

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur et de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité : Biotechnologie marine

Thème :

Caractérisation et évaluation de la résistance aux antibiotiques chez
les entérocoques isolés dans le milieu marin

Présenté par :

BOUATROUS IKRAM

KARA ASSIA

Soutenu le 06/07/2022 devant le jury composé de :

Mme MAHDID S.	Maitre Assistante A	Présidente
Mr KADA M.	Maitre-Assistant A	Examineur
Mr AIT SAIDI A.	Maitre de conférences B	Examineur
Mme CHAOU N.	Maitre Assistante A	Promotrice
Mme ALOUACHE S.	Maitre de conférences A	Co-Promotrice

REMERCIEMENT :

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

Nous tenons avant tout à remercier notre promotrice, Mme CHAOU, qui a accepté de nous encadrer, qui nous a guidé 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 notre profonde gratitude pour avoir dirigé ce mémoire. Nous la remercions vivement d'avoir suivi et orienter ce travail.

Un grand merci pour notre Co-promotrice Mme ALOUACHE pour sa rigueur scientifique.

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

Nos remerciements vont à tout le personnel de laboratoire, En fin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

Dédicace :

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A l'homme, mon précieux offre de Dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect mon père **Ali**.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui effort pour me rendre heureuse mon adorable mère **Fatima**.

A mes sœurs Sonia et **Ouzna** et A mes frères **Yacin, Mohamed** et **Ahcen** et A mon fiancé **Mohamed**

Merci pour votre soutien moral, votre confiance et vos conseils précieux, qui m'ont aidé dans les moments difficiles.

Je vous souhaite le bonheur et la réussite dans vos vies

A toute ma famille, et A mes amis particulièrement **Nawal**, A mon binôme **Ikram**, sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur, je vous dis merci.

ASSIA

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail,

A mes grands-pères « **Massoud** » et « **Mokhtar** » Allah yarhamhoum.

A mes grandes mères « **Mahbouba** » et « **Fatima** » "yemma" qui m'ont toujours donné l'espoir de vivre, le courage et les encouragements durant toute ma vie. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A mon très cher père « **Zahi** » mon précieux offre du Dieu, pour son soutien, son sacrifice, et surtout pour son amour, et qui a été toujours à mes cotes à tout moment, je voudrais te remercier pour Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Et que ce travail soit le meilleur cadeau pour que je puisse t'offrir. Que Dieu te protège pour nous.

A ma très chère mère, « **Fatiha** » la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui fait tout pour ma réussite et mon bonheur, qui m'a encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Que Dieu la garde.

A mes chers frères « **Bilal** » et « **Khaled** » et leurs épouses, qui m'ont toujours conseillé, encouragé tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mes chères sœurs « **Besma** », « **Nabila** », « **Lamia** » et leurs maris, Grâce à vous, j'ai trouvé tout le courage, le réconfort et le soutien possibles, et la force de continuer. Qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Elles m'ont Chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A mon adorable sœur « **Hanane** » : La moitié de mon cœur. Merci de me suivre et de m'encourager durant toute ma vie, mes projets et mes rêves ; tu me fais toujours sentir que tu es derrière moi et que tu crois en moi et ton support fait une grande différence dans ma vie. J'ai toujours la chance d'avoir une sœur comme toi.

Merci d'être là pour moi et d'être une source de soutien et d'amour ; sans oublier les encouragements de son mari « **Brahim DJOUAMA** »,

A mes enseignants ; « **Samir TALHI** », « **Saida DJOUAMA** », « **Houssine ZEGHNOUF** » votre enseignement et vos conseils, vos consignes, je tiens à vous dire que vous avez été des excellents professeurs ! Je vous remercie profondément d'avoir partagé vos connaissances avec nous, d'avoir toujours été juste dans votre éducation et enseignement. Sans oublier les autres enseignants qui m'ont aidé durant toutes les années d'étude.

A mes chères collègues à l'ENSSMAL, spécialement, « **Katia HADDAG** », « **Batoul LAIREDJ** »,
et à tous les membres de ma spécialité **Biotechnologie** pour leurs aides et soutien durant mon
cursus.

A mes chères amies « **Nerdjess** », « **Amani** », « **Sarra** », « **Roufaida** », « **Fatima** », « **Nadjet** »,
Pour leurs supports dans les moments difficiles, Sans oublier les amies d'enfance ; « **Meriem** »,
« **Zakia** », « **Lamisse** », « **Yasmin** » et à mon binôme « **Assia** » pour son soutien moral, sa
patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

A tous les cousins, les voisines, les amies que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs
amours et leurs encouragements.

IKRAM

Liste des abréviations

AAC : acétyl transférase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANT : nucléotidynil transférase

APH : phosphotransférase

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

BEA: Gélose Bile Esculine Azide

BHIB: Brain Heart Infusion Broth (bouillon d'infusion cerveau –cœur)

BLBVB : Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

NPP : Nombre le Plus Probable

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PG : Paroi peptidoglycane

PLP : Protéine liant Pénicillines

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)

TTC : Chlorure de 2, 3,5 triphényltétrazolium

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différentes familles d'antibiotique et leur mécanisme d'actions	12
Tableau 02 : les coordonnées géographique de la plage Ain Taya (coordonnés GPS)	
Tableau 03 : les coordonnées géographique de la plage bateau cassé (coordonnés GPS)	
Tableau 04 : les coordonnées géographique de la plage Sirène (coordonnés GPS)	
Tableau 05 : les coordonnées géographique de la plage Sidi Fredj (coordonnés GPS)	
Tableau 06 : les coordonnées géographique de la plage Kheloufi (coordonnés GPS)	
Tableau 07 : les coordonnées géographique de la plage Colonel Abbes (coordonnés GPS)	
Tableau 08 : Liste d'antibiotique en disque utilisés	32
Tableau 09 : Résultats des paramètres physicochimiques.....	35
Tableau 10 : Un tableau récapitulatif des différent test d'identification des entérocoques.....	46

Annexes :

Tableau 04 : Résultats de l'antibiogramme des souches d'entérocoques étudiées

Tableau 05 : Dénombrement des entérocoques et des coliformes isolés de l'eau de mer

Tableau 06 : Les normes de salubrité des plages, normes algérienne (Décrit exécutif n°93-164 du 10 juillet 1993)

Les composants des milieux de cultures

Listes des figures

Figure 01 : Arbre phylogénétique de genre <i>Enterococcus</i> basé sur le séquençage du gène codant pour ARNr 16S	5
Figure 02 : Sources d'entérocoques dans les plans d'eau.	6
Figure 03 : <i>Enterococcus faecalis</i> observé é au microscope électronique	7
Figure 04 : Aspect des coliformes au microscope électronique	10
Figure 05 : Formes acquisition d'ADN.....	14
Figure 06 : Mécanises de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques	15
Figure 07 : Localisation géographique des stations étudiées (Google Earth pro)	19
Figure 08 : Recherche des coliformes.....	22
Figure 09 : Recherche des entérocoques.....	24
Figure 10 : La méthode du nombre le plus probable NPP	26
Figure 11 : Le test de biofilm.....	31
Figure 12 : Disposition des disques d'antibiotiques.....	33
Figure 13 : Aspect des coliformes sur le milieu Tergitol.....	36
Figure 14 : Résultat de dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans les six plages, exprimé en UFC/100ml.....	36
Figure 15 : Aspect des entérocoques sur le milieu BEA.....	37
Figure 16 : Variation des charges des entérocoques au niveau des six plages étudiées.....	37
Figure 17 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages (Eau de mer).....	38
Figure 18 : Résultat de dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans les six plages Étudiées dans le sédiment.....	40

