1983).** Olives. In: Rehm H. & Reed G., Eds. *Biotechnology. Vol. 5. Food And Feed Production by Microorganisms*». Weinheim, Deutschland: Verlag Chemie, 379-397.
- **Fiore E, Van Tyne D, Gilmore Ms, (2019).** Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectrum*. 7(4).
- **Fisher K, & Philips C, (2009).** The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749–1757.
- **Foulqui E, Moreno M. R, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, & 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 Cmap, Huch M., Abriouel H, Holzapfel W, And Galvez A, (2011).** Enterococci As Probiotics and Their Implications in Food Safety” *International Journal of Food Microbiology*, 151 (2), 125–140.
- **Gaudy, C & Buxeraud, J (2005).** Antibiotiques : Pharmacologie Et Thérapeutique. Elsevier, 2005, p216-219.
- **Georgios Pavlakos, Vasileios Choutas, Nima Ghorbani, Timo Bolkart, Ahmed A. A, Osman Dimitrios Tzionas, Michael J. Black, (2019).** Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), Pp. 10975-10985.
- **Gilmore M., Clewell D.B, Courvalin P, Dunny G, Murray B.E, Rice L.B, (2002).** Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci.
- **Giraffa G, (2003).** Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.

Références bibliographiques

- **Gournier-Chateau N, Larpent J.P, Castellanos M. I, Larpent J. L, (1994).** Probiotiques En Alimentation Animale Et Humaine. Lavoisier, Paris.192p.
- **Hall A.e, Gorovits E.I, Syribeys P.j, Domanski P.j, Ames Br, Chang Cy, et al, (2007).** Monoclonal Antibodies Recognizing the *Enterococcus faecalis* Collagenbinding Mscramm Ace: Conditional Expression and Binding Analysis. *Microb Pathog*, 43(2-3), 55–66.
- **Hanchi H, Mottawea W, Sebei K And Hammami R, (2018).** The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9 :1791.
- **Hawkey P, (2003).** Mechanisms Of Quinolone Action and Microbial Response. *J Antimicrobe Chemother.* 51(1), 29–35.
- **Huycke M., Spiegel C, & Gilmore M, (1991).** Bacteremia Caused by Hemolytic, High-Level Gentamicin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob, Agents Chemother*, 35(8), 1626-1634.
- **Jensen L. B, Frimodt-Moller N, Aarestrup F.M, (1999).** Presence Of Erm Gene Classes in Gram-Positive Bacteria of Animal and Human Origin in Denmark». *FEMS Microbiol Lett*, 170:151–158.
- **Jett B, Huycke M, & Gilmore M, (1994).** Virulence Of Enterococci. *Clinical Microbiology. Reviews*, 7(4),462-478.
- **Jones R, Della-Latta P, Lee L, Biedenbach D, (2002).** Linezolid Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from A Patient Without Prior Exposure to An Oxazolidinone: Report from The Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 42: 137-139.
- **Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, (2001).** Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *International Dairy Journal* 11, 621– 647.
- **Kalina A.P, (1970).** The position of Enterococci in the System of Microorganisms. *Zh Mikrobiol 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. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 255-262.
- **Klaenhammer T. R, (1988).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie*, 70, (3), 377-349.
- **Klaenhammer,T. R, (1993).** Genetic of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12, 39-86.
- **Klein G, (2003).** Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and The Gastro-Ntestinal Tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88,123-131.

