



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

«BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires»

**Etude de la résistance aux antibiotiques des
Enterococcus isolées à partir des aliments**

Présenté par :

-SALAH Saida

Encadré par :

-Pr HAGGOURD Abdellatif

-Pr BENNANI Bahia

Soutenu le 05 juin 2018 :

Devant le jury composé de :

- Pr BENNANI Bahia (FMP Fés)
- Pr HAGGOURD Abdellatif (FST Fés)
- Pr EL ABED Soumya (FST Fés)

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Au Nom de Dieu, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

Nous remercions Dieu Le Généreux, Le Tout Puissant qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et qui nous a honoré d'être parmi ceux qui savent lire et écrire, Dieu merci de nous avoir donné le courage et la patience pour achever ce travail.

A Madame Bahia BENNANI

Vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire , Vous m'avez proposé ce sujet et avez mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à ce travail, ...Merci chaleureusement pour la confiance que vous m'avez accordée et surtout pour vos conseils. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur Abdellatif HAGGOUR

C'est avec sincérité que nous remercions pour nous avoir honorés en acceptant de diriger ce travail, pour vos encouragements, vos conseils, votre disponibilité et surtout pour votre patience dans l'encadrement de ce mémoire. Merci Monsieur d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, veuillez trouver ici toutes les expressions de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect.

A Madame EL ABED Soumya

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail . Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Mademoiselle Ghita BENJELLON

Tu as dirigé ce travail, je te remercie pour ta patience et ton accompagnement tout au long de ce travail , ainsi que pour ton aide précieuse au cours de la rédaction de ce travail.. Trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents qui m'ont permis de poursuivre mes études et m'ont soutenu tout au long de ces nombreuses années. merci pour votre confiance en moi, votre encouragements et votre amour, que Dieu vous garde et vous accorde une longue vie insh'ALLAH.

Mes sœurs et mon frère qui m'ont toujours encouragés et
Soutenu.

Mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidé ; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance

Mes amies, je ne vous oublierai jamais : Kawtar ,Meriem, fatimazahra nous avons vécu des moments superbes,
merci pour vos blagues, anecdotes qui m'ont fait rire, elles vont beaucoup me manquer.

Toutes les personnes qui m'ont soutenu et assistée, durant toute ma vie et dont je n'ai pas pu citer les noms.

Saida

Résumé :

Ce travail effectué au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la FMPF avait pour objectif d'étudier l'antibiorésistance des *Enterococcus* isolées à partir des aliments. La majorité des isolats provenait de salade avec un taux de 25%. Les *Enterococcus* sont en majorités (95%) d'origine fécale. Les isolats obtenus présentent une résistance à la triméthoprim-sulfaméthoxazole (sxt) dans 100% des cas. Les taux de résistance les plus élevés ont été obtenus pour la tétracycline et la clarithromycine avec un taux de (77,5%) pour chacun, l'imipénème (67,5%) et la pénicilline (62,5%). Des taux de résistance plus bas à la kanamycine et à la levofloxacine (22,5%) sont enregistrés. Afin de remédier aux problèmes sanitaires qui peuvent être causés par les entérocoques, des mesures de contrôle et de surveillance sont nécessaires pour éviter la dissémination des souches multi-résistantes.

Mots clés : *Enterococcus*, résistance, antibiotiques, vancomycine, tétracycline, imipénème, levofloxacine, pénicilline, kanamycine, clarithromycine, triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Summary :

This work, carried out at the laboratory of Molecular Biology and Microbiology at FMPF, aimed to study the resistance of enterococci isolated from food. The overall results show that the majority of strains are isolated from salad with a rate of 25%. The enterococci are found in majorities (95%). All strains are resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole (sxt). The highest levels of resistance are for tetracycline and clarethromycin with a level of (77.5%) for each, imipenem, (67.5%), and penicillin (62.5%). Lower levels of resistance to kanamycin and levofloxacin (22.5%) are recorded. In order to address the public health problem caused by enterococci, control and surveillance measures are needed to prevent the spread of multidrug strains.

Key words: enterococci, resistance, antibiotic, vancomycin, tetracycline, imipenem, levofloxacin, penicillin, kanamycin, clarethromycin, trimethoprim-sulfamethoxazole

Table de matières

Remerciements	(i)
Dédicaces	(ii)
Résumé	(iii)
Table de matières	(iv)
Liste des annexes	(v)
Liste des tableaux	(v)
Liste des figures	(v)
Liste des abréviations.....	(vi)
Introduction générale.	1
Chapitre 1 : Revue Bibliographique	
I-Rappel sur les <i>Streptococcus</i>	2
I-1) Historique	2
I-2) Généralités	2
I-3) Taxonomie.....	2
I-4) Caractères biochimiques	3
II-Classification	3
III-Les <i>Enterococcus</i> dans l'alimentation	4
III-1 Produits laitiers	4
III-2 Viandes et poissons.....	5
III-3 Légumes fermentés.....	5
IV-La résistance bactérienne aux antibiotiques	5
IV- 1- Les antibiotiques	5
IV- 1-1 Définition	5
IV- 1-2 Classification et mode d'action des antibiotiques	6
IV- 1-2-1 Les antibiotiques qui ciblent la proi bactérienne	6
IV-1-2-2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique	6
IV-1-2-3 Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes	7
IV-1-2-4 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN	7
IV-1-2-5 Les antibiotiques quiciblent l'ADN	7
IV-2-La résistance bactérienne	8
IV- 2-1 Définition.....	8
IV-2-2 Les types de résistance bactérienne	8

IV-2-2-1	Résistance bactérienne naturelle	8
IV-2-2-2	Résistance bactérienne acquise.....	8
IV-2-2-2-1	Résistance par mutation chromosomique	9
IV-2-2-2-2	Résistance par acquisition de gènes	9
V-2-3	Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne.....	9
V-2-3-1	-Diminution de la perméabilité	9
V-2-3-2	-Modification de la cible des antibiotiques	10
V-2-3-3	-Production d'enzymes inactivant les antibiotiques.....	10
V-3	La résistance des <i>Enterococcus</i> aux antibiotiques	10
V-3-1	La résistance naturelle des entérocoques aux antibiotiques.....	10
V-3-2	La résistance acquise des entérocoques aux antibiotiques.....	10
V-3-2-1	Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines.....	10
V-3-2-2	Mécanismes de résistance aux aminosides	11
V-3-2-3	La résistance aux glycopeptides	11
 Chapitre 2 : Matériel et méthodes :		
1.	Durée et lieu d'étude	12
2.	Isolement des Enterocoques à partir des aliments	12
3.	Méthodes	12
3.1	Mise en culture	12
3.2	Identification bactériologique	12
3.2.1	Coloration de Gram	12
3-3	Identification biochimique	13
3-3-2	Test d'hémolyse.....	13
3-3-3	Test de catalase	13

3-3-4 Test de bile esculine	14
3.3 Antibiogramme.....	14
Chapitre 3 : Résultats et Discussion.....	17
1-Résultats	17
I-Collecte et caractérisation des souches bactériennes	17
I-1 Origine des souches testées	17
I-2 Test de bile esculine.....	17
I-2 Test d'hémolyse	18
II-Résultats de l'antibiogramme	19
2-Discussion.....	24
Conclusion.....	26
Références bibliographiques	27
Annexes	

Liste des annexes

- Annexe A:** Composition des milieux de culture
- Annexe B :** Identification bactériologique
- Annexe C :** Isolement des enterococcus
- Annexe D :** Identification biochimique et lecture des résultats :
- Annexe E:** Antibiogramme

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des Streptococcus.	3
Tableau 2 : Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne.....	6
Tableau 3 : Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes.....	7
Tableau 4 : Aliments dans lesquels les <i>Enterococcus</i> sont isolées.....	12
Tableau 5: Antibiotiques testés et leurs valeurs critiques	15

Liste des figures

Figure 1 : Pourcentage des souches isolées de chaque aliment.....	17
Figure 2 : Répartition des souches selon le test de bile esculine.....	17
Figure 3 : Répartition des souches selon le test d'hémolyse.....	18
Figure 4 : Répartition des souches hémolytiques selon le type d'hémolyse.	18
Figure 5: Taux de résistance et de sensibilité des isolats vis-à-vis des antibiotiques testés...	19
Figure 6 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des salades	20
Figure 7 : Taux de résistance des isolats obtenus dans les légumes cuites	20
Figure 8 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir de la pâtisserie	21
Figure 9 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des poissons cuits	21
Figure 10 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des viandes crues.....	22
Figure 11 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des viandes cuites	22
Figure 12 : Résistance des isolats selon l'origine	23

Liste des abréviations

ARN : Acide ribonucléique

ADN : Acide désoxyribonucléique

PLP : Protéines liant les pénicillines

UFC : Unité formant colonie

BEA : Bile Esculine Agar

BHI : Brain Heart Infusion

MH : Mueller-Hinton

SXT : Triméthoprim-sulfaméthoxazole

TE : Tétracycline

VA : Vancomycine

ETP : Imipénème

AK : Kanamycine

CLR : Claréthromycine

LEV : Lévofloxacine

P10 : Pénicilline

FMPF : Faculté de médecine et pharmacie Fés

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

Chapitre I :

Revue bibliographique

Introduction Générale :

Les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques utilisées depuis des siècles dans la transformation des aliments. Ces micro-organismes ont une remarquable capacité à s'adapter à leur environnement et jouent un rôle essentiel dans la conservation (prolongation du temps de stockage) et dans la qualité bactériologique des aliments, tout en respectant leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques. Ce sont des bactéries commensales de l'homme et sont présents un peu partout dans l'organisme humain et principalement au niveau du tractus intestinal. Cependant, ce sont des marqueurs de contamination fécale[1].

Les entérocoques, ont pour longtemps été considérés comme des germes à faible pouvoir pathogènes, responsables de quelques infections extrahospitalières,

Et dont leur pouvoir pathogènes s'exerce en association avec d'autres germes. Cependant, leur rôle dans les infections nosocomiales est en constante progression et ainsi les entérocoques y'occupent la troisième position derrière *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*[2].