Figure 19 : Les concentrations des entérocoques trouvés par la méthode NPP dans les sédiments.....	41
Figure 20 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages (sédiments) sur le milieu BEA,.....	42
Figure 21 : Aspect des entérocoques après la coloration de Gram observés au microscope Optique (GrX100).....	43
Figure 22 : Résultat du test catalase.....	44
Figure 23 : Résultat du test oxydase.....	44
Figure 24 : Résultat du test de résistance à la salinité.....	44
Figure 25 : Résultat du test de la résistance à la chaleur.....	45
Figure 26 : Résultat du test de Tellurite de potassium.....	45
Figure 27 : Résultats de test de production de biofilm pour les souches étudiées.....	47
Figure 28 : Résultat d'antibiogramme d'une souche isolée de l'eau de mer	48
Figure 29 : Résultat d'antibiogramme d'une souche isolée du sédiment.....	48
Figure 30 : Prévalence de la résistance de 42 souches d'entérocoques isolées aux antibiotiques.....	49

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Listes des figures

Introduction.....	2
Chapitre I : Généralités.....	4
I.1. Description des entérocoques.....	4
I.1.1. Historique.....	4
I.1.2. Taxonomie.....	4
I.1.3. Habitat.....	6
I.1.4. Caractéristiques	7
I.1.5. Pathogénicité des entérocoques	8
I.1.5.1. Les facteurs de virulence	8
• La substance d'agrégation	8
• La cytosine et (beta hémolysine)	8
• Les enzymes hydrolytiques.....	8
La gélatinasse.....	8
Hyaluronidase.....	9
• Formation de biofilm	9
I.2. Les coliformes totaux et fécaux.....	9
I.3. Antibiotique :.....	10
1.3.1. Historique.....	10
1.3.2. Définition	10
1.3.3. Origine	11
1.3.4. Le spectre d'activité	11
1.3.5. Mode d'action	11
I.4. Antibiorésistance	12
I.4.1. La résistance naturelle	12
I.4.2. La résistance acquise	13
I.4.3. La résistance des entérocoques aux antibiotiques	14
• Résistance aux bêta lactamine	15

•	Résistance aux glycopeptides	15
•	La résistance aux aminosides	16
•	La résistance aux tétracyclines	16
•	La résistance aux macrolides	16
•	La résistance aux quinolones et fluoroquinolones	16
•	Application des entérocoques en biotechnologie.....	17
•	Utilisation comme probiotique	17
Chapitre II :	Matériel et Méthodes	18
II.1.	Présentation de la zone d'étude	19
II.2.	Echantillonnage	20
II.3.	Analyse microbiologique	21
II.3.1.	L'eau de mer	21
II.3.1.1.	Dénombrement des coliformes totaux et fécaux	21
II.3.1.2	Dénombrement des entérocoques	22
II.3.2.	Sédiment	25
A.	Les coliformes	25
B.	Les entérocoques	26
II.3.3.	Prévalence de la résistance aux antibiotiques des entérocoques.....	27
II.4.	Identification des entérocoques	28
II.4.1.	Coloration de gram	28
II.4.2.	Les tests d'identification des entérocoques:.....	28
A.	Test de la catalase	28
B.	Test oxydase	29
C.	Test de la résistance à la salinité	29
D.	Test de résistance à la chaleur	29
E.	Test de résistance au Tellurite de Potassium.....	30
II.5.	Production de biofilm	30
II.6.	Étude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme.....	31
Chapitre III.	Résultats et Discussion	34
III.1.	Résultats des paramètres physicochimiques	35
III.2.	Résultats des analyses microbiologiques	36
•	Eaude mer.....	36
III.2.1.	Les coliformes totaux et thermo tolérants	36

III.2.2. Les entérocoques.....	37
• Sédiment.....	40
III.2.3 : Les coliformes totaux et thermo tolérants.....	40
III.2.4 : Les entérocoques	41
III.3. Identification des entérocoques	43
a/ Coloration de Gram	43
b/Test de catalase	44
c/Test d'oxydase	44
d/Test de la résistance à la salinité	44
e/Test de la résistance à la chaleur.....	45
f/Test de tellurite de potassium	45
g/Test de production de biofilm	47
III.4. Antibiogramme	48
Discussion générale	51
Conclusion	56

Bibliographie

Annexe

Introduction

Introduction

Introduction

Les bactéries sont essentielles à l'équilibre physiologique des organismes multicellulaires et sont également impliquées dans le développement immunitaire. (Zitvogel et al. 2017 ; Daillère et al. 2016 ; Vétizou et al. 2015 ; Viaud et al. 2013). Néanmoins, certaines bactéries sont pathogènes et causent de nombreuses infections telles que *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.* (Pendleton et al. 2013)

Les entérocoques sont considérés comme des agents pathogènes parmi les plus courants, avec un taux de mortalité élevé pouvant atteindre 61 % chez certains patients (De Fátima Silva Lopes et al. 2005).

Dans ce groupe, on retrouve *Enterococcus faecium*, espèce moins virulente, et responsable de 12% d'infection tandis que l'espèce *Enterococcus faecalis* est responsable de 80 à 90% des infections. Les infections causées par ces bactéries sont : la diarrhée, la mammite, des infections associées au cathéter, au tractus urinaire et à la cholangiohépatite chez les petits animaux. Chez l'homme, les entérocoques sont responsables d'infections similaires telles que des bactériémies opportunistes, des endocardites, des infections du tractus urinaire et des plaies chirurgicales, spécialement chez les patients immuns supprimés. (A.M. Hammerum, 2012)

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positifs, catalase négative, anaérobies facultatives, espèce commensale faisant partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux, elles colonisent également la peau et le système génito-urinaire et peut être trouvé dans l'environnement où ils sont considérés comme un indicateur de contamination fécale des eaux. Ils sont également utilisés comme probiotique c'est-à-dire ils peuvent produire des bactériocines qui inhibent la croissance d'autres microorganismes pathogènes. Ils jouent un rôle important dans la conservation et la fermentation des aliments. (Franc. E et Collins. N. A, 2019)

Ces bactéries sont multi résistantes aux antibiotiques tels que les bêta lactamines, les aminoglycosides, les glycoprotéines, les quinolones et les tétracyclines. Ce qui représente un problème majeur dans la santé publique et en pratique clinique. (Soussy, 2007)

Le principal objectif de ce modeste travail est dans un premier temps de rechercher et d'isoler des entérocoques à partir de l'eau de mer et des sédiments issus des plages exposées à différents

Introduction

niveaux d'apport anthropique et dans un deuxième temps de calculer la prévalence afin d'évaluer et de caractériser la résistance aux antibiotiques de certaines souches d'entérocoques isolées. Ceci nous permet de connaître leur capacité de produire des substances antimicrobiennes donc d'utiliser comme probiotique.