Références bibliographiques

- **Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al, (2021).** Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal*, 19(6), 6651.
- **Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al, (2021).** Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal*, 19(6), 6651.
- **Kristich Cj, Rice Lb, Arias Ca, (2014).** Enterococcal Infection — Treatment and Antibiotic Resistance Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Enterococci. In: Gilmore Ms, Clewell Db, Ike Y, Shankar N, Eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 6: 1–31.
- **Lavinge, (2007).** Antibiotiques et Résistance. *Bactériologie*. Faculté de Médecine De Montpellier.
- **Leblanc D, (2006).** « Enterococcus. Prokaryotes. », 4, 175-204.
- **Lebreton F, Manson A.L, Saavedra J.T, Straub T.J, Earl A. M, & Gilmore M.S, (2017).** Tracing The Enterococci from Paleozoic Origins to The Hospital. *Cell*. 169 (5), 849–861.
- **Leclerc H, Devriese L, & 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.
- **Leclercq R, (1997).** Enterococci Acquire New Kinds of Resistance. », *Clin Infect Dis*, 24(1), 9080-4.
- **López M, Del Campo T, Zarazaga M, Torres C, (2011).** Characterization Of the Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci of Different Origins. *Antimicrobial Chemotherapy*. 23 (2), 87-91.
- **Mac Govan A.P, Wise R, (2001).** Establishing Mic Breakpoint and The Interpretation Of *in vitro* Susceptibility Tests. *J. Antimicrob. Chemother*, 48, (1), 17-28.
- **Macedo A.C, Malcata F.X, (1997).** Role Of Adventitious Microflora in Proteolysis and Lipolysis of Serra Cheese: Preliminary Screening. *Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung Und -Forschung. A* 205, 25– 30.
- **Makinen Pl, Makinen Kk, (1994).** The *Enterococcus faecalis* Extra-Cellular Metalloendopeptidase. (Ec 3.4.24.30; Cocolysin) Inactivates Human Endothelin at Bonds Involving Hydrophobic Amino Acid Residues. *Biochem Biophys Res Commun*, 200 :981–985.
- **Marcinakova M, Simonova M & Laukova A, (2004).** Probiotic Properties of *Enterococcus faecium* Ef9296 Strain Isolated from Silage. », *Acta Vet. Brno*, 73, 513-519.

Références bibliographiques

- **Miller Wr, Munita Jm, And Arias Ca. (2014). Mechanisms Of Antibiotic Resistance in Enterococci.**
- **Mladenović K.G, Grujović M. Ž, Kocić-Tanackov S. D, Bulut S, Iličić M, Degenek J & Semedo-Lemsadde T, (2021).** Serbian Traditional Goat Cheese: Physico-Chemical, Sensory, Hygienic and Safety Characteristics. *Microorganisms*, 10(1), 90.
- **Monstein H. J, Quednau M, Samuelsson A, Ahrne S, Isaksson B, Jonasson J, (1998).** «Division Of the Genus *Enterococcus* into Species Groups Using Pcr-Based Molecular Typing Methods. », *Microbiology*, 144, 1171-1179.
- **Morea M, Baruzzi, F, Cocconcelli P.S, (1999).** Molecular And Physiological Characterization of Dominant Bacterial Populations in Traditional Mozzarella Cheese Processing. *J. Appl. Microbiol.* 87, 574– 582.
- **Murray B, (1990).** «The Life and Times of The *Enterococcus*. », *Clin. Microbiol. Rev.*, 3(1), 46-65.
- **Murray B.E, (1990).** The Life and Times of The *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 46–65.
- **Nadjette Bourafa, Wafaa Chaalal, Sofiane Bakour, Rym Lalaoui, Nafissa Boutefnouchet Seydina, M Diene, Jean-Marc Rolain, (20016).** Molecular Characterization of Carbapenemresistant Gram-Negative Bacilli Clinical Isolates in Algeria735–745.
- **Nallapareddy S. R, Qin X, Weinstock G. M, Hook M, & Murray, B. E (2000).** « *Enterococcus Faecalis* Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type Iv and Laminin as Well As Collagen Type I. »*Infection and Immunity*, 68, 5218-5224.
- **Nassima Djahmi, Catherine Dunyach-Remy, Alix Pantel, Mazouz Dekhil, Albert Sotto, &Jean-Philippe Lavigne (2012).***Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter Baumannii in Mediterranean Countries-305784. Doi: 10.1155/2014/305784.*
- **Neviani E, Mucchetti G, Contarini G, Carini S, (1982).** Ruolo Degli *Enterococchi* Nei Formaggi Italiani : I. Loro Presenza In Formaggi Di Monte E Impiego In Un Innesto Selezionato. *Latte* 7, 722– 729.
- **Ngbede E.O, Raji M.A, Kwanashie C.N, Kwaga J.K.P, (2017).** Antimicrobial Resistance and Virulence Profile of *Enterococci* Isolated from Poultry and Cattle Sources in Nigeria *Tropical Animal Health and Production*, 49, 451–458.