Ce rôle en pathologie nosocomiale est dû à la remarquable habilité des entérocoques à acquérir une multi-résistance notamment aux antibiotiques d'usage courant en thérapeutique, cette résistance aggravée ces dernières années par l'émergence de souches résistantes aux glycopeptides qui sont réservés à un usage hospitalier et constituent des traitements de dernier recours [2].

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la FMPF pour une période d'un mois et demi allant du 02 avril à 15 mai 2018. Ce travail a pour objectif :

- **d'identifier les souches d'*Enterococcus* isolées de différents aliments.**
- **d'étudier la résistance des isolats des *Enterococcus* à différentes antibiotiques.**

I-Rappel sur les *Streptococcus* :

I- 1-Historique :

Les streptocoques ont été parmi les premiers microorganismes identifiés à l'origine de maladies contagieuses .

Streptococcus vient du grec strepto (tordue) et coccus (sphérique). Plus de cent espèces de streptocoques sont actuellement connues. C'est en Hollande et au Royaume-Uni en 1950 que les premiers cas de septicémie chez le porc dus à une infection à streptocoques ont été mis en évidence. Ce n'est qu'en 1963 que De Moor a décrit cette espèce bactérienne hémolytique. En 1933, Lancefield a démontré qu'il était possible de classer les streptocoques en groupes en fonction de leur équipement antigénique (groupes A, B, C...) [3].

En plus de ces classifications les espèces ou groupes d'espèces ont été caractérisés à la base de tests biochimiques tels que : test de bile esculine, test de catalase, hydrolyse de l'hippurite de sodium etc... [4]

I-2- Généralités :

La famille de *Streptococcaceae* regroupe un ensemble de cocci à Gram positif, se présentent sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de moins de 2µm de diamètre. Ils sont dépourvus de catalase et de cytochrome oxydase. Ils produisent de l'acide lactique par fermentation du glucose et sont anaérobies-aéro-tolérants [5].

Les streptocoques sont le plus souvent impliqués en pathologie humaine et animale. Certaines espèces très virulentes, comme *Streptococcus pyogenes* ou *Streptococcus pneumoniae*, sont des pathogènes «obligatoires » responsables chez l'homme d'infections aiguës. D'autres espèces sont habituellement commensales mais deviennent des pathogènes «opportunistes » dans certaines circonstances [6].

I-3- Taxonomie :

Règne : *Bacteria*.

Division : *Firmicutes*.

Classe : *Bacilli*.

Ordre : *Lactobacillales*.

Famille : *Streptococcaceae*.

Genre : *Streptococcus*.

I-4- Caractères biochimiques

Ne possédant pas de cytochrome, les entérocoques sont de ce fait catalase négative bien que certaines souches puissent posséder une pseudo-catalase. Les entérocoques sont différenciés des autres streptocoques par leur capacité à hydrolyser l'esculine en présence de bile, à hydrolyser le L-pyrrolidonyl-B naphthylamide par production de pyrrolidonyl-arylamidase et à produire du gaz par fermentation du glucose. Ces bactéries sont homofermentaires du fait qu'elles produisent essentiellement de l'acide lactique à partir du glucose [6].

II- Classification :

Les Streptocoques ont fait l'objet récemment de modification taxonomique qui a permis d'établir pour chacune des espèces une certaine spécificité d'habitat et de pathogénicité.

Le genre *Streptococcus* comprend 3 groupes :

- le groupe pyogènes inclut les espèces *S. pyogenes* et *S. agalactiae* et les espèces récentes : *S. porcinus* et *S. dysgalactiae* .
- le groupe de streptocoques oraux contient au moins 16 espèces incluant *S. pneumoniae* et les espèces récentes *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. peroris* et autres.
- le groupe de streptocoques entériques comporte *S. intestinalis*, *S. bovis*, *S. gallolyticus*, *S. equinus*.

Tableau 1 : Classification des *Streptococcus* [5, 7] :

Groupes	habitat	Pouvoir pathogène
<i>Streptococcus pyogenes</i> GROUPE A	- pharynx - chez des porteurs Asymptomatiques au niveau du nasopharynx, de la peau ,du vagin ou du rectum	- Angine rouge ou érythématopultacée . - Infections non invasives essentiellement cutanées - Infections invasives. - Scarlatine. - Syndrome de choc toxique streptococcique. -Complications aseptiques post-

		streptococciques.
<i>Streptococcus agalactiae</i> GROUPE B	<ul style="list-style-type: none"> - C'est un commensal du vagin, de l'intestin, du rhinopharynx. - Chez l'homme la bactérie est retrouvée chez les bovidés (mamelle) . 	<ul style="list-style-type: none"> - Infections périnatales. - Détresse respiratoire, parfois septicémie et méningite chez les enfants. - Autres infections : infection génitale, infections urinaires, arthrite septique, ostéomyélites, endophtalmie, pneumopathie, et endocardite aigue.
GROUPE D	<ul style="list-style-type: none"> - Ils sont commensaux de l'intestin de l'homme et de certains animaux. - Ils sont isolés de produits laitiers ou d'autres produits agro-alimentaires. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les infections sont le plus souvent associées à une bactériémie, avec ou sans endocardite. - D'autres infections moins courantes impliquant les streptocoques du groupe D comprennent les infections des voies urinaires, la méningite nosocomiale, la péritonite, l'arthrite septique et l'ostéomyélite.

III-Les entérocoques dans l'alimentation :

III-1 Produits laitiers :

Les entérocoques les plus couramment présents dans les fromages sont *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* aussi bien les fromages à base de lait cru que de lait pasteurisé, provenant de chèvre, de brebis ou de vache. On retrouve moins souvent *E. casseliflavus*. Les entérocoques ont un rôle important dans la maturation de plusieurs variétés de fromages,

probablement en raison de leur activité protéolytique, lipolytique, de leur capacité de production du diacétyle et d'autres composants volatils contribuant à l'aromatisation, la flaveur et au goût caractéristique. La concentration d'entérocoques dans les fromages frais se situe entre 10^4 à 10^6 UFC·g⁻¹, alors que celle des fromages fermentés est de l'ordre de 10^5 à 10^7 UFC·g⁻¹ [8].

III-2 Viandes et poissons :

Comme indiqué précédemment, les entérocoques appartiennent à la microflore commensale du tractus gastro-intestinal des animaux. De ce fait, il existe de fortes probabilités qu'ils contaminent la viande au cours de l'abattage. *E. faecium* et *E. faecalis* sont les espèces prédominantes dans les produits carnés, tandis que *E. hirae* et *E. durans* y retrouvent en moindre proportion [9]. Knudtson a dénombré en moyenne entre 10^4 et 10^8 UFC d'entérocoques pour 100 cm² de carcasse de porc après abattage [10]. *E. faecium* a été aussi retrouvé par dans des poissons et des fruits de mer. *E. faecium* NKR-5-3 a été isolé dans des poissons fermentés [11].

III- 3 Légumes fermentés :

L'origine de la présence d'entérocoques dans le règne végétal n'est pas clairement définie. Elle peut être endogène comme elle peut résulter d'une contamination environnementale. Dans les olives vertes fraîches, *E. faecium* et *E. faecalis* sont des espèces prédominantes, elles sont retrouvées également dans les olives fermentées. Ben Omar et al ont signalé que les entérocoques trouvés dans les olives ($2,2 \times 10^3$ UFC·g⁻¹) sont bien adaptés aux valeurs de pH initial (9,0) et à la concentration en sel de la saumure employée lors de la transformation [12]. Dans les alimentations asiatique et africaine, *E. faecium* et *E. faecalis* sont généralement liés à la fermentation du sorgho et de soja [13]. De même, *E. mundtii* est retrouvé majoritairement dans le soja, la chicorée fraîche et dans l'ensilage d'herbe [14]. Certaines de ces bactéries sont non seulement essentielles à la fermentation de ces aliments, mais elles possèdent également des propriétés technologiques intéressantes comme la dégradation du raffinose et du stachyose, sucres non digestibles, ou encore la production de bactériocines [15].

VI- Résistance bactérienne aux antibiotiques :

IV 1- Antibiotiques :

IV-1-1 Définition :

Un antibiotique est une substance chimique produite par un microorganisme ou par synthèse chimique et capable de détruire (bactéricide) ou d'empêcher la croissance d'autres microorganismes (bactériostatique) [16].

IV- 1-2 Classification et mode d'action des antibiotiques :

Les différents antibiotiques exploités en médecine thérapeutique peuvent être classés par famille chimique et par leurs modes d'action. Les cibles décrites jusqu'à présent sont la paroi, les membranes, les acides nucléiques et les ribosomes des micro-organismes [17].

IV-1-2-1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne :

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique.

Les antibiotiques qui agissent à ce niveau peuvent le faire de trois manières (Tableau 2) [18].

Tableau 2 : Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne

Mode d'action	Famille
Inhibiteurs de la Transpeptidase	-Pénicilline : - pénicilline M - Pénicilline A - Carboxypénicillines - Uréidopénicilline - Amidopénicillines - Carbapénèmes -Céphalosporine : de 1ères, 2èmes et 3èmes générations.
Inhibiteurs de la polymérisation du peptidoglycane	Glycopeptides
Inhibiteurs de la formation d'acide N-acétyl muramique	Fosfomycine

VI-1-2-2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique :

Certains antibiotiques ont pour cible la membrane plasmique bactérienne avec une action bactéricide. Ces antibiotiques de type polypeptidique présentent une toxicité lors de leur administration. Ce sont des molécules naturelles produites par des bactéries du genre *Bacillus*. On peut citer pour ce genre d'antibiotiques les polymexines B et E [17].

VI-1-2-3 Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes :

La plupart des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes interfèrent avec la synthèse protéique en induisant des erreurs de synthèse ou en inhibant cette synthèse.