Chapitre I : Généralités

Généralités

I.1. Description des entérocoques :

I.1.1. Historique :

Le nom streptocoque a été utilisé par Andrewes et Horder en 1906, pour distinguer les bactéries d'origine fécale, qui fermentent le lactose et le mannitol, et qui causent des endocardites aiguës. **(Andrewes et Amp ;Horder, 1906)**

Sherman sépara les streptocoques en quatre groupes : streptocoques fécaux (entérocoques), pyogène, viridans et lactique. **(Sherman, 1937)**

Dans les années 1970, Kalina à proposer de créer un taxon *Enterococcus* basé sur l'aspect phénotypiques des espèces du groupe des entérocoques. **(Kalina, 1970)**

Jusqu'à l'année 1984 Schleifer et Kilpper-Balz et grâce à des techniques génétiques (hybridation ADN-ADN et de séquençage de l'ARN16S) ont reclassé les bactéries *streptococcus faecium* et *streptococcus faecalis* comme des espèces entérocoques. **(Schleifer et Kilpper-Balz, 1984)**

I.1.2. Taxonomie :

Le genre *Enterococcus* est classé dans :

Domaine : Bacteria,

Phylum : Firmicutes,

Classe : Bacilli,

Ordre : Lactobacillales,

Famille : *Enterococcaceae*,

Le genre Streptocoque est classé dans :

Domaine : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli,

Ordre : Lactobacillales,

Famille : *Streptococcaceae*

Sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S il existait 47 espèces en 2014 (Figure 1) et 55 espèces en 2017 (Isnard, 2017), classées en sept groupes. Les espèces *E. faecium* et *E. faecalis* sont les principales espèces représentant ce genre **(Figure 01) (Van Tyne, M. Gilmore, 2014).**

La classification ancienne d'entérocoques est basée sur le système Lancefield Serological Typing, les *Enterococcus* étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D). Avec

Généralités

l'avènement de la biologie moléculaire et de nouvelles techniques, Schleifer et al. (1984) ont reclassé les bactéries *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* comme *Enterococcus*

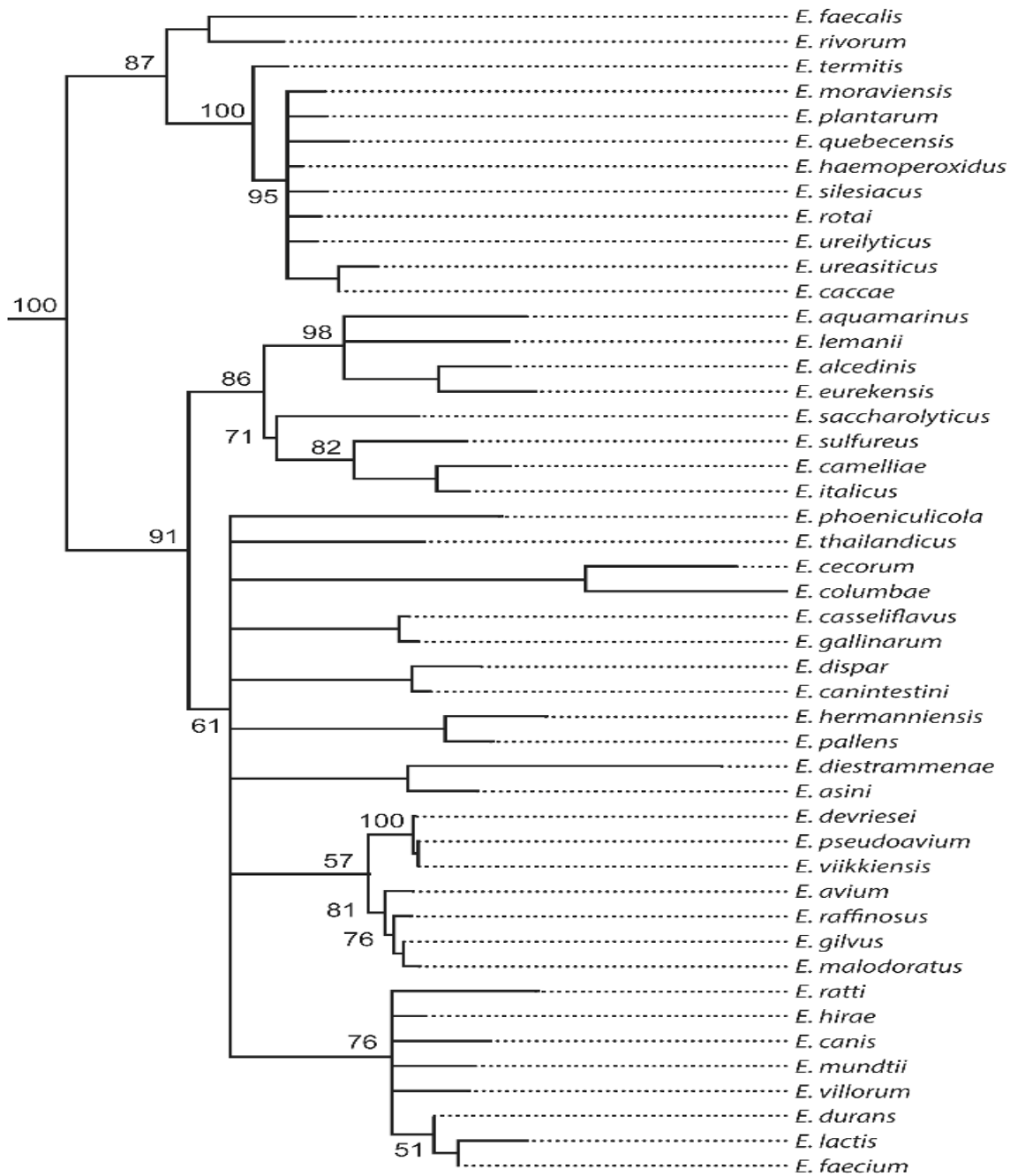


Figure 01 : Arbre phylogénétique de genre *Enterococcus* basé sur le séquençage du gène codant pour ARNr 16S (D. Van Tyne, M. Gilmore, 2014)

Généralités

I.1.3. Habitat :

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires, qui s'adaptent aux différents écosystèmes notamment ; l'eau (usée, l'eau de mer et l'eau douce), sur la surface des végétaux, dans le sol, les produits alimentaires ainsi que le tractus gastro-intestinal des animaux et de l'homme (**Figure 02**) (**Manero et al.1999**).

Chez l'homme, on peut les retrouver dans le tractus respiratoire supérieur, la cavité orale, le vagin et la peau. (**Cindy-love Tremblay, 2012**)

Les espèces *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* sont les espèces les plus fréquemment identifiées dans les fèces de l'homme. (**Murray, 1990**)

En plus de se retrouver dans l'intestin de l'homme et des animaux, elles peuvent également contaminer différents aliments tels que les produits laitiers, les viandes et les produits de la pêche. (**Cindy-love Tremblay, 2012**)

Les deux espèces importantes en clinique sont *E. faecium* et *E. faecalis* (**Stucki K.et al, 2014**).

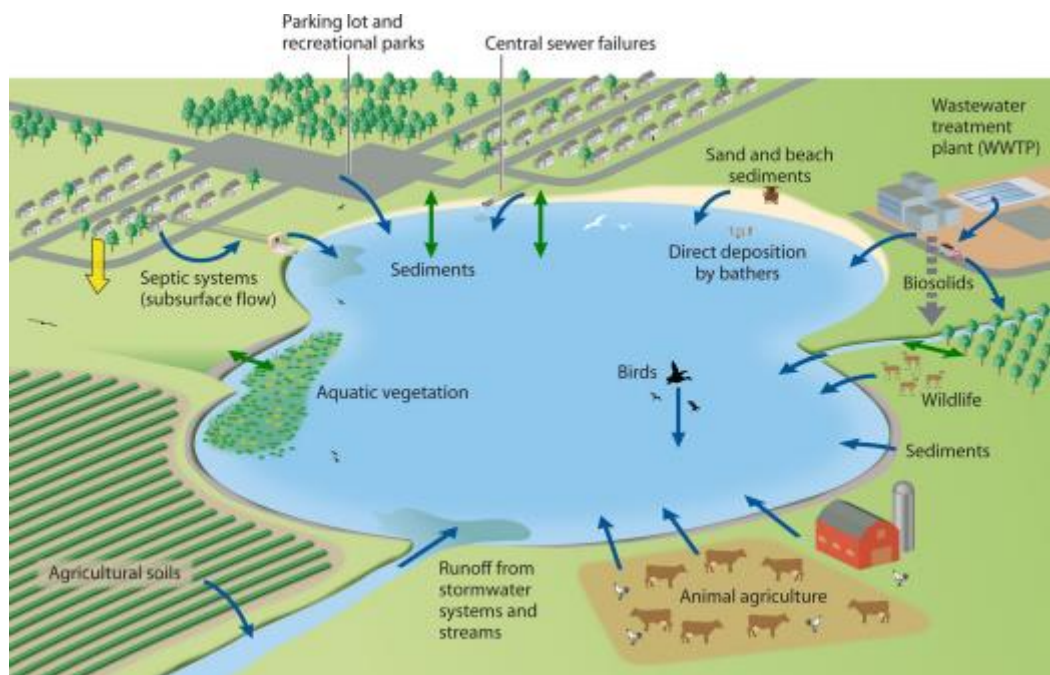


Figure 02 : Sources d'entérocoques dans les plans d'eau. (**Muruleedhara N. et al ,2021**)

Généralités

I.1.4. Caractéristiques :

Les Entérocoques sont des bactéries lactiques possédant le pouvoir d'inhiber la croissance de certains germes non lactiques et capables de produire des substances antimicrobiennes comme les bactériocines, c'est pourquoi ils sont utilisés dans la conservation des aliments. (Aguilar-Galves A. et al, .2012).