Références bibliographiques

- **Oumer B.A, Gaya P, Fernandez-Garcia E, Marciaca R, Garde S, Medina M, Nuñez M, (2001).** Proteolysis And Formation of Volatile Compounds in Cheese Manufactured with A Bacteriocin-Producing Adjunct Culture. *Journal Of Dairy Research* 68, 117–129.
- **Parente E, & Cogan T, (2004).** Starter Cultures: General Aspects. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1,123e148.
- **Pennemann F.L, Mussabekova A, Urban C, Stukalov A, Andersen L.L, Grass V, Lavacca T.M, Holze C, Oubraham L, Benamrouche F, Girardi E, Boulos R.E, Hartmann R, Superti-Furga G, Habjan M., Imler J.L, Meignin C, Pichlmair A, (2021).** Cross-Species Analysis of Viral Nucleic Acid Interacting Proteins Identifies Taoks As Innate Immune Regulators. *Nature Communications*, 12, 7009.
- **Pere P Simarro, Giuliano Cecchi, Massimo Paone, José R Franco, Abdoulaye Diarra, José A Ruiz, Eric M Fèvre, Fabrice Courtin, Raffaele C Mattioli & Jean G Jannin, (2010).** The Atlas of Human African Trypanosomiasis: A Contribution to Global Mapping of Neglected Tropical Diseases- *International Journal of Health Geographics*- Volume 9, Article Number: 57.
- **Pesavento G.C, Calonico B, Ducci A, Magnanini A, Lo Nostro (2014).** Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food. Microbiol.* 41 : 1-7.
- **Pimenta S, Scheidegger E. M, Dos Santos P. F, Leite P. C, Teixeira L. M, (2007).** « Antimicrobial Resistance Profiles of Enterococci Isolated from Poultry Meat and Pasteurized Milk in Rio De Janeiro, Brazil. », *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 102(7), 853-859.
- **Pinto , Pierotti R, Canale G& Reali D, (1999).** «Characterization Of ‘Faecal Streptococci’ As Indicators of Faecal Pollution and Distribution in The Environment. », *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 258-263.
- **Portenier I, Waltimo T.M.T, Haapasalo M, (2003).** Enterococcus Faecalis– The Root Canal Survivor And ‘Star’ In Post- Treatment Disease. *Endodontic Topics* (6), 135–159.
- **Pritchard G.G, Coolbear T, (1993).** The Physiology and Biochemistry of The Proteolytic System in Lactic Acid Bacteria. *Fems Microbiology Reviews* 12, 179– 206. Resistance in Enterococcus Faecium. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 3028- 3032.
- **Ramos, S., V. Silva, M.L.E. Dapkevicius, G. Igrejas, P. Poeta (2020).** Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. *Microorganisms*. 8 : 1118.
- **René H. Wijffels & Maria J Barbosa, (2010).** An Outlook on Microalgal Biofuels- *Science*- Vol. 329, No. 5993.
- **Rice A, (2004).** Impact Of Specific Pbp5 Mutations on Expression of Beta-Lactam

Références bibliographiques

- **Rice L. B , Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C Et Al. (2003).** A Potential Virulence Gene, Hylefm, Predominates in Enterococcus Faecium of Clinical Origin. The Journal of Infectious Diseases;187(3):508–512. [Pubmed: 12552437].
- **Rich C, Favre-Bonte S, Sapen, F, Joly B, & Forestier C, (1999).** «Characterization Of Enteroaggregative Escherichia Coliisolates. », Fems Microbiology Letters, 173, 55-61.
- **Sakka, V, S. Tsiodras L, Galani A, Antoniadou M, Souli I, Galani M, Pantelaki N, Sifakas L, Zerva H, Giamarellou (2008).** Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microbiol. Infect. 14(1) : 14-21.
- **Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, (2002).** Effect Of Enterococcus Faecium on Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Greek Feta Cheese. Int. J. Food Microbiol. 76, 93–105. 3.
- **Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki M.D, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, De Vuyst L, (2002).** Bacteriocin Production by Enterococcus Faecium Fair-E 198 In View of Its Application as Adjunct Starter in Greek Feta Cheese Making. International Journal of Food Microbiology 72, 125– 136. 3.
- **Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki M.D, Rea M.C, Lombardi A, Cogan T.M, Kalantzopoulos G & Tsakalidou E, (2001).** Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. Int. Dairy J. 11, 621–647.
- **Schleifer K.H, & Kilpper-Balz R, (1987).** « Molecular And Chemotaxonomic Approaches to The Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review». Syst. Appl. Microbiol. 10, 1– 19.
- **Schleifer K.Hn, & Kilpper-Balz 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. Bacteriol. 34, 31–34.
- **Selleck E.M, D.V, Tyne M.S, Gilmore (2019).** Pathogenicity of Enterococci. Microbiol. Spectr. 7(4).
- **Shankar, N; Lockatell, C.V; Baghdyan, A.S; Drochenbeg, C, Gilmore, M.S, Et Johnson, D.E, (2001).** Role Of *Enterococcus Fécalice* Surface Protein Espin the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection, Infect Ummun 69,4366-4372.
- **Sherman J. M, (1937).** «The Streptococci. » Bacteriological Reviews ;1(1) :3–97. [Pubmed: 16350049].