La cellule bactérienne est ainsi dans une incapacité de synthétiser des protéines qui lui sont vitales. Les familles des antibiotiques concernées ainsi que leur mode d'actions sont présentées par le Tableau 3 [17].

Tableau 3 : Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes [17].

Mode d'action	Famille
Inducteurs d'erreurs de décodage	Aminosides
Inhibition de l'élongation par le site P	Macrolides Lincosamides Synergistines
Inhibition de l'activité de la peptidyl Transférase	Phénicoles
Inhibition de la fixation de l'ARN de Transfert	Cyclines

VI-1-2-4 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN :

Pour ce mode d'action, on dénombre la famille des rifamycines et la rifabutine qui sont des molécules hémi synthétisées à partir de la rifamycine B. En se liant à l'ARN polymérase, ces antibiotiques bloquent la formation de la chaîne d'ARN messager et par conséquent on assiste à un arrêt de la synthèse protéique. Les rifamycines sont des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif, sur *Mycobacterium*, quelques bactéries à Gram négatif et surtout les *Neisseria meningitidis* (méningoque) [17].

VI-1-2-5 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN :

L'ADN est la cible de plusieurs antibiotiques comme les quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques de synthèse et dérivent de l'acide nalidixique. Ils sont caractérisés par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, et une bonne diffusibilité dans les tissus [17].

V-2- La résistance bactérienne :

V-2-1 Définition :

Il existe plusieurs approches et définition de la résistance, L'organisation mondiale de la santé a défini la résistance bactérienne aux antibiotiques dès 1961 de deux façons différentes :

- Définition thérapeutique :

Une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration atteignable *in vivo*.

- Définition épidémiologique :

Une souche est dite « résistante » lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce [17].

V-2-2 Les types de résistances bactériennes :

V-2-2-1 Résistance bactérienne naturelle :

Si les antibiotiques, molécules naturelles, sont synthétisés par la plupart des micro-organismes pour supplanter d'autres micro-organismes dans un environnement donné, ces substances peuvent ne pas être actives sur tous les micro-organismes. On dira que ces micro-organismes ont une résistance naturelle vis-à-vis de cette molécule. La résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien [17].

V-2-2-2 Résistance bactérienne acquise :

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui

était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme [17].

V-2-2-2-1 Résistance par mutation chromosomique :

Les résistances bactériennes par mutation chromosomique sont induites par des modifications structurales pouvant se traduire soit par un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques indifférentes.

La résistance chromosomique est un phénomène qui présente plusieurs caractères exceptionnels. Il s'agit premièrement de sa rareté puisqu'il intervient en moyenne tous les 10^5 à 10^{10} divisions de la bactérie. Ensuite elle possède un caractère aléatoire car l'antibiotique n'est pas une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la bactérie. Cependant l'antibiotique participe à la sélection des bactéries mutantes. On note aussi son caractère spécifique (affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action), son indépendance et son absence de transmissibilité [19].

V-2-2-2-2 Résistance par acquisition des gènes :

Il s'agit ici de la résistance par un gain d'ADN extra-chromosomique le plus souvent un plasmide. Le plasmide est un fragment d'ADN extra chromosomique (présent dans le cytoplasme) et qui peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. Ces fragments d'ADN peuvent être transmis d'une bactérie donneuse à une autre bactérie dite receveuse ; cette transmission peut se faire entre deux espèces différentes de bactéries.

A travers ce mécanisme, on se trouve face à une facilité d'acquisition de résistance et même de multi-résistance contrairement à celle acquise par mutation d'ADN chromosomique. Ce mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents dont la transduction (avec un bactériophage comme vecteur), la transformation (capture d'ADN par la bactérie) et la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente par contact étroit) [20].

V-2-3 Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne :

Ils peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes :

V-2-3-1 Diminution de la perméabilité :

mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie et efflux actif : l'efflux repose sur une pompe

insérée dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce à un canal ; cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique .

V-2-3-2 Modification de la cible des antibiotiques :

ex : modification des PLP (protéines liant les pénicillines) :

les PLP sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne) et qui sont la cible des bêta-lactamines ,en se fixant aux PLP les bêta-lactamines les empêchent de jouer leur rôle ; la synthèse du peptidoglycane est donc entravée.

V-2-3-3 Production d'enzymes inactivant les antibiotiques :

ex. : production de bêta-lactamases codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables. Le nombre de bêta-lactamases plasmidique est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêta-lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique.[21].

V-3 la résistance des Enterococcus aux antibiotiques [22] :

V-3-1 La Résistance naturelle des entérocoques aux antibiotiques :

Les entérocoques sont naturellement résistants aux pénicillines M, aux céphalosporines qui les sélectionnent souvent *in vivo*, à la clindamycine, aux lincosamines, à la pristinamycine, aux sulfamides, aux quinolones .

Les entérocoques présentent un bas niveau de résistance aux aminosides dont le déterminisme s'explique par un mécanisme actif de transport défectueux lié à un défaut d'énergie oxydative au niveau de la paroi .Ce bas niveau de résistance permet cependant une action synergique dans le traitement d'infections sévères à entérocoques avec la pénicilline ou les glycopeptides obtenue grâce à l'action préalable des bêta-lactamines ou des glycopeptides sur la paroi[22].Récemment la moindre sensibilité ou la résistance naturelle de bas niveau à la vancomycine ont été décrites chez *E. gallinarum*, *E. Casseliflavus* et *E. Flavescens*[23].

V-3-2 Résistance acquise des entérocoques aux antibiotiques :

Cette dernière décennie est marquée par les difficultés croissantes de traitement et de contrôle des infections hospitalières sévères à entérocoques en raison de l'évolution croissante de la résistance aux :

V- 3-2-1 Résistance aux bêta-lactamines :

La résistance par production d'une pénicillinase d'origine plasmidique décrite principalement chez *E. Faecalis* aux Etats-Unis, en Argentine et au Liban[22]. Cette bêtalactamase très proche de celle de *Staphylococcus aureus* et qui hydrolyse la pénicilline G, les aminocarboxy et uréido-pénicillines est détectée par un test iodométrique ou acidimétrique. A noter que ce plasmide code également pour le haut niveau de résistance à la gentamicine[24].

V-3-2-2 Résistance aux aminosides :

Cette résistance se fait par trois mécanismes :

- altération de la cible ribosomale .
- modification du transport de l'antibiotique .
- détoxification enzymatique de l'antibiotique (mécanisme d'origine plasmidique prédominant chez l'entérocoque qui est responsable de l'apparition de souches hautement résistantes aux aminosides [25].

V-3-2-3- Résistance aux glycopeptides :

Actuellement cinq phénotypes de résistance aux glycopeptides sont décrits. Cette résistance observée surtout chez *E. faecium* et apparue en 1987 s'explique par une modification de la structure du peptidoglycane.

- Le phénotype VAN A d'origine plasmidique caractérise les souches d'entérocoques résistantes à haut niveau à la vancomycine et à la téicoplanine.
- Le phénotype VAN B d'origine chromosomique définit les souches présentant un niveau de résistance variable à la vancomycine et restant sensibles à la téicoplanine.
- Le phénotype VAN C est caractérisé par la résistance naturelle de bas niveau à la vancomycine non transférable et probablement chromosomique associée à une sensibilité conservée à la téicoplanine et observée chez *E. casseiflavus* et *E. gallinarum*.
- Jusqu'à présent, seul un isolat unique avec le phénotype VanD a été signalé dans la littérature, -Les phénotypes VAN E (*E. faecalis*) et VAN D (*E. faecium*) sont acquis mais non transférables [26].

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

1. Durée et lieu d'étude :

Notre travail expérimental a été réalisé au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la Faculté de Médecine et de Pharmacie- Fés, durant une période d'un moi et demi allant du 2 avril au 15 mai 2018. On a pu colliger 40 souches isolées à partir de différents aliments.

2. Isolement des Enterocoques à partir des aliments :

Durant notre étude nous avons testé 40 souches isolées à partir de différents aliments :

Tableau 4 : Aliments dans lesquels les Enterococcus sont isolées :

L'origine	Nombre des souches
Salade	10
Légumes cuites	8
Soupe	1
Pâtisserie	5
Poisson cuite	2
Viande crue	6
Viande cuit	8

3. Méthodes :

3.1 Mise en culture (Annexe A):

La culture est une étape très importante du diagnostic bactériologique, elle permet d'isoler la bactérie pour pouvoir l'identifier et déterminer sa sensibilité vis à vis des antibiotiques.

Pour chaque souche, un ensemencement systématique est effectué sur :

- Gélose slanetz

Les géloses sont incubées pendant 24 heures à 37° C.

3-2 –Identification bactériologique :

3-2-1 Coloration de Gram (Annexe B) :

On verse quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis et on laisse agir 1 minute, la fixation de coloration est réalisée par le lugol qui est un iodure de potassium (1 minute) , puis

la décoloration par l'alcool (30 secondes), après on fait la contre coloration avec la fuchsine (1 minute) et le résultat est observé au microscope.

Cette technique permet d'objectiver des cocci à Gram positif disposés en diplocoques, en chaînette ou isolés.

3-3-Identification biochimique (Annexe C) :

3-3-1 Test d'hémolyse :

Les streptocoques peuvent être classés en fonction de leur capacité à induire une hémolyse sur un milieu de gélose au sang frais.

Deux types d'hémolyse peuvent se produire : alpha et bêta hémolyse .

➤ Alpha hémolyse présente un changement de couleur dans la gélose du rouge à une couleur vert très foncé. Ceci résulte de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine par le peroxyde d'hydrogène sécrétée par les bactéries.

➤ Beta hémolyse se réfère à la lyse complète des cellules sanguines. Elle se présente comme une couleur jaune transparente sur le milieu de gélose au sang frais. Ce type d'hémolyse se produit en raison d'une enzyme produite par une bactérie appelée streptolysine. Cette enzyme interagit avec le cholestérol dans la membrane cellulaire entraîne une détérioration de cette structure cellulaire protectrice.