Le groupe bactérien *Enterococcus* se présente sous forme de cocci isolées, par paire ou encore sous forme de chaînette (Schleifer et al, 1984).

Ce sont des bactéries à Gram-positif, oxydase négative, généralement catalase négative, non-sporulant, anaérobie facultatif. (Cindy-Love Tremblay, 2012)

Les entérocoques produisent des colonies présentant une coloration rouge, rose sur le milieu Slanetz ou noire visible sur la boîte contenant le milieu BEA. (Muruleedhara Net al 2021)

Ils sont généralement des homofermentaires. Ils produisent essentiellement de l'acide lactique, de l'acétate, du formiate et de l'éthanol. (Schleifer et al, 1984)

Les entérocoques sont des micro-organismes mésophiles qui poussent à des températures comprises entre 10 °C et 45 °C dans 6,5 % de NaCl à pH 9,6 et à survivre à 60°C pendant 30 min. Ils sont capables de métaboliser différents types de sucres tels que ; le N-acétyl glucosamine, le D-fructose, le galactose, le glucose, le lactose le maltose et le ribose. (Aguilar-Galves A. et al, .2012).

Les *Enterococcus faecalis* (Figure03) sont capables de résister au tellurite de potassium, d'hydrolyser de l'arginine et d'effectuer certaine fermentation telle que celle du mannitol. (Leclercq R.2001)



Figure 03 : *Enterococcus faecalis* observé é au microscope électronique (Santé journal des femmes, 2022).

Généralités

I.1.5. Pathogénicité des entérocoques :

La pathogénicité est la capacité des microorganismes à provoquer des infections. Les entérocoques ne sont pas trop virulents. Pour qu'ils deviennent pathogènes, ils doivent exprimer des facteurs de virulence (**Jett et al., 1994 ; Ben Omar et al., 2004**).

I.1.5.1. Les facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence des entérocoques sont sujets à davantage d'études étant donné leur présence de plus en plus inquiétante lors d'infections nosocomiales et à leur résistance accrue aux antibiotiques (**Cindy-Love Tremblay, 2012**).

Plusieurs facteurs de virulence ont été associés aux infections à entérocoques tant chez l'homme que chez les animaux, les plus couramment étudiées sont :

- **La substance d'agrégation :**

Une glycoprotéine codée par un gène plasmidique qui favorise la colonisation de l'hôte et le transfert de plasmide (**Jett et al. 1994**).

- **La cytolysine et (beta hémolysine) :**

C'est une exotoxine qui présente des propriétés hémolytiques envers les érythrocytes et cause des infections mortelles par une lyse des cellules animales en générant des pores dans la membrane cellulaire. Sa production permet de contourner les réactions immunitaires chez l'hôte (**Le Blanc, 2006**).

- **Les enzymes hydrolytiques :**

Elles comprennent ; la gélatinase, la sérine protéase et la hyaluronidase qui peuvent causer des dommages aux tissus de l'hôte. Ces protéases peuvent provoquer un dysfonctionnement des tissus conjonctifs, dérégulation des cellules du système immunitaire ainsi que la dégradation des protéines spécifiques de l'hôte (**Cindy-Love Tremblay, 2012**).

- **La gélatinase :**

Est une zinc métallo protéase retrouvée fréquemment chez *E. faecalis*, elle est capable de décomposer certaines protéines telles que la gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine et d'autres petits peptides (**Cindy-Love Tremblay, 2012**).

Généralités

Elle participe à la formation de biofilm ce qui peut augmenter la capacité des entérocoques à coloniser les tissus, et à persister dans les sites d'infection (**Del Papa et al. 2007**).

- **Hyaluronidase :**

C'est un constituant de la matrice extra cellulaire des cellules animales qui dégradent l'acide hyaluronique (**Kayser, 2003**).

- **Formation de biofilm :**

Les biofilms sont des populations de cellules fixés de manière irréversible à diverses surfaces biotiques et abiotique et enfermées dans une matrice hydratée de substance exopolymères, de protéines, de polysaccharides et d'acide nucléique, les biofilms contribuent à la résistance des bactéries aux antibiotiques rendant leur éradication extrêmement difficile (**Yomna Hashem, et al, .2017**).

Plusieurs études ont montré qu'*E. faecalis* produit du biofilm plus souvent que *E. faecium* et que la formation de biofilm peut être un facteur important dans la pathogenèse des infections à entérocoques (**Cindy-Love Tremblay, 2012**).

Des études sur les biofilms ont révélé la présence de groupes de cellules différenciées et structurées avec des propriétés communautaires. (**Costerton et al, 1987**).

Les progrès récents dans notre compréhension génétique et moléculaire du comportement de la communauté bactérienne indiquent des cibles thérapeutiques qui peuvent fournir un moyen de contrôler les infections par biofilm.

I.2. Les coliformes totaux et fécaux :

L'expression « coliformes totaux » regroupe plusieurs espèces bactériennes de la famille des Entérobactéries qui sont anaérobies facultatives, à Gram négatif, en forme de bâtonnet (**figure 04**) et produisant des colonies foncées à reflets vert métallique en moins de 24 heures, à 35 °C sur un milieu de type m-Endo contenant du lactose et tergitol. (**CEAEQ, 2014**).

Les coliformes totaux sont des bactéries indicatrices de pollution d'origine organique, dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable. (**CEAEQ, 2014**).

Généralités

Alors que les coliformes fécaux, ou coliformes thermos tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C. Ce groupe englobe 5 genres : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Livinia*.

E. coli représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermo tolérants détectés. La présence de coliformes fécaux indique habituellement une contamination d'origine fécale. Plusieurs coliformes fécaux dans l'eau ne sont pas d'origine fécale, ils proviennent plutôt d'eaux enrichies en matière organique, tels que les effluents industriels du secteur des pâtes et du papier ou de la transformation alimentaire. (CEAEQ, 2016).



Figure 04 : Aspect des coliformes au microscope électronique (Aquaportail).

I.3. Les antibiotiques :

1.3.1. Historique :

En 1928, Alexander Fleming observa une colonie de champignon (*Penicillium notatum*) qui peut inhiber la croissance d'une bactérie de staphylocoques, mais il ne put pas extraire la substance responsable de cet effet. C'est en 1940 qu'Howard Florey et Ernst Boris Chain, réussirent à isoler cette substance, cette dernière à une efficacité remarquable sur le pneumocoque chez la souris. Les premiers essais sur l'homme sont concluants. (Vidal.2009)

Depuis les découvertes de la Pénicilline en 1928 par Alexander Fleming, des sulfamides en 1932 par Gerhard Domagk et la streptomycine en 1944 par Selman Waksman, qui valurent

à chacun de ces trois chercheurs le prix Nobel. De très nombreuses substances ayant une activité antibactérienne ont été isolées. (Berche et al. 1988)

Généralités

1.3.2. Définition :

Un antibiotique est une substance naturelle, synthétique ou semi synthétique capable d'inhiber ou de tuer certains microorganismes c'est-à-dire qu'il dérègle le métabolisme de certains microorganismes sans affecter les cellules humaines ou animales. (**Singleton, 2005**).