Références bibliographiques

- **Sousa M.J, & Malcata F.X, (2002).** Advances In the Role of a Plant Coagulant (Cuanara Cardanculus) In Vitro And During Ripening of Cheeses from Several Milk Species Lait 82:151-170.
- **Suzzi G, Caruso M, Gardini , Lombardi A, Vannini L, Guerzon M.E, Andrighetto C, Lanorte M.T, (2000).** A Survey of The Enterococci Isolated from An Artisanal Italian Goat's Cheese (Semicotto Caprino). Journal Of Applied Microbiology 89, 267–274.
- **Tollefson L, Karp B.E, (2004).** Human health impact from antimicrobial use in food animals. Médecine et Maladies Infectieuses, 34, 514–521.
- **Tran J, Jacoby G, Hooper D, (2005).** Interaction Of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with Escherichia Coli Dna Gyrase. Antimicrob Agents Chemother. 49 :118–25 Veysier, P .1999. « Aminoglycosides. Aminocyclitols In : Antibiotiques Agents Antibactériens Et Anti Fongiques. », Ellipses, Paris 1190p.
- **Van Belkum M, & Stiles, (2000).** Nonantibiotic Antibacterial Peptides from Lactic Acid Bacteria. Nat. Prod. Rep, 17, 323-335.
- **Villani F, Coppola S, (1994).** Selection Of Enterococcal Strains for Water-Buffalo Mozzarella Cheese Manufacture. Ann. Microbiol. Enzimol. 44, 97– 105.
- **Wehrli W, Knüsel F, Schmid K, Staehelin M, (1968).** Interaction Of Rifamycin with Bacterial Rna Polymerase. Proceedings Of the National Academy of Sciences. 61(2):667–673.
- **Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde-Gomez Ja, Klare I, Witte W, (2009).** High-Level Ciprofloxacin Resistance Among Hospital-Adapted Enterococcus Faecium (Cc17). International Journal of Antimicrobial Agents. 35(2), Pages 119-125.
- **Wessels D, Jooste, P.J, Mostert J.F, (1990).** Technologically Important Characteristics of Enterococcus Isolates from Milk and Dairy Products. International Journal of Food Microbiology 10, 349–352.
- **Xiaofeng Zheng Sohayb Khaoulani Nadia Ktari, Momath, Ahmed M. Khalil, Chouki Zerrouki, Najla Fourati Andmohamed M, Chehimi (2021).** Towards Clean and Safe Water: A Review on The Emerging Role of Imprinted Polymer-Based Electrochemical Sens 21(13), 4300.
- **Yannick D.N, Tremblay, Skander Hathroubi, Et Mario Jacques (2014)** Les Biofilms Bactériens Et Leur Importance En Santé Animale Et En Santé Publique.
- **Yaprak Aslantas, & Nur Basak Surmel (2021),** Effects Of N-Terminal And C-Terminal Polyhistidine Tag on The Stability and Function of The Thermophilic P450 CYP119 Article ID 8080697.

Références bibliographiques

- **Zhong Z, Zhang W, Song Y, Liu W, Xu H, Xi X, Menghe B, Zhang H, Sun Z, (2017).** Comparative Genomic Analysis of The Genus Enterococcus. *Microbiological Research* (196); 95–105.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés

Milieu BEA :

Pour 1 litre de milieu :

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

Gélose Muller-Hilton :

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

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

Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) :

Pour 1 litre de milieu :

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

Gélose au sang :

-Mélange spécial de peptones.....	23g
-Amidon	1g
-Chlorure de sodium.....	5g
-Agar.....	10g
-Sang.....	50mL

Annexes

Bouillon TSB+ 1% Glucose

-Peptone de caséine	17g/l
-Peptone de soja	3g/l
-Chlorure de sodium.....	5g/l
-Phosphate dipotassique	2.5g/l
-Glucose monohydraté	2.5g/l

Annexes

Annexe 2 : Résultats des tests biochimiques sur l'ensemble des souches isolées.