3-3-2 Test de catalase :

But : C'est un test discriminatif qui permet de différencier les bactéries à Gram positif entre elles.

Technique :

On verse quelques gouttes d'eau oxygénée sur une lame puis on prélève une colonie avec une pipette pasteur stérile et on le met dans l'eau oxygénée.

Interprétation :

- Réaction positive : une production de bulles indique la présence de catalase.
- Réaction négative : une absence de bulles signe un test négatif.

3-3-3 Test de bile esculine :

But : La Bile Esculine Agar est un milieu servant à l'identification présomptive des espèces d'entérocoques fécaux et non fécaux.

Principe :

Les entérocoques et les streptocoques D hydrolysent le glycoside et l'esculine en esculétine et en dextrose. L'esculétine réagit à un sel de fer en formant un complexe de couleur marron foncé ou noire. Du citrate ferrique est incorporé au milieu afin de servir d'indicateur de l'hydrolyse de l'esculine et de la formation d'esculétine qu'elle produit.

Les sels biliaires inhibent la croissance des bactéries Gram positives autres que les entérocoques.

Technique :

Le milieu est ensemencé en stries à l'aide d'une anse chargée de la culture bactérienne puis incubé pendant 24 et 48 heures à 37°C.

Interprétation :

- Réaction positive: noircissement du milieu, pour la tolérance à la bile et l'hydrolyse de l'esculine.
- Réaction négative: aucun noircissement ne se produit, il n'y a pas eu de réaction.

3.3Antibiogramme(Annexe D) :

Principe :

L'antibiogramme a pour objectif de déterminer la sensibilité ou la résistance des bactéries aux différents antibiotiques.

Il consiste à déposer à la surface d'une gélose en boîte de pétri, les disques d'antibiotiques à tester et de déterminer le diamètre de la zone d'inhibition après 24 heures d'incubation à 37°C à l'étuve. Ce diamètre permet de définir si le germe est sensible, résistant ou présente une sensibilité intermédiaire.

- Milieux utilisés :

Gélose Mueller Hinton coulée en boîte de pétri. Les géloses sont séchées avant l'emploi.

- Antibiotiques testés :

Pour l'étude de la résistance des isolats identifiés nous avons utilisé huit antibiotiques appartenant à différentes familles et le choix de ces antibiotiques repose sur les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2018).

Tableau 5 : Antibiotiques testés et leurs valeurs critiques (Diamètres en mm):

Antibiotiques	Résistante	Sensible
Pénicilline	<8	10 ≥
Tetracycline	<15	18 ≥
vancomycine	<12	12 ≥
kanamycine	<8	8 ≥
Imipénéne	<18	21 ≥
SXT	<21	50 ≥
Clarithromycine	<14	23 ≥
Levofloxacine	<15	15 ≥

Inoculum :

A partir d'une culture pure de 20 à 24h, sur milieu Slanetz et à l'aide d'un écouvillon nous prenons des colonies bien isolées et parfaitement identiques puis on les décharge dans 2ml de BHI et on le met dans un agitateur pendant 2 heures.

Ensemencement :

L'écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne puis on le frotte sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée avec des stries perpendiculaire sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, on finit l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Après les boîtes sont laissées sécher environ 5 minutes puis on met les disques à l'aide de pince bactériologique stérile et chaque disque est pressé pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé, tout en respectant une distance d'environ 15 mm(minimum) entre deux disques.

Incubation :

18-24 heures à 37°C .

Lecture :

On mesure avec précision le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne. Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de la Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2018 (EUCAST), après la bactérie est classée dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

1-Résultats :

I-Collecte et caractérisation des souches bactériennes :

1-Originé des isolats testées :

Les isolats des *Enterococcus* sont isolées des différents aliments comme indiqué dans la figure 1.

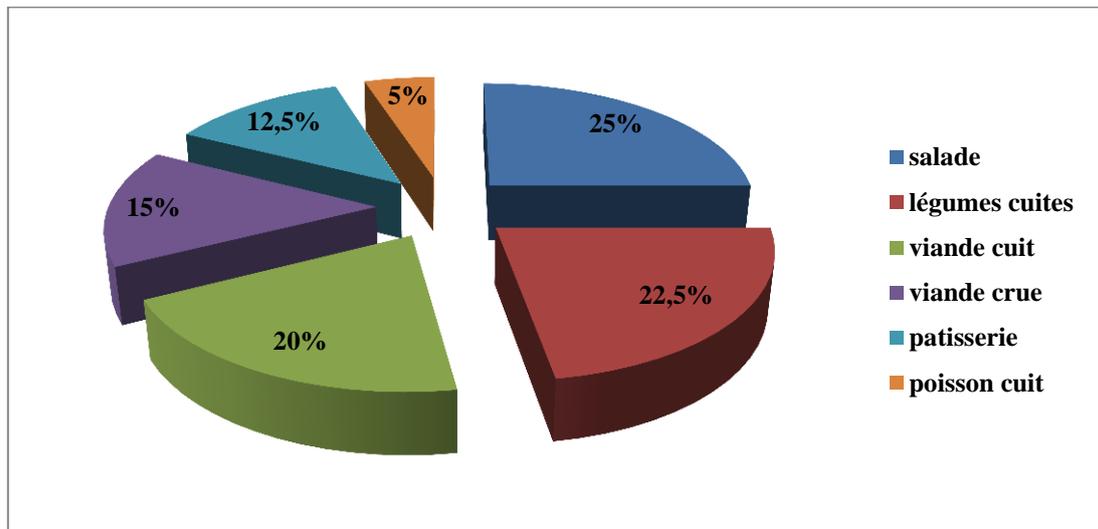


Figure 1 : Pourcentage des isolats de chaque aliment

Les isolats des *Enterococcus* sont isolées essentiellement de salade (25%), de légumes cuites (22,5%), de viande cuit (20%), de viande crue (15%), de pâtisserie (12,5%) et de poisson cuit (5%).

2- Résultat de test de bile esculine :

L'analyse des isolats étudiés après le test de bile esculine a montré que 95% des isolats hydrolysent l'esculine (réaction positive) et sont de ce fait des entérocoques et 5% sont non fécaux.

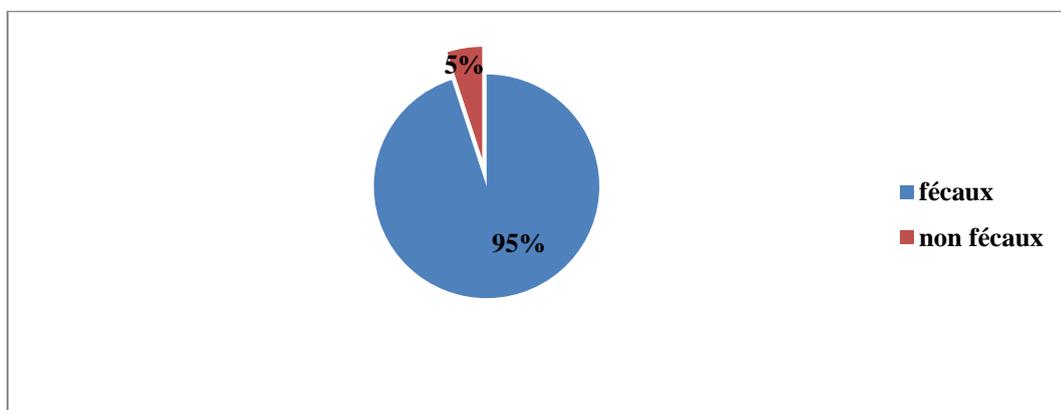


Figure 2 : Répartition des isolats selon le test de bile esculine

3-Résultat de test d'hémolyse :

Parmi les isolats testées on a 85% sont hémolytiques et 15% sont non hémolytiques.

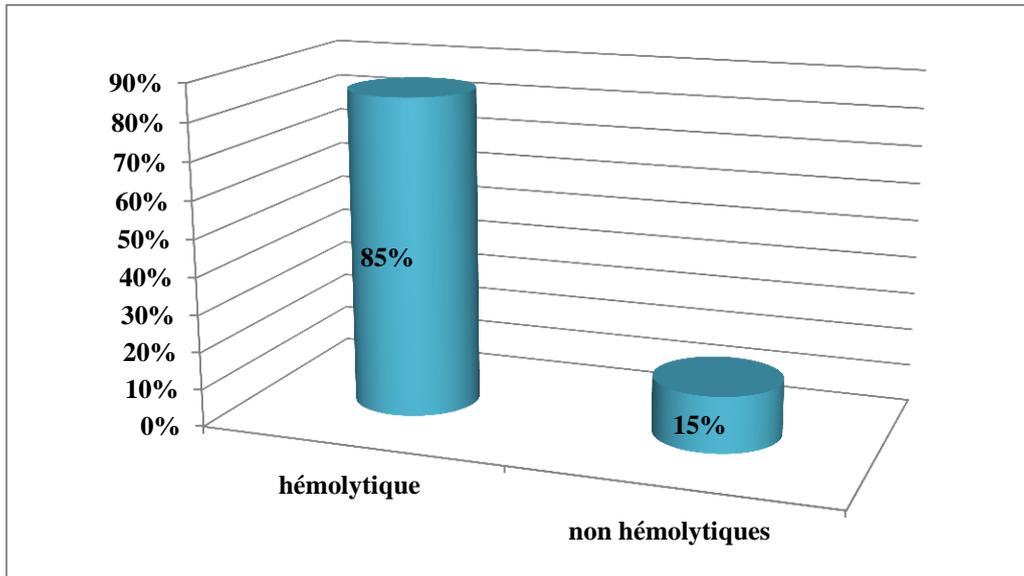


Figure 3 : Répartition des isolats selon la présence d'hémolyse ou non

Parmi les souches hémolytiques 38% sont α hémolytiques (hémolyse incomplète) et 62% sont β hémolytiques (hémolyse complète).