1.3.3. Origine :

- **Naturel :**

Certains microorganismes peuvent synthétiser des antibiotiques tels que les champignons (*Penicilium, Cephalosporium*) et les bactéries telles que (*Streptomyces, ...*). (**Gaudy et Bbuxeraud, 2005**)

- **Synthétique :**

Obtenu par voie chimique (sulfamides, acide nalidixique). (**Gaudy et Bbuxeraud, 2005**)

- **Semi-synthétique :**

Obtenus à partir des antibiotiques naturels avec modification de leur structure chimique en laboratoire. (**Gaudy et Buxeraud, 2005**)

1.3.4. Le spectre d'activité :

Le spectre d'activité est la liste des bactéries sur lesquelles l'antibiotique est actif. Il est dit large lorsque l'antibiotique agit à la fois sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et étroit lorsqu'il n'est actif que sur l'un de ces deux types de bactéries, il est dit limité quand il est actif avec des bactéries à Gram positif et quelques Gram négatif. (**Gaudy et Buxeraud, 2005**)

1.3.5. Mode d'action :

Les antibiotiques agissent sur les bactéries de diverses manières. Certains empêchent la formation de leurs enveloppes protectrices (membrane et paroi). D'autres substances agissent en bloquant certaines réactions chimiques indispensables à leur métabolisme. Certains antibiotiques empêchent la traduction de leur information génétique (leurs gènes) en protéines.

Généralités

Tableau 01 : Les différentes familles d'antibiotique et leur mécanisme d'actions
(Nauciel et Vilidé, 2005).

Famille	Antibiotique	Mode d'action
Béta lactamines	Ampicilline amoxiline	Antibiotiques agissant sur la paroi : inhibition de la formation de la paroi bactérienne
	Céfatoxine Céftazidine	
Glycopeptides	Vancomycine Teicoplanine	
Aminosides	Gentamicine	Antibiotiques inhibant la synthèse protéique
Macrolides	Sipramicine	
Tétracyclines	Tétracycline Doxycyclines	
Quinolones et Fluoroquinolones	Acide nalidixique Ciprofloxacines	Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques : inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN

I.4. Antibiorésistance :

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'une bactérie à résister aux effets des antibiotiques. Il existe deux types de résistance des bactéries pour les antibiotiques les résistances naturelles et les résistances acquises. (D. Yala.2001)

I.4.1. La résistance naturelle :

Est retrouvée chez la totalité des souches d'une espèce bactérienne et dépend des capacités intrinsèques de la cellule bactérienne.

Les bactéries résistantes naturellement aux antibiotiques possèdent des gènes de résistance dans leur patrimoine génétiques, elles transmettent à leur descendance leur gène de résistance qui donne des générations des bactéries pleinement résistantes c'est ce qu'on appelle " transfert vertical (D. Yala.2001).

I.4.2. La résistance acquise :

Cette résistance est due soit à une mutation génétique soit par l'acquisition de la bactérie d'un gène transférable ; plasmide, transposon, et les intégrons, on parle d'un transfert horizontal. **(D. Yala.2001)**

Ce gain génétique permet aux bactéries de s'adapter à leur environnement en présence d'antibiotique et donc répondre favorablement à la pression de sélection induite par ces derniers. **(Christophe ISNARD., 2017)**

✓ Plasmides :

Les plasmides sont des petits fragments d'ADN circulaires présents dans la cellule bactérienne et indépendants du génome bactérien, ils jouent un rôle important dans le transfert horizontal des gènes dont ceux de résistance porté par des plasmides, transférables par conjugaison, transduction ou transformation à d'autres bactéries. **(D. Yala.2001)**

✓ Transposant :

Des éléments génétiques qui peuvent s'intégrer soit dans des plasmides ou des chromosomes et sont transférables d'une bactérie à une autre. **(D. Yala.2001)**

✓ Intégrons :

Constitués de gènes sous forme de cassette, ces éléments sont capables d'intégrer par recombinaison. **(D. Yala.2001)**

L'acquisition d'ADN contenant des gènes de résistance se fait par conjugaison, transformation ou transduction.

➤ La conjugaison :

Consiste en un mécanisme para-sexuel de transfert de matériel génétique, d'une bactérie donatrice (male) à une bactérie réceptrice (femelle) porté par des plasmides **(figure 05) (Cindy-Love Tremblay, 2012).**

Généralités

➤ La transformation :

Est l'incorporation d'ADN nu du milieu externe, la bactérie réceptrice doit produire des protéines pour faciliter la pénétration de l'ADN (**figure 05**) (Cindy-Love Tremblay, 2012).

➤ Transduction :

Est un processus qui consiste en un transfert de matériel génétique (ADN bactérien), d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse, par l'intermédiaire d'un vecteur viral (un bactériophage) ; ce dernier rencontre la bactérie spécifique, injecte son génome pour qu'il puisse exprimer les protéines nécessaires à sa multiplication (**figure 05**) (Cindy-Love Tremblay, 2012).

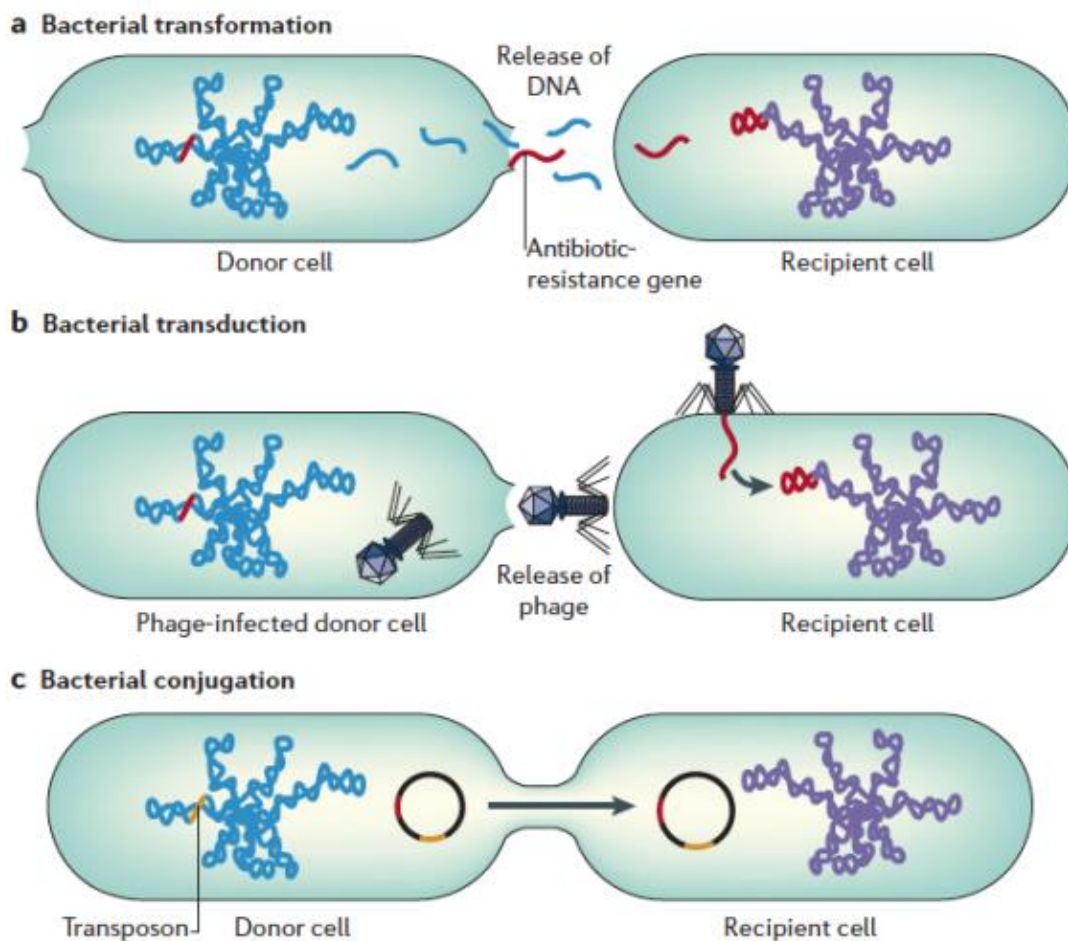


Figure 05 : Formes d'acquisition d'ADN. (Theresa Wagner, 2018)

I.4.3. La résistance des entérocoques aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques s'est principalement développée durant les 50 dernières années par l'utilisation répandue et fréquente des antibiotiques favorisant une pression de sélection (Matyara et al. 2008).