Souche	Code	Test biochimique				Test phénotypique	
		Catalase	Oxydase	Tolérance à 45°C	Tolérance à 6.5% de NaCl	Gélatinase	Hémolyse
E3ECH2	E22-01	-	+	+	+	+	-
E3ECH4	E22-02	-	+	+	+	+	-
E2ECH4	E22-03	-	+	+	+	-	-
E4ECH6	E22-04	-	+	+	+	-	-
E4ECH7	E22-05	-	+	+	+	-	-
E6ECH7	E22-06	-	+	+	+	-	-
E5ECH1	E22-07	-	+	+	+	-	-
E6ECH9	E22-08	-	+	+	+	-	-
E2ECH3	E22-09	-	+	+	+	-	-
E6ECH5	E22-10	-	+	+	+	-	-
E1ECH2	E22-11	-	+	+	+	-	-
E4ECH4	E22-12	-	+	+	+	-	-
E5ECH1	E22-13	-	+	+	+	-	-
E4ECH9	E22-14	-	+	+	+	-	-
E5ECH5	E22-15	-	+	+	+	-	-
E4ECH1	E22-16	-	+	+	+	-	-

Annexes

		Catalase	Oxydase	Tolérance à 45°C	Tolérance à 6.5% de NaCl	Gélatinase	hémolyse
E2ECH5	E22-17	-	+	+	+	-	-
E6ECH9	E22-18	-	+	+	+	-	-
E4ECH10	E22-19	-	+	+	+	-	-
E'1ECH10	E22-20	-	+	+	+	-	-
E'6ECH4	E22-21	-	+	+	+	-	-
E'3ECH4	E22-22	-	+	+	+	-	-
E'6ECH5	E22-23	-	+	+	+	-	-
E'4ECH2	E22-24	-	+	+	+	-	-
E'5ECH6	E22-25	-	+	+	+	-	-
E'5ECH10	E22-26	-	+	+	+	-	-
E'2ECH2	E22-27	-	+	+	+	-	-
E'3ECH10	E22-28	-	+	+	+	-	-
E'5ECH3	E22-29	-	+	+	+	-	-
E'5ECH4	E22-30	-	+	+	+	-	-
E'3ECH9	E22-31	-	+	+	+	-	-
E'5ECH7	E22-32	-	+	+	+	-	-
E'5ECH1	E22-33	-	+	+	+	-	-
E'3ECH3	E22-34	-	+	+	+	-	-

Annexes

		Catalase	Oxydase	Tolérance à 45°C	Tolérance à 6.5% de NaCl	Gélatinase	hémolyse
E'2ECH9	E22-35	-	+	+	+	-	+
E'5ECH8	E22-36	-	+	+	+	-	-
E'5ECH1	E22-37	-	+	+	+	-	-
E'6ECH1	E22-38	-	+	+	+	-	-
E'4ECH5	E22-39	-	+	+	+	-	-
E'6ECH6	E22-40	-	+	+	+	-	-
E'4ECH8	E22-41	-	+	+	+	-	-
E''12ECH4	E22-42	-	+	+	+	-	-
E''10ECH7	E22-43	-	+	+	+	+	+
E''11ECH8	E22-44	-	+	+	+	+	-
E''8ECH1	E22-45	-	+	+	+	-	-
E''10ECH3	E22-46	-	+	+	+	+	-
E''7ECH9	E22-47	-	+	+	+	-	-
E''12ECH1	E22-48	-	+	+	+	-	-
E''9ECH4	E22-49	-	+	+	+	+	-
E''7ECH1	E22-50	-	+	+	+	+	+
E''8ECH8	E22-51	-	+	+	+	-	-

Annexes

		Catalase	Oxydase	Tolérance à 45°C	Tolérance à 6.5% de NaCl	Gélatinase	hémolyse
E''7ECH3	E22- 52	-	+	+	+	+	-
E''9ECH5	E22- 53	-	+	+	+	-	-
E''12ECH3	E22- 54	-	+	+	+	-	-
E''12ECH8	E22- 55	-	+	+	+	-	-
E''11ECH9	E22- 56	-	+	+	+	-	-
E''7ECH7	E22- 57	-	+	+	+	-	-
E''8ECH9	E22- 58	-	+	+	+	-	-
E''8ECH5	E22- 59	-	+	+	+	-	-
E''10ECH2	E22- 60	-	+	+	+	-	-

Annexes

Annexe 3 : Valeurs des diamètres de zone d'inhibition selon le CLSI (2020).