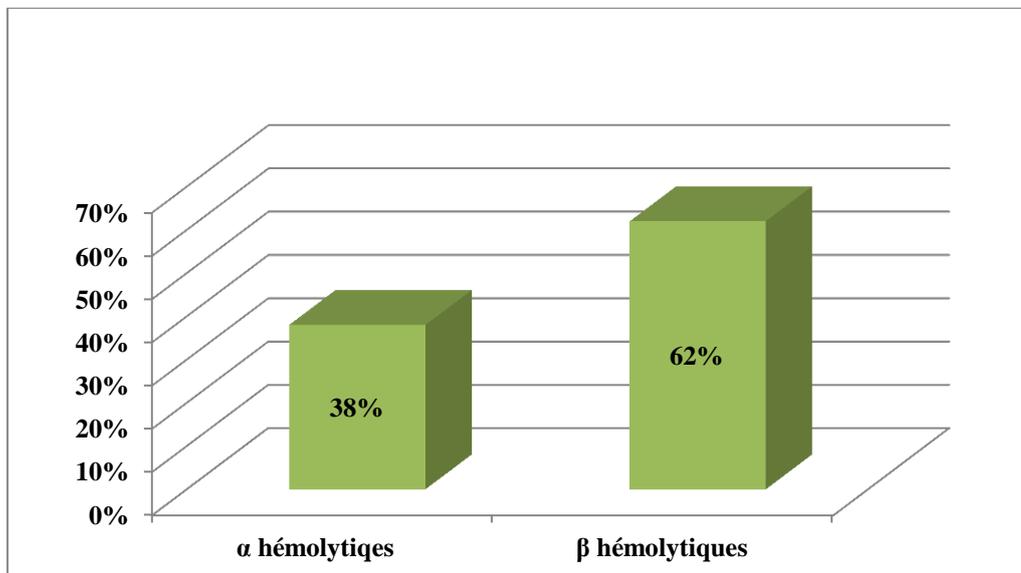


Figure 4 : Répartition des isolats hémolytiques selon le type d'hémolyse

II-Résultats de l'antibiogramme :

Huit antibiotiques appartenant à différentes familles ont été utilisés pour tester la sensibilité des 40 isolats étudiés (la vancomycine, la pénicilline, Imipenème, Clarithromycine, Levofloxacine, la SXT et la tétracycline).

La figure 5 représente le profil de résistance des isolats d'entérocoques des différents aliments. Parmi les isolats analysés, aucun n'a été sensible à l'ensemble des antibiotiques testés. Ils sont tous résistants à la triméthoprine – sulfaméthoxazole (SXT). La résistance a été plus élevée vis-à-vis de la tétracycline et de clarithromycine avec des taux de 77,5%, suivi de l'imipenème, la pénicilline et la vancomycine avec des taux 67,5%, 62,5% et 57,5%, respectivement. Concernant la kanamycine et à la Levofloxacine les souches sont sensibles avec des taux plus élevées, 72,5% et 77,5% respectivement.

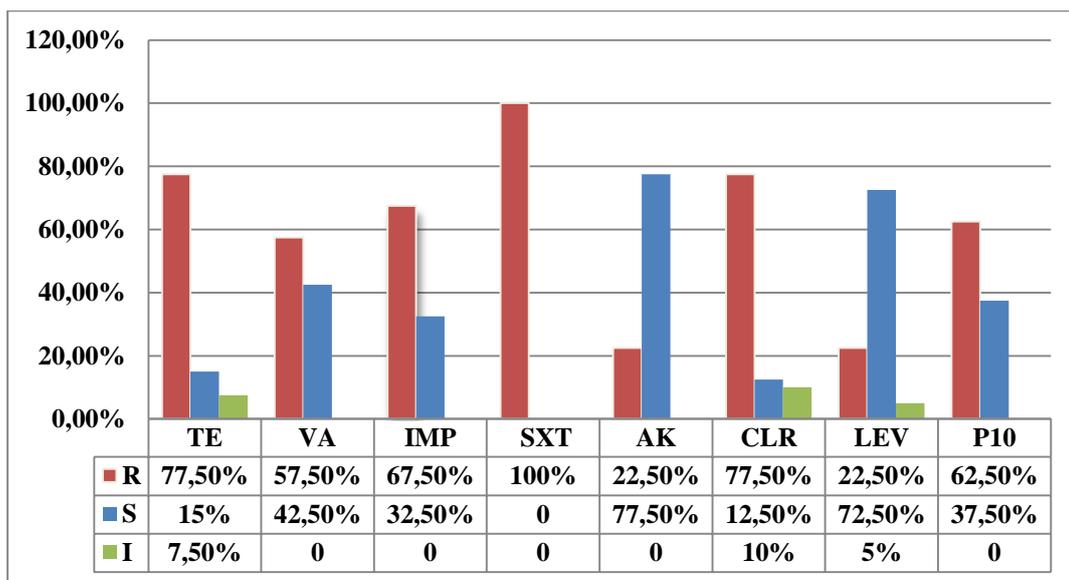


Figure 5: Taux de résistance et de sensibilité des isolats vis-à-vis des antibiotiques testés.

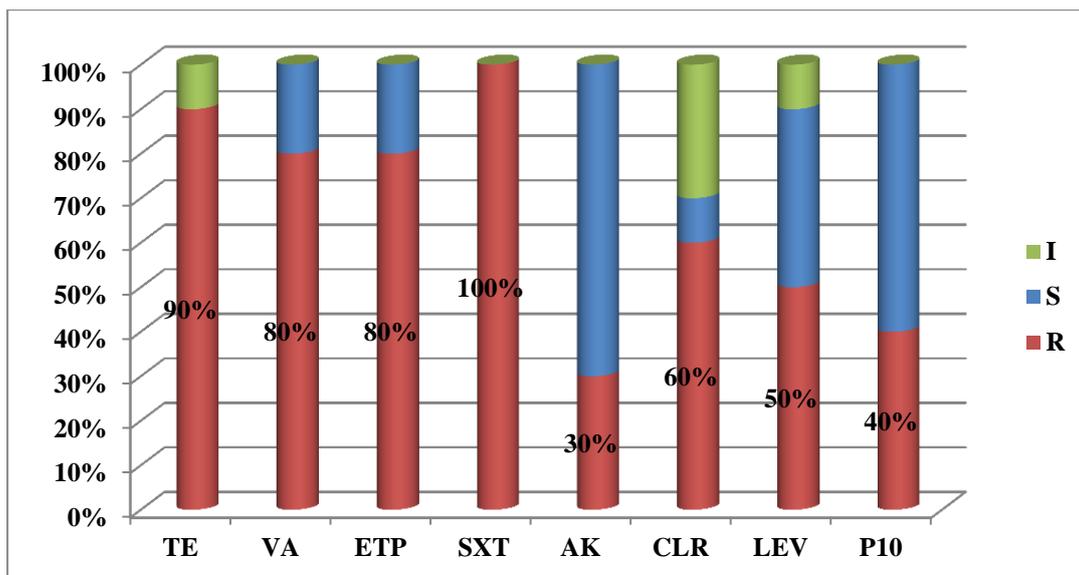


Figure 6 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des salades

Pour les isolats obtenus à partir des salades, la résistance est très élevée vis-vis de la tétracycline, la vancomycine, l'imipénème et la triméthoprime-sulfaméthoxazole avec des taux de 90%, 80%, 80% et 100%, respectivement. Pour la clarithromycine, la levofloxacine et la pénicilline la résistance est notée avec des taux de 60%, 50% et 40% respectivement, alors que pour la kanamycine 30% des isolats sont résistants.

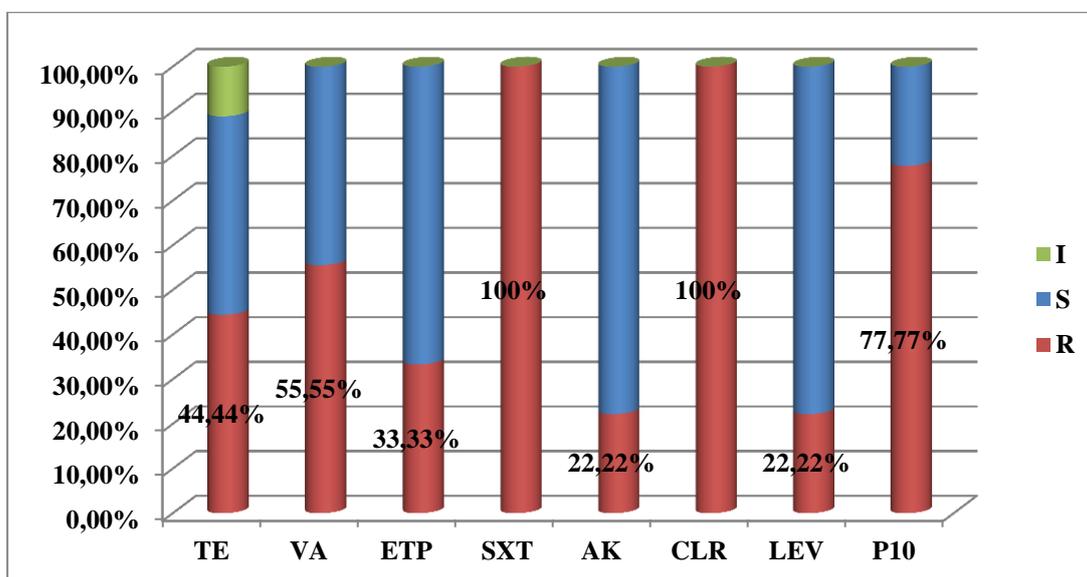


Figure 7 : Taux de résistance des isolats obtenus dans les légumes cuits

La figure 7 montre le profil d'antibio-résistance des isolats obtenus à partir des légumes cuits. Ces isolats sont résistants à la clarithromycine et à la triméthoprime-sulfaméthoxazole (100%)

et 77,7% d'entre eux présente une résistance à la pénicilline. Prés du cinquième des isolats présente une résistance à l'imipenème, la kanamycine et la levofloxacine.