La résistance des bactéries aux antibiotiques est médiée par trois mécanismes : la diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par imperméabilité membranaire, la diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible due à une modification ou une protection de celle-ci, la modification ou l'inactivation de l'antibiotique lui-même par un processus enzymatique (Figure 06) (Cindy-Love Tremblay, 2012).

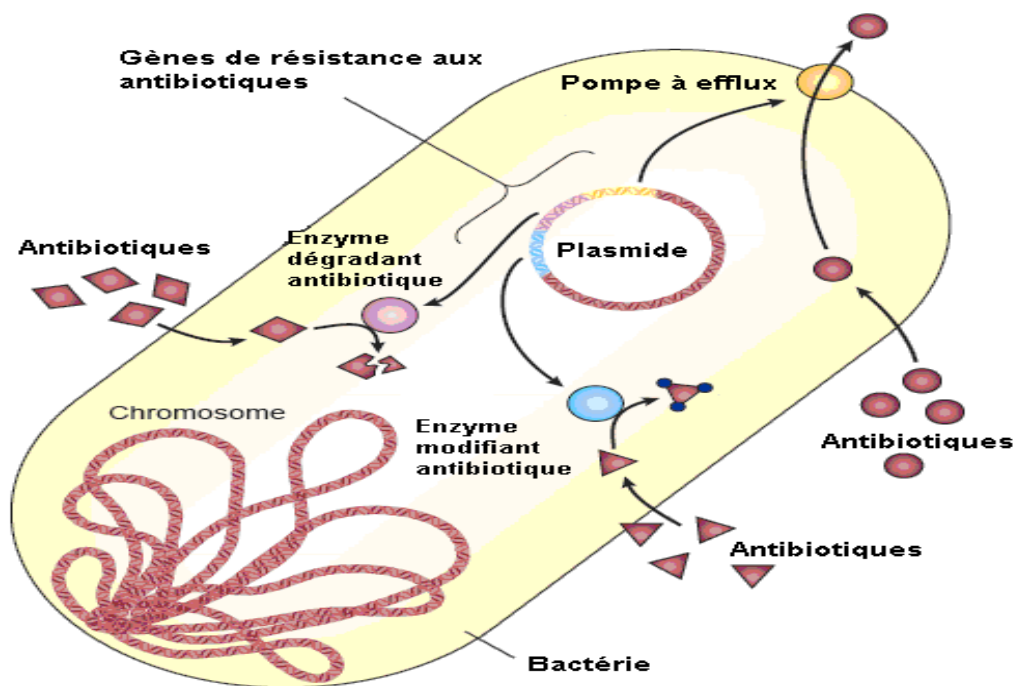


Figure 06 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques (Cindy-Love Tremblay, 2012).

Généralités

Les entérocoques résistent à divers antibiotiques qui sont cités ci-dessous ;

- **Résistance aux bêta lactamines :**

Les beta-lactamines sont des antibiotiques qui ont une action bactéricide et qui sont largement utilisées en thérapeutique humaine, ils inhibent la formation de la paroi cellulaire dans les cellules en croissance. (Mainardi et al.2008). Ils inactivent les protéines fixatrices des pénicillines et donc inhibent la synthèse du peptidoglycane (Singleton, 2005).

Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à la plupart des bêta lactamines, et étant sensibles à un nombre limité de pénicilline (ampiciline, pénicilline, pipéraciline) sa résistance peut être effectuée par la production de bêta lactamase qui inhibe les bêta-lactamines en détruisant le lien d'amide sur le cycle bêta- lactame (Monica G et Louis B, 2019).

- **Résistance aux glycopeptides :**

Ce sont des molécules bactéricides qui ont une activité dirigée contre les Gram positifs, en bloquant la synthèse de la paroi peptidoglycanes (PG). Ces molécules agissent sur les entérocoques en liant le cinquième intermédiaire de la liaison hydrogène à son extrémité terminale d'un précurseur de PG constitué du motif di peptidique D-Ala-DAla (Cattoir et Leclercq, 2013).

Les entérocoques sont naturellement sensibles à la vancomycine et teicoplanine, leur résistance est due à la production de précurseurs de la paroi modifiés (terminés par D-alanyl-D-lactate ou D-alanyl-D-sérine) et à l'élimination des précurseurs naturels de haute affinité (terminés par D-Ala-D-Ala) (Cattoir V et Leclercq R, 2013).

- **La résistance aux aminosides :**

Ce sont des antibiotiques à large spectre, typiquement bactéricides, incluant, la gentamicine, la kanamycine. Ils sont actifs contre les Gram positifs par l'inhibition de la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30S de ribosome de la bactérie. (Graneau- Tsodikova et Labby.2016). Les entérocoques sont intrinsèquement résistants. La résistance est portée sur les éléments génétiques mobiles, ces gènes codent trois types d'enzyme : les phospho transférases (APH), les acétyl transférases (AAC) et les nucléotidynil transférases (ANT) (Woodford et al.1993).

Généralités

- **La résistance aux tétracyclines :**

Ces antibiotiques bactériostatiques, à large spectre inhibent la synthèse des protéines en se liant au ribosome et en inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt au site A. (Singleton, 2005).

La résistance chez les entérocoques est médiée par un mécanisme de protection ribosomique par des gènes tet(L). (Monica G et Louis B ,2019)

- **La résistance aux macrolides :**

Ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines interférant de façon réversible, en se fixant à la sous-unité ribosomique 50S (Singleton, 2005)

- **La résistance aux quinolones et fluoroquinolones :**

Ce sont les dérivées de l'acide nalidixique, ils ont une activité inhibitrice sur l'ADN gyrase, agissent sur la sous-unité A de la topoisomérase II et la topoisomérase IV. Ils inhibent l'activité normale de l'enzyme et la réplication de l'ADN,

La résistance aux quinolones chez les Gram positifs, est due à une mutation dans les gènes codants pour la gyrase et la topoisomérase IV. Cette mutation est située au niveau du gène C. (Ferrero et al.1994).

I.4.4. Application des entérocoques en biotechnologie :

Les entérocoques ont des applications biotechnologiques, dans différents domaines ; agroalimentaire, médicale....

Elles jouent un rôle essentiel dans la transformation, conservation et sécurité alimentaire en raison d'une part, de leur pouvoir acidifiant (acide lactique) qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques et d'autre part, grâce à leur capacité de produire d'autres substances antimicrobiennes comme les bactériocines. (FAO/OMS, 2004). Cette dernière peut également trouver des applications dans le secteur médical (Turcotte et al. 2004) ou elles peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens dans l'industrie pharmaceutique (Folli et al. 2003).

- **Utilisation comme probiotique :**

Ils ont été définis par la FAO, comme des micro-organismes vivants, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exerçant des effets positifs sur la santé (FAO/ WHO, 2006).