<i>Famille</i>	Antibiotique	Diamètre critique			Références
		Sensible	Intermédiaire	Résistante	
<i>β lactamines</i>	Ampicilline	≥17	-	≤16	CLSI 2020
	Pénicilline	≥15	-	≤14	
<i>Glycopeptides</i>	Vancomycine	≥17	15- 16	≤14	CLSI 2020
	Teicoplanine	≥14	11- 13	≤10	CLSI 2020
<i>Tétracyclines</i>	Tétracycline	≥19	15-18	≤14	CLSI 2020
<i>Macrolides</i>	Erythromycine	≥23	14- 22	≤13	CLSI 2020
<i>Phénicols</i>	Chloramphénicol	≥18	13-17	≤12	CLSI 2020
<i>Fluoroquinolones</i>	Ciprofloxacine	≥21	16-20	≤15	CLSI 2020
<i>Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique</i>	Sulfamethoxazole	≥16	-	≤10	CASFM 2012

Annexes

Annexe 04 : Résultats détaillés de l'antibiogramme pour chaque souche d'*Enterococcus* isolée.

(Diamètre d'inhibition en mm).

Souche	Code	AMP	PEN	TET	ERY	TEC	VAN	CIP	CHL	SXT
E3ECH2	E22-01	25	23	6	6	33	29	28	29	30
E3ECH4	E22-02	26	28	6	6	26	27	30	29	33
E2ECH4	E22-03	20	26	6	6	32	29	26	30	48
E4ECH6	E22-04	6	6	6	6	28	26	33	36	35
E4ECH7	E22-05	26	6	6	6	27	36	29	28	38
E6ECH7	E22-06	6	25	6	6	32	33	24	6	6
E5ECH1	E22-07	6	6	6	6	36	34	9	42	49
E6ECH9	E22-08	29	6	6	6	29	29	6	26	32
E2ECH3	E22-09	24	27	6	6	30	29	6	30	39
E6ECH5	E22-10	29	26	6	6	33	33	6	9	6
E1ECH2	E22-11	6	6	6	6	36	37	6	29	6
E4ECH4	E22-12	28	22	6	29	29	27	26	24	39
E5ECH1	E22-13	6	6	6	6	29	45	9	28	10
E4ECH9	E22-14	6	6	6	6	29	33	6	28	9
E5ECH5	E22-15	27	24	6	6	29	32	6	32	49
E4ECH1	E22-16	6	6	6	6	28	29	30	29	9
E2ECH5	E22-17	24	26	6	6	32	36	6	26	10

Annexes

Souche	Code	AMP	PEN	TET	ERY	TEC	VAN	CIP	CHL	SXT
E6ECH9	E22-18	26	26	6	6	33	29	6	29	9
E4ECH10	E22-19	6	6	6	6	30	36	8	33	10
E'1ECH10	E22-20	18	6	6	6	26	29	18	41	31
E'6ECH4	E22-21	6	6	6	6	28	29	16	37	35
E'3ECH4	E22-22	19	6	10	23	20	20	25	30	31
E'6ECH5	E22-23	16	6	6	10	29	28	17	32	30
E'4ECH2	E22-24	18	25	6	6	22	18	6	6	33
E'5ECH6	E22-25	23	6	10	22	19	21	29	30	32
E'5ECH10	E22-26	6	12	12	24	18	18	25	24	31
E'2ECH2	E22-27	6	6	6	6	29	30	19	34	41
E'3ECH10	E22-28	19	6	6	6	18	20	27	30	30
E'5ECH3	E22-29	21	17	6	24	19	21	26	30	35
E'5ECH4	E22-30	20	18	6	24	18	19	25	29	31
E'3ECH9	E22-31	22	6	6	6	20	21	28	30	40
E'5ECH7	E22-32	18	15	6	21	17	21	25	23	29
E'5ECH1	E22-33	17	20	6	6	22	19	25	30	6
E'3ECH3	E22-34	23	6	9	21	18	20	25	24	6
E'2ECH9	E22-35	18	21	10	6	19	20	23	30	37
E'5ECH8	E22-36	33	44	35	6	21	24	15	31	25