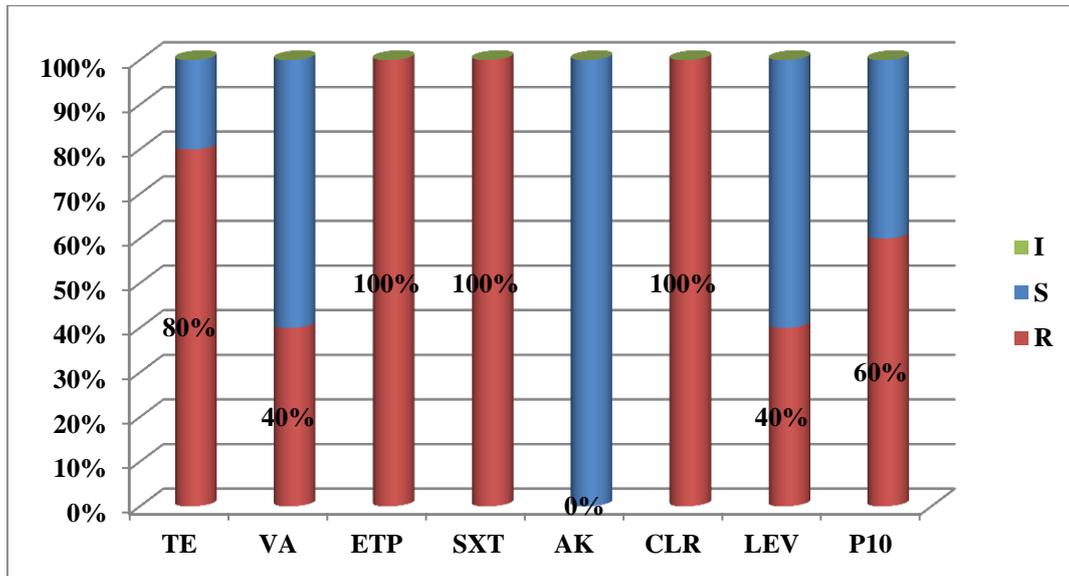


Figure 8 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir de la pâtisserie

Les isolats de pâtisseries sont tous résistants à l'imipenème, à la triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT), à la clarithromycine (100%) et pour la tétracycline la résistance est obtenue dans 80% des cas. Les isolats sont tous sensibles à la kanamycine. Pour la vancomycine et la levofloxacine le taux des isolats résistants est de 40% pour chacun, et pour la pénicilline, la proportion de résistance est de 60%.

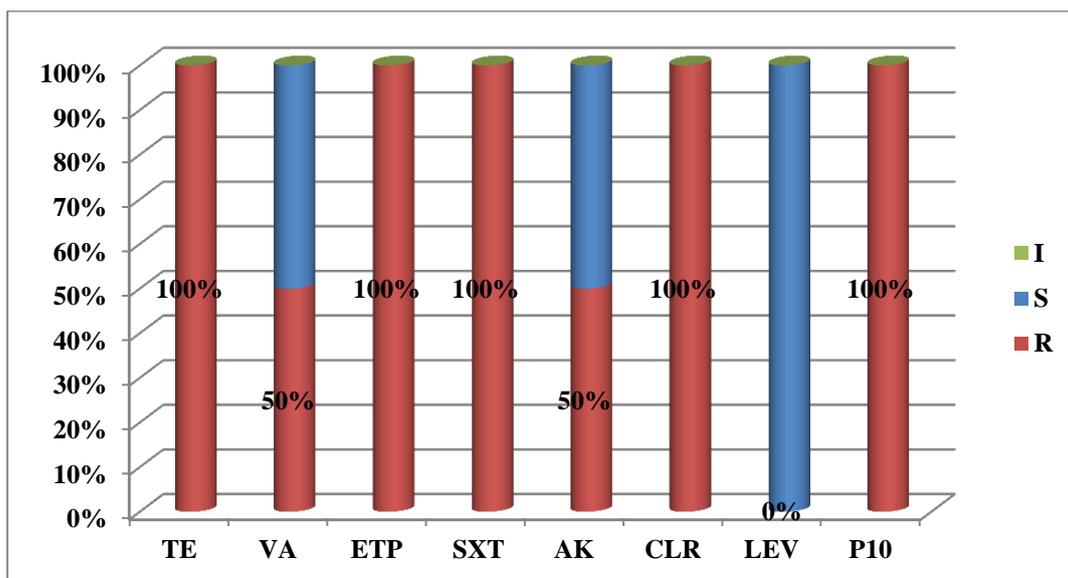


Figure 9 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des poissons cuits

La figure 9 montre que les isolats obtenus à partir des poissons cuit sont tous résistant à la tétracycline , à l'imipénème ,à la triméthoprine-sulfaméthoxazole , à la clarithromycine et à la péniciline. Par contre elles sont sensibles à la levofloxacin (100%). Alors que pour la vancomycine et la kanamycine 50% des isolats sont résistants .

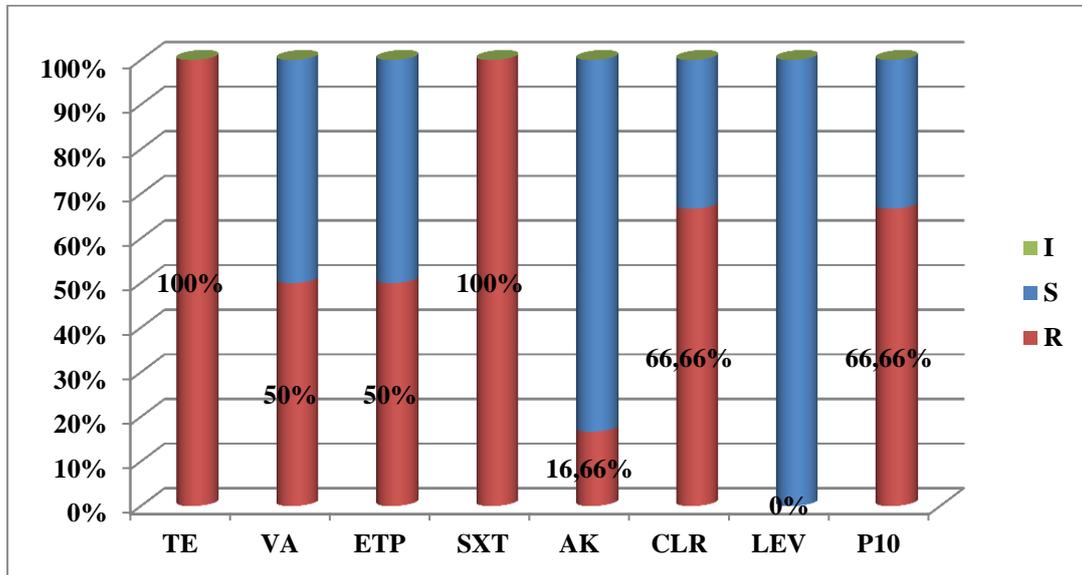


Figure 10 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des viandes crues

Les isolats obtenus à partir des viandes crues montrent une résistance à la tétracycline et à la triméthoprine-sulfaméthoxazole dans 100% des cas et pour la vancomycine, l'imipénème dans 50% des cas. Toutefois, les isolats sont sensibles à la levofloxacin et peu résistants à la kanamycine dans 16.66% des cas (Figure 10).

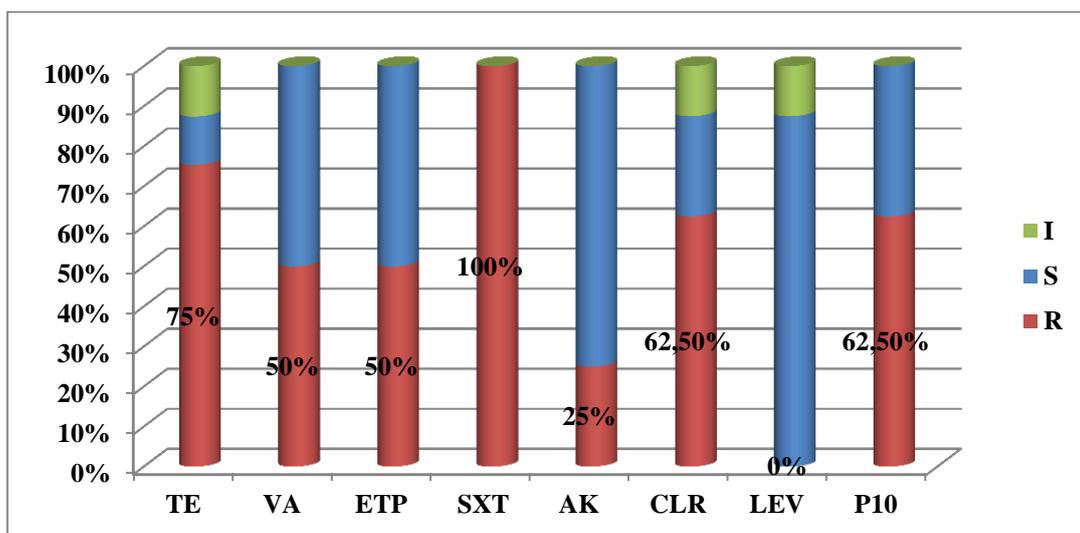


Figure 11 : Taux de résistance des isolats obtenus à partir des viandes cuites

La figure 11 montre que le taux de résistance des isolats obtenus à partir des viandes cuites est très élevée vis-vis de la triméthoprine-sulfaméthoxazole, la clarithromycine et la pénicilline (100%, 62,5% et 62.5%). Le taux de résistance à la vancomycine et l'imipénème est de l'ordre de 50%) , alors que ces isolats sont tous sensibles à la levofloxacin(100%).