Généralités

Les probiotiques sont des bactéries lactiques qui forment la flore intestinale, ajoutés à certains produits alimentaires comme les yaourts et vendus comme promoteurs de santé humaine. Les bactéries les plus fréquemment rencontrées sont les lactobacilles, les bifidobactéries, et aussi des souches appartenant aux genres *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* et la levure *Saccharomyces* qui montrent des effets bénéfiques pour la santé. **(Champagne et al. 2008)**

En effet, la présence de ces probiotiques dans les muqueuses permet de maintenir l'équilibre de la flore intestinale en prévenant et en contrant les attaques d'autres micro-organismes nuisibles.

L'utilisation comme probiotiques à usage humain d'espèces responsables d'infections cliniques comme *E. faecalis* et *E. faecium* reste limitée mais *E. faecalis* est largement utilisé comme complément alimentaire pour animaux et *E. faecium* rentre dans la composition de probiotique alimentaires qui sembleraient efficaces dans la prévention de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques mais aussi dans le traitement de diarrhées infantiles **(Wunderlich et al. 1989 ; Canani et al. 2007;)**.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes :

Une sortie sur terrain a été réalisée le 13 mars 2022, pour effectuer l'échantillonnage d'eau de mer et de sédiment dans six plages dont trois sont localisées à l'est de la baie d'Alger et trois au côté est de la baie de Bou-Ismaïl.

II.1. Présentation de la zone d'étude :

Plusieurs prélèvements ont été faits sur la côte algéroise d'est en ouest dans les six plages citées ci-dessous : **(figure07)**



Figure 07 : Localisation géographique des stations étudiées (Google Earth pro, 2022)

- **Plage Ain Taya :**

Cette plage se trouve dans la commune de Ain Taya qui est située sur la bande côtière algérienne à 27Km au nord est d'Alger. La plage est sableuse de 600 mètres de longueur et 10 mètres de largeur. A côté de la plage il y a une ferme aquacole pour l'élevage des moules. La baignade est autorisée.

Matériel et méthodes

Tableau 02 : les coordonnées géographiques de la plage Ain Taya (coordonnées GPS)

Coordonnées	
Latitude	36°47'17,054''
Longitude	3°18'56,183''
Altitude	17m

- **Plage bateau cassé :**

La plage bateau cassée située dans la commune de Bordj El Kiffan dans la wilaya d'Alger. La plage est sableuse et rocheuse, elle s'étale sur une longueur de 757 mètres et sur une largeur de 50,5 mètres, La baignade est autorisée également.

Tableau 03 : les coordonnées géographiques de la plage bateau cassé (coordonnées GPS)

Coordonnées	
Latitude	36°46'2,147''
Longitude	3°13'25,504''
Altitude	2m

- **Plage la sirène :**

Cette plage se trouve à Bordj El Kiffan, la plage est de type sableux et s'étale sur une longueur de 134 mètres et de largeur de 47 mètres avec une superficie de 9000 m², La baignade est autorisée.

Matériel et méthodes

Tableau 04 : les coordonnées géographiques de la plage sirène (coordonnées GPS)

Coordonnées	
Latitude	36°44'59,66''
Longitude	3°11'15,751''
Altitude	14m

- **La plage Sidi Fredj :**

Cette plage est située sur la commune de Staoueli dans la wilaya d'Alger, la granulométrie de cette plage est constituée de sable fin, elle s'étale sur une longueur de 100 m et sur une largeur de 5m, La baignade est autorisée.

Tableau 07 : les coordonnées géographiques de la plage Sidi Fredj (coordonnées GPS)

Coordonnées	
Latitude	36°45'40 ,038''
Longitude	2°50'53,051''
Altitude	0m

- **Plage Kheloufi I :**

Cette plage se trouve à Zéralda, elle s'étend sur un littoral sablonneux, Elle est de 1660 m de longueur et 60 m de largeur, elle est caractérisée par la présence d'oued Mazafran à l'ouest. La baignade est autorisée également.

Matériel et méthodes

Tableau 05 : les coordonnées géographiques de la plage Kheloufi (coordonnées GPS)

Coordonnées	
Latitude	36°42'11,069''
Longitude	2°48'35,266''
Altitude	21m

- **Plage Colonel Abbas :**

La plage Colonel Abbas est située dans la ville marine qu'on appelle Douaouda marine, elle s'étend sur 3Km. L'oued de Mazafran se déverse directement dans cette plage, et les déchets qu'on trouve rendent la plage polluée. Elle est de type sableux avec des galets, La baignade est quand même autorisée.

Tableau 06 : les coordonnées géographiques de la plage Colonel Abbas (coordonnées GPS)

Coordonnées	
Latitude	36°41'31,748''
Longitude	2°47'37,64''
Altitude	21m

II.2. Echantillonnage :

Les échantillons d'eau de mer ont été collectés dans des flacons stériles de 1L à une distance de 1m du bord de mer. Les flacons sont manuellement plongés et refermés après le remplissage, sous l'eau au niveau du point de prélèvement, afin d'éviter toute contamination.

Les sédiments ont été prélevés dans des sachets stériles.

En parallèle, des mesures physicochimiques ont été réalisées ; à l'aide d'un oxymètre, l'électrode a été plongée dans l'eau afin de mesurer la température et l'oxygène dissout.

Matériel et méthodes

On n'a pas effectué les mesures pour Les deux paramètres salinité et pH à cause de l'indisponibilité du matériel.

Tous les échantillons ont été étiquetés et transportés au laboratoire dans des glacières, pour un traitement dans les six heures qui ont suivi le prélèvement.

II.3. Analyse microbiologique :

II.3.1. L'eau de mer :

La méthode utilisée pour analyser l'eau de mer est la filtration sur membrane, cette dernière consiste à filtrer 100ml de l'échantillon ou ses dilutions à travers une membrane stérile quadrillée, de diamètre de pores de $0,45\mu\text{m}$, qui retient les microorganismes recherchés. La membrane est ensuite placée sur un milieu gélosé selon les bactéries recherchées. Durant l'incubation, des colonies se forment à la surface de la membrane, le résultat sera exprimé par unité formant colonie dans 100ml (UFC/100ml) (Rodier et al ,2009).

Mode opératoire :

- Amener les différents composants de la rampe de filtration ;
- Désinfecter par l'alcool et flamber la face supérieure de la rampe ;
- Dans les conditions stériles, placer à l'aide d'une pince stérile une membrane d'une porosité de $0,45\mu\text{m}$, côté quadrillé vers le haut ;
- Placer l'entonnoir stérile (flambé ou stérilisé) sur la base du filtre ;
- Transvaser dans l'entonnoir un volume de 100 ml de l'échantillon ou de ses dilutions 10^{-1} à 10^{-3} bien mélangé.(les dilution effectuées en fonction de la charge bactérienne).
- Ouvrir le robinet et appliquer le vide. Dès que la membrane parait sèche, refermer le robinet ;
- Retirer l'entonnoir et transférer la membrane à l'aide de la pince stérile sur un milieu gélosé adapté à la numération réalisée.
- S'assurer que l'air n'est pas emprisonné entre la membrane et milieu de culture. Donc, appliquer la membrane sur la gélose en assurant progressivement le contact.

Matériel et méthodes

II.3.1.1. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Après filtration sur membrane, le filtre a été déposé sur le milieu gélosé Tergitol en évitant les bulles d'air, puis les boîtes ont été Incubées, à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes thermos tolérants pendant 24H (**figure08**).