Annexes

Souche	Code	AMP	PEN	TET	ERY	TEC	VAN	CIP	CHL	SXT
E'5ECH1	E22-37	18	16	10	33	19	21	26	29	34
E'6ECH1	E22-38	15	13	6	6	28	28	20	31	36
E'4ECH5	E22-39	29	16	6	6	24	23	6	28	50
E'6ECH6	E22-40	22	6	6	6	22	25	17	20	45
E'4ECH8	E22-41	19	6	23	21	20	24	21	25	39
E''12ECH4	E22-42	40	46	25	6	20	23	18	28	30
E''10ECH7	E22-43	6	6	6	6	25	28	25	30	11
E''11ECH8	E22-44	6	6	6	6	28	30	15	17	35
E''8ECH1	E22-45	6	6	6	16	29	33	18	30	46
E''10ECH3	E22-46	33	6	26	25	29	29	27	23	45
E''7ECH9	E22-47	28	6	6	16	30	28	16	32	32
E''12ECH1	E22-48	26	15	9	26	20	19	24	25	34
E''9ECH4	E22-49	26	6	6	6	29	29	15	28	33
E''7ECH1	E22-50	6	6	6	6	20	26	32	25	25
E''8ECH8	E22-51	22	6	12	6	22	18	29	28	27
E''7ECH3	E22-52	23	6	10	6	18	19	23	25	32
E''9ECH5	E22-53	27	9	14	6	19	22	25	26	25
E''12ECH3	E22-54	27	6	6	30	21	26	30	29	38
E''12ECH8	E22-55	25	6	25	19	20	25	25	20	30

Annexes

Souche	Code	AMP	PEN	TET	ERY	TEC	VAN	CIP	CHL	SXT
E''11ECH9	E22-56	25	20	12	12	15	18	26	11	26
E''7ECH7	E22-57	22	6	14	6	13	26	20	25	28
E''8ECH9	E22-58	22	6	16	19	15	24	19	24	25
E''8ECH5	E22-59	25	14	15	6	30	32	16	46	35
E''10ECH2	E22-60	25	9	12	6	20	18	16	14	30

Annexe 5 : formation de biofilm

Code	Souche	Moyennes	Résultats
E22-01	E3ECH2	0,905	Moyennement formatrice
E22-02	E3ECH4	0,321	Faiblement formatrice
E22-03	E2ECH4	0,282	Faiblement formatrice
E22-04	E4ECH6	0,507	Moyennement formatrice
E22-05	E4ECH7	0,722	Moyennement formatrice
E22-06	E6ECH7	0,473	Moyennement formatrice
E22-07	E5ECH1	0,744	Moyennement formatrice
E22-08	E6ECH9	0,546	Moyennement formatrice
E22-09	E2ECH3	0,248	Faiblement formatrice
E22-10	E6ECH5	0,710	Moyennement formatrice
E22-11	E1ECH2	0,509	Moyennement formatrice
E22-12	E4ECH4	0,821	Moyennement formatrice
E22-13	E5ECH1	0,632	Moyennement formatrice
E22-14	E4ECH9	0,257	Faiblement formatrice
E22-15	E5ECH5	1,265	Fortement formatrice
E22-16	E4ECH1	0,535	Moyennement formatrice
E22-17	E2ECH5	0,542	Moyennement formatrice
E22-18	E6ECH9	0,240	Faiblement formatrice
E22-19	E4ECH10	0,256	Faiblement formatrice
E22-20	E'1ECH10	0,152	Faiblement formatrice
E22-21	E'6ECH4	0,237	Faiblement formatrice
E22-22	E'3ECH4	0,212	Faiblement formatrice
E22-23	E'6ECH5	0,216	Faiblement formatrice
E22-24	E'4ECH2	0,160	Faiblement formatrice
E22-25	E'5ECH6	0,193	Faiblement formatrice
E22-26	E'5ECH10	0,299	Moyennement formatrice
E22-27	E'2ECH2	0,202	Faiblement formatrice
E22-28	E'3ECH10	0,209	Faiblement formatrice