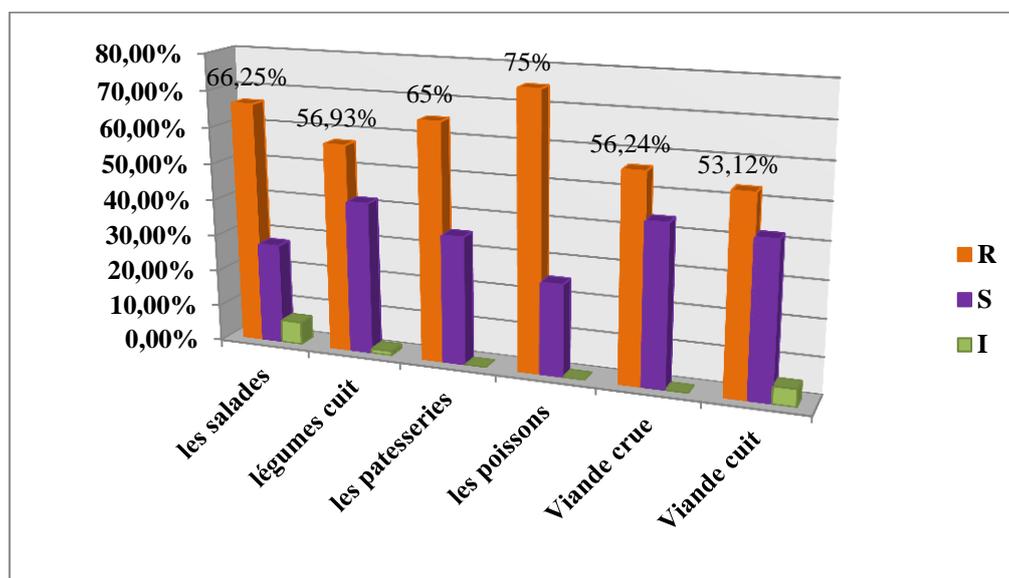


Figure 12 : : Résistance des isolats selon l'origine

D'après la figure 12, les *Enterococcus* présentant plus de résistance aux antibiotiques plus résistantes sont majoritairement isolées à partir des poissons cuits avec un taux de 75% suivi des salades (66.25%) et des pâtisseries (65%) puis les légumes cuits (56.93%) , les viandes crue (56.24%) et les viandes cuits(53.12%) .

2-Discussion :

Les *streptocoques* sont des bactéries qui peuvent être utilisées comme un indicateur de la contamination fécale. Dans notre étude nous avons trouvé que 95% des souches sont d'origine fécale alors que seulement 5% sont d'origine non fécale. Ce résultat se rapproche de celui retrouvé en Europe en 2012, à partir de 144 souches isolées 87 souches sont fécaux (60.4%) [27].

Aujourd'hui, les entérocoques occupent une place importante en pathologie humaine et posent bien souvent un problème thérapeutique du fait de leur résistance à plusieurs antibiotiques couramment utilisées en clinique. Ce problème est amplifié en raison de la résistance acquise des entérocoques à tous les antibiotiques actuellement disponibles.

Dans notre étude des profils de résistance de nos isolats à partir des antibiogrammes a montré que toutes les souches d'Entérocoques isolées des différents aliments son résistantes à la triméthoprime-sulfaméthoxazole (sxt). Ce résultat est semblable à celui observé en 2013 en Grèce par Sergelidis et coll. [28] où un taux de 74% sur des souches isolées des poissons sont résistants. De plus ces souches présentent un taux de résistance à la tétracycline de 77,5% et de 62,5% à la péniciline . Ces résultats sont approximativement proches de ceux trouvés en France en 1998 (80%)[29] et en Algérie en 2012(82,4%) .[30]

La résistance à haut niveau aux aminosides (la kanamycine) présente un taux de 22.5% Cependant, d'autres études faites en Algérie en 2012 [30], en Espagne 2014 [31] et en Egypte 2015[32] ont présenté des taux plus élevés de résistance avec des pourcentages de 54,4%, 66% et 56% respectivement.

Concernant la famille des Macrolides et des Lincosamides, dans notre étude les souches testées présentent un taux de résistance à la clarithromycine de 77.5% , la plupart des ces souches sont isolées à partir des pâtisseries ,des légumes cuits et des poissons cuits.Ces résultats similaire à celle rapporté en Algérie en 2012 (80%) [32].

Quant à la sensibilité à la vancomycine , parmi les 40 souches testées , seulement les souches isolées des salades ont présenté un taux de résistance très élevé (80%) Une étude multicentrique française n'a rapporté que deux souches résistantes parmi 1310 souches d'*Enterococcus faecalis* [33,34]. En 2012, d'après une autre étude menée au CHU d'Annaba, le taux de résistance à la vancomycine était faible (3,2%)[31]. Cependant, un taux élevé de

50% a été retrouvé en Espagne en 2014 [31]. Un taux bas de 2% a été rapporté en Egypte 2015 [32].

Concernant la levofloxacin, le taux de résistance est de 22,5%. Ce taux est inférieur à celui rapporté en Chine en 2014 (58.4%)[35] et au *Cameroun en 2015* (84%)[36]. Alors que pour l'imipénème, le taux de résistance déterminé (67,5%) reste inférieur au taux obtenus en 2013 en Corée[37].

Conclusion :

Cette étude réalisée sur 40 échantillons avait pour objectif d'étudier la résistance des *Enterococcus* aux antibiotiques, principalement à la vancomycine, aux bêtalactamines et aux aminosides.

En vue de notre étude les conclusions suivantes ont été établies :

- ❖ Les résultats d'identifications de 40 souches isolées révèlent que 95% des isolats sont d'origine fécale.
- ❖ Le test d'hémolyse montre que 85% isolats sont hémolytiques et 15% sont non hémolytiques
- ❖ L'étude de profil de résistance montre qu'aucun isolat n'a été sensible à l'ensemble des antibiotiques testés. Le plus intéressant dans notre étude que tous les isolats sont résistants à la triméthoprine-sulfaméthoxazole (sxt) et 77,5% présentent une résistance à la tétracycline, et à la claréthromycine (77.5%) alors que 67,5%, 62,5% et 57,5% présentent une résistance à l'imipénème, à la pénicilline et à la vancomycine, respectivement.

Pour conclure, ce travail met le point sur l'importance de la surveillance de la résistance des germes aux antibiotiques que devrait jouer tout laboratoire de microbiologie notamment dans le domaine de l'agroalimentaire. Ce contrôle doit être réalisé périodiquement pour prévenir la survenue des infections d'origine alimentaire et pour une meilleure détermination du profil de résistance des bactéries circulant dans une région donnée.

Références bibliographiques :

- [1] **A.Aguilar-Galvez et al.(2011)**. Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie 16, 67–76.
- [2] **S.Francois-Ngo & J.Mainardi . (1998)**. *Enterococcus faecalis* : aspects bactériologique ,épidémiologique et thérapeutique.. *Feuill Biol* 39, 21–26.
- [3]**R. Facklam. (2002)**. What happened to the streptococci: overview of taxonomie and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev* 15, P: 613-30.
- [4] **E.M Moudewhenou . (2000)**. Place des germes non exigeant et les bactéries anaérobies . dans les infections respiratoires basses à Dakar. Th Pharm, Dakar, n° 90.
- [5] **F.Garmier & F.Denis.(2011)**. Cocci à Gram positif. *Bactériologie médicale*, N°32, P : 287-330.
- [6] **A. Bouvet et al.(2007)**. *Streptococcaceae* : *streptococcus*, *abiotrophia*, *granulicatella*, *enterococcus* et autres genres apparentés. précis de bactériologie clinique, 45, p : 845-884.
- [7] **McMillan et al.(2013)**. Updated model of group A Streptococcus M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin Microbiol Infect*, N°19, P: 222-9.
- [8]**G. Giraffa .(2003)**. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 215-222.
- [9] **JC. Franz . & W. Holzapfel .(2004)**. The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. In: Salminen S., Von Wright A. & Ouwehand A., eds. *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects*. 3 rd ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 199-248.

[10] **L.Knudtson & P. Hartman .(1993)**. Enterococci in pork processing. J. Food Prot., 56, 6-9.

[11] **A. Sánchez et al.(2010)**. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. Food Microbiol., 27, 955-961.

[12]**N.Ben Omar et al.(2004)**. Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. Syst. Appl. Microbiol., 27, 118-130.

[13] **S. Todorov et al.(2005)**. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. Int. J. Antimicrob. Agents, 25, 508-513.

[14]**S. Kawamoto et al.(2002)**. Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Appl. Environ. Microbiol., 68(8), 3830-3840.

[15] **A. Aguilar-Galvez (2011)**. Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique).

[16]**R. Mazri .(2015)**. Nouvelle approche des relations structures activités dans des molécules antibiotiques [en ligne]. thèse doctorat en science. Biskra : Université Mohamed khider biskra, 89p. Disponible sur : <http://thesis.univbiskra>.

[17]**J. Aboya Moroh .(2013)**. Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Agricultural sciences.Université de Bretagne occidentale – Brest ; Université Félix Houphouët-Boigny.

[18] **P. Bégué & J. Astruc.(1999)** Pathologie infectieuse de l'enfant [en ligne]. 2ème édition.

Paris : Masson, 1999, 612p. disponible sur :

<https://books.google.co.ma/books?id=sLB208vc8rUC&printsec=frontcover>

&hl=fr&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (consulté le 08.04.2018).

[19]**P.Courvalin et al.(2001)**. ANTIBIOTIQUES [en ligne]. Encyclopædia Universalis.,disponible sur : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/antibiotiques/>(consulté le 3.04.2018)..

[20] **C. Baudry & H. Brézellec .(2006)**. Microbiologie, immunologie. 2ème édition. Groupe Liaisons, 126p. ISBN (2915585261).

[21] **A. Lozniewski & C .Rabaud .(2010)** résistance bactérienne aux antibiotiques [en ligne].CCLINsud-est.NancyDisponible sur:
http://nosobase.chulyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2010_ResistanceAntibiotiques_CCLinSE.pdf (consulté le 06.04.2018).

[22] **X.Bertrand et al. (2005)**. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les bactériémies : données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) 1998–2003. *Médecine Mal Infect* 35, 329–334.

[23] **E.Masson. (1996)**. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. *EM-Consulte*.