Annexes

Code	Souche	Moyennes	Résultats
E22-29	E'5ECH3	0,227	Faiblement formatrice
E22-30	E'5ECH4	0,261	Faiblement formatrice
E22-31	E'3ECH9	0,254	Faiblement formatrice
E22-32	E'5ECH7	0,217	Faiblement formatrice
E22-33	E'5ECH1	0,254	Faiblement formatrice
E22-34	E'3ECH3	0,227	Faiblement formatrice
E22-35	E'2ECH9	0,192	Faiblement formatrice
E22-36	E'5ECH8	0,156	Faiblement formatrice
E22-37	E'5ECH1	0,243	Faiblement formatrice
E22-38	E'6ECH1	0,239	Faiblement formatrice
E22-39	E'4ECH5	0,266	Moyennement formatrice
E22-40	E'6ECH6	0,169	Faiblement formatrice
E22-41	E'4ECH8	0,465	Moyennement formatrice
E22-42	E''12ECH4	0,24	Faiblement formatrice
E22-43	E''10ECH7	0,211	Faiblement formatrice
E22-44	E''11ECH8	0,212	Faiblement formatrice
E22-45	E''8ECH1	0,187	Faiblement formatrice
E22-46	E''10ECH3	0,152	Non formatrice
E22-47	E''7ECH9	0,180	Faiblement formatrice
E22-48	E''12ECH1	0,209	Faiblement formatrice
E22-49	E''9ECH4	0,159	Non formatrice
E22-50	E''7ECH1	0,163	Non formatrice
E22-51	E''8ECH8	0,22	Faiblement formatrice
E22-52	E''7ECH3	0,215	Faiblement formatrice
E22-53	E''9ECH5	0,149	Non formatrice
E22-54	E''12ECH3	0,2	Faiblement formatrice
E22-55	E''12ECH8	0,293	Faiblement formatrice
E22-56	E''11ECH9	0,194	Faiblement formatrice
E22-57	E''7ECH7	0,159	Non formatrice
E22-58	E''8ECH9	0,197	Faiblement formatrice
E22-59	E''8ECH5	0,197	Faiblement formatrice
E22-60	E''10ECH2	0,169	Non formatrice

Annexes

Annexe 6 : Résultats de quelques tests sur les souches isolés.



Figure 12 : Trouble bactérienne sur les tubes après enrichissement sur bouillon MH+NaCL.



Figure 13 : Souche d'*Enterococcus* sur le milieu BEA après incubation à 37°C/24h.

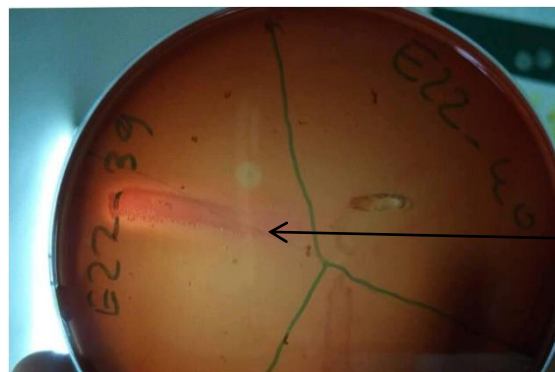


Figure 14 : Résultats de quelques souches sur le milieu gélose au sang qui montrent le test d'hémolyse.

Annexes



Figure 15 : Formation de biofilm sur microplaque.

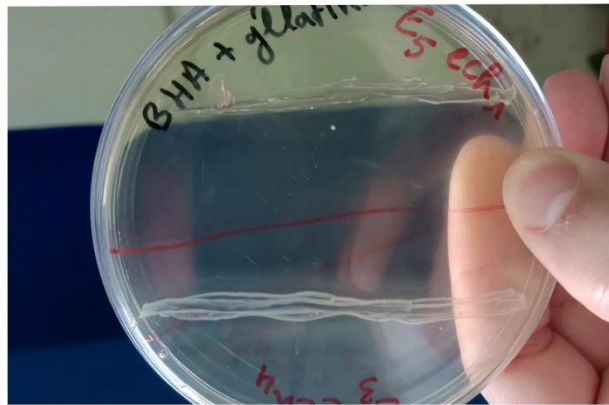


Figure 16 : Test de la gélatinase sur le milieu BHIB+gélatine après incubation 37°C/24h.



Figure 17 : Conservation des souches testé avec des cryotubes qui contient le glycérol.