[24] **Y.Cetinkaya et al.(2000)**. Vancomycin-Resistant Enterococci.*Clin Microbiol Rev* 13, 686–707

[25]**P.Courvalin et al. (1980)**. Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol* 143, 541–551.

[26]**M. Arthur et al. (1993)**. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 175, 117–127.

[27] **N.Oubrim et al.(2012)**. Détection des Entérocoques Fécaux et Escherichia Coli Résistant Aux Antibiotiques Isolés à Partir des Eaux Brutes Épurées et Cultures.

[28] **Sergelidis D et al.(2013)** La sensibilité aux antimicrobiens d' *Enterococcus* spp. isolé des poissons d'eau douce et le personnel et l'équipement des marchés de poisson dans le nord de la Grèce.

[29]**A.Y Hashem, et al (2015)**. Molecular characterization of *Enterococcus* spp. clinical isolates from Cairo, Egypt. *Indian J Med Microbiol* 33 Suppl, 80–86.

[30] **N.Djahmi et al. (2012)**. Molecular epidemiology of *Enterococcus* sp. isolated in a university hospital in Algeria. *Scand J Infect Dis* 44, 656–662.

- [31] **M. Medell et al. (2014).** Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. *Biomédica* 34, 50–7.
- [32] **Y.A Hashem et al. (2015).** Molecular characterization of *Enterococcus spp.* clinical isolates from Cairo, Egypt. *Indian J Med Microbiol* 33 Suppl, 80–86.
- [33] **R. Leclercq. (1994).** Epidémiologie des infections nosocomiales à entérocoques. *Médecine Mal Infect* 24, 199–206.
- [34] **K. Streffet al. (1996).** Entérocoques au CHRU de Montpellier durant le mois de septembre 1993 : espèces isolées, répartition en fonction du prélèvement, rôle pathogène, sensibilité aux bêta-lactamines, aminosides, glycopeptides. *Med Mal Infect* 6–7, 704–713.
- [35] **J. Environ. (2014)** Prévalence et résistance aux antimicrobiens des espèces d'entérocoques
- [36] **JH. G Kamga et al. (2015),** Résistance aux antibiotiques des entérocoques responsables des infections urinaires au Centre Hospitalier et Universitaire et à l'Hôpital Central de Yaoundé (Cameroun), *African Journal of Pathology and Microbiology*, art235913. doi:10.4303/ajpm/235913 .
- [37] **J. Korean & J Urol. (2013)** Profils de résistance aux antibiotiques et parenté génétique d'*Enterococcus faecalis* et d' *Enterococcus faecium* isolés chez des chiens de travail militaires en Corée.

Annexe A : Isolement des *Enterococcus* :



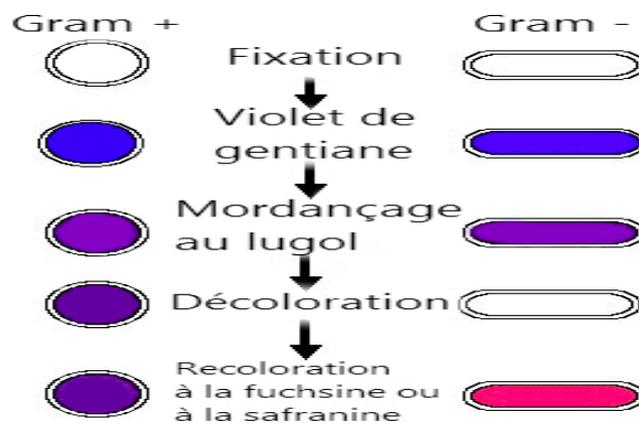
Slanetz avant la culture



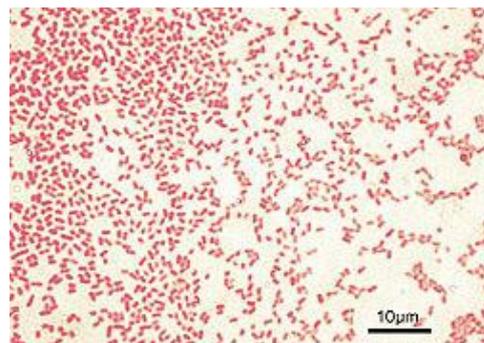
Slanetz après la culture

Annexe B : Identification bactériologique :

1- Etapes de la coloration de Gram :



2- Observation microscopique après la coloration de Gram

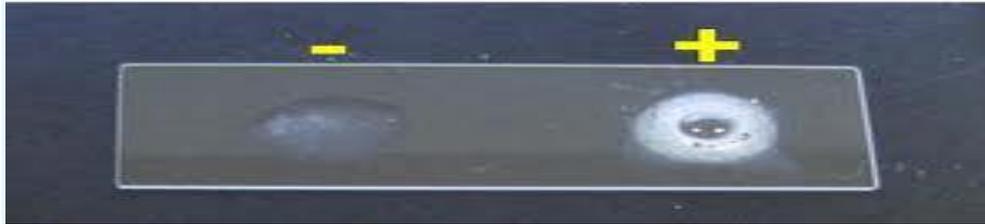


Vue microscopique de cocci Gram positif

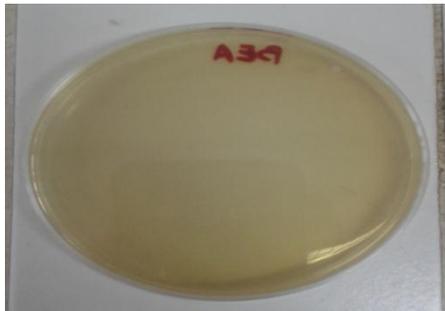
Vue microscopique de cocci gram négatif

Annexe C : Identification biochimique :

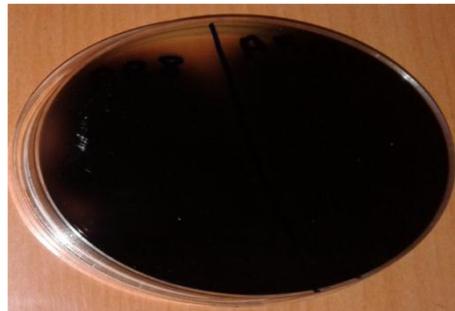
1- Test de la catalase :



2- Test de bile esculine :



BEA avant la culture

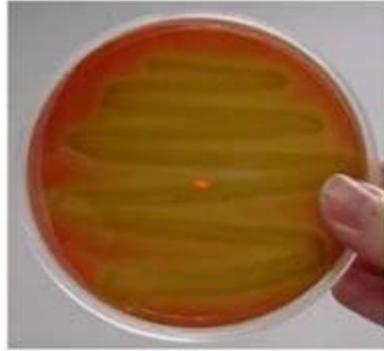


BEA après la culture

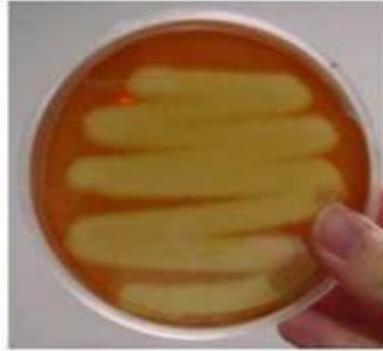
3- Test d'hémolyse :



La gélose au sang avant la culture



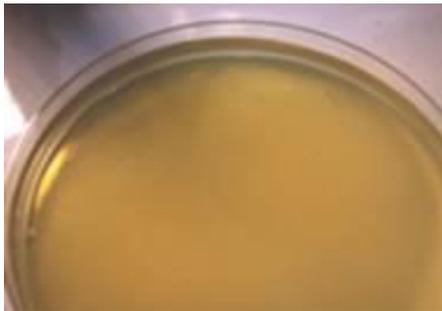
Beta hemolyse



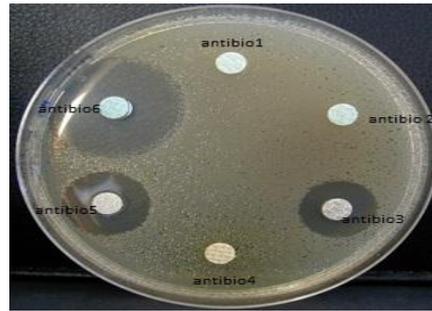
alpha hemolyse

La gélose au sang après la culture

Annexe D: Antibiogramme :



Milieu MH avant la culture



Milieu MH après la culture

Annexe E: Composition des milieux de culture :

<p>➤ Milieu de slanetz :</p> <p>-Agar-agar.....10 g -Peptone.....20 g -Azide de sodium.....0,4 g Glucose.....2 g -TTC0,1 g -pH =7,2</p>	<p>➤ Milieu de gélose au sang :</p> <p>-Mélange spécial de peptones.....23 g -Amidon.....1g -NaCl.....5 g -Agar.....10g -Sang de mouton.....10% - pH = 7,3</p>
<p>➤ Milieu BEA</p> <p>-Peptone:.....17,0 g -Peptone pepsique de viande:.....3,0 g -Extrait de levure:.....5,0 g -Esculine :.....1,0 g -Citrate de sodium:.....1,0 g -Citrate de fer ammoniacal:.....0,5 g -Bile de bœuf déshydratée:.....10,0 g -Azide de sodium :0,25 g -Chlorure de sodium:.....5,0 g -Agar:.....13,0 g -pH = 7</p>	<p>➤ Milieu BHI :</p> <p>-Infusion cœur-cervele (matières solides).8,0 g - Digestion peptique de tissu animal..... 5,0 g - Digestion pancréatique de caséine..... 16,0g - Chlorure de sodium5,0g - Glucose2,0g - Phosphate d'hydrogène disodique2,5g - Gélose.....13,5g - pH 7,4 ± 0,2</p>
<p>➤ Milieu MH :</p> <p>-infusion de viande de bœuf :..... 300,0 ml -peptone de caséine :..... 17,5 g -amidon de maïs :1,5 g -agar :..... 17,0 g -pH = 7,4</p>	