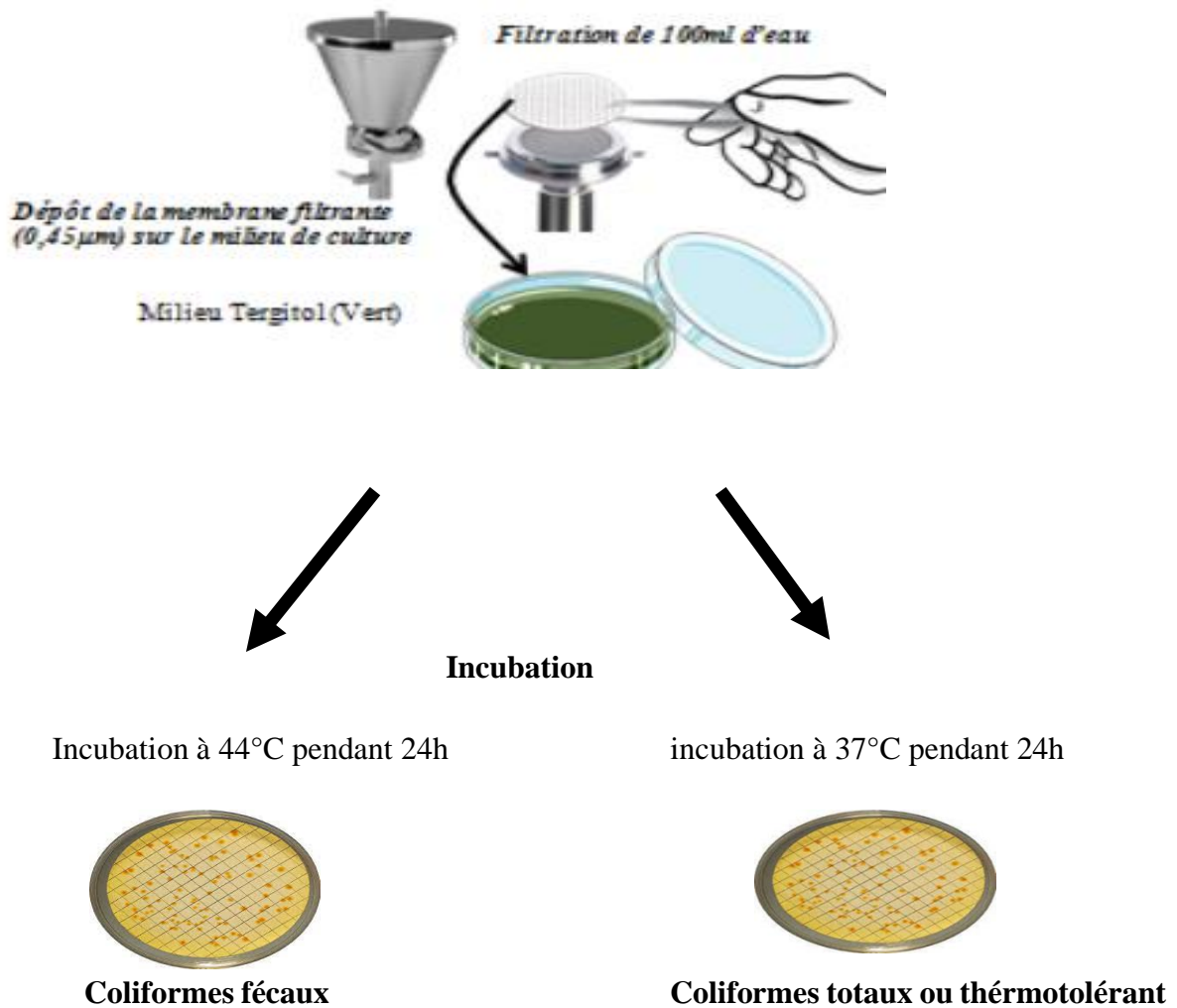


Figure 08 : Recherche des coliformes

Matériel et méthodes

II.3.1.2 Dénombrement des entérocoques :

La recherche des entérocoques dans l'eau de mer se fait par la méthode de filtration sur membrane ; en faisant deux test ; présomptif puis confirmatif (**figure 09**).

- **Test présomptif :**

Après la filtration, la membrane a été déposée sur le milieu gélosé Slanetz sans et avec différents antibiotiques (amoxicilline, vancomycine, gentamicine, tétracycline, azithromycine, ciprofloxacine) et puis incubée à 37°pendant 24h, les entérocoques se caractérisent par des colonies rouges ou roses.

La gélose Slanetz : contient de l'azide de sodium qui sélectionne les bactéries à Gram positif par inhibition des microorganismes à Gram négatif,

La réduction de TTC (chlorure de 2, 3,5 triphényltétrazolium) par les bactéries donne une coloration rouge à rose. (**Biokar diagnostics, biokar-diagnostics.fr**)

- **Test confirmatif :**

Transférer la même membrane sur le milieu confirmatif BEA (gélose bile Esculine Azide) sans et avec différents antibiotiques (amoxicilline, vancomycine, gentamicine, tétracycline, azithromycine, ciprofloxacine) après incubation à 37°pendant 2h, l'apparition des colonies noires confirme la présence des entérocoques.

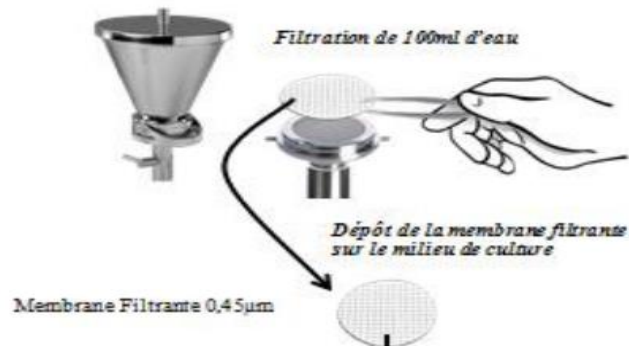
La gélose BEA est un milieu sélectif destiné à l'isolement des entérocoques et streptocoques fécaux.

La bile : permet la croissance des entérocoques par l'inhibition des autres bactéries à Gram positif. (**Madjmaa et Boulmaize ,2016**)

L'esculine : les entérocoques hydrolysent l'esculine en aglycone en présence de sel de fer qui va donner des colonies noires sur la surface de la gélose. (**Madjmaa et Boulmaize ,2016**)

L'azide de sodium : supprime la croissance des bactéries à Gram négatif (**Madjmaa et Boulmaize ,2016**)

Matériel et méthodes



Test présomptif :



Déposée la membrane sur le
milieu gélosé Slanetz



Incuber à 37°C pendant 24h

Test confirmatif :

Transférer la même membrane sur le
milieu BEA Incuber 2h à 24h à

37°C

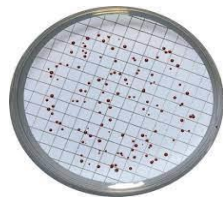


Figure 09: Recherche des entérocoques

Matériel et méthodes

II.3.2. Sédiment :

A. Les coliformes :

La méthode de nombre le plus probable (NPP) est utilisé pour la recherche des coliformes dans le sédiment, cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes supposés distribués dans l'échantillon. Les coliformes peuvent fermenter le lactose, cette fermentation se traduit par la production de gaz dans la cloche du Durham et le trouble du liquide. (Figure 10)

- **Test présomptif**

Mode opératoire :

Préparation de la Solution mère :

1g de l'échantillon (sédiment) est dissout dans 9ml d'eau distillée stérile.

Préparation des dilutions :

- Préparer trois séries de trois tubes du bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)
- Homogénéiser la suspension microbienne à prélever.
- Dans les conditions stériles, Prélever 1ml de la solution mère et la transférer dans le premier tube de chaque série qui contient 9ml de diluant.
- La dilution suivante s'effectue comme la dilution décrite ci-dessus mais en partant du tube de la dilution précédente.
- Mélanger bien les tubes et s'assurer de l'absence d'air dans la cloche.
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 48h pour les coliformes totaux et 44°C pendant 48h pour les coliformes fécaux.
- Utiliser la table de Mac Grady pour interpréter les résultats qui sont exprimés par NPP coliforme / g de sédiment.

Matériel et méthodes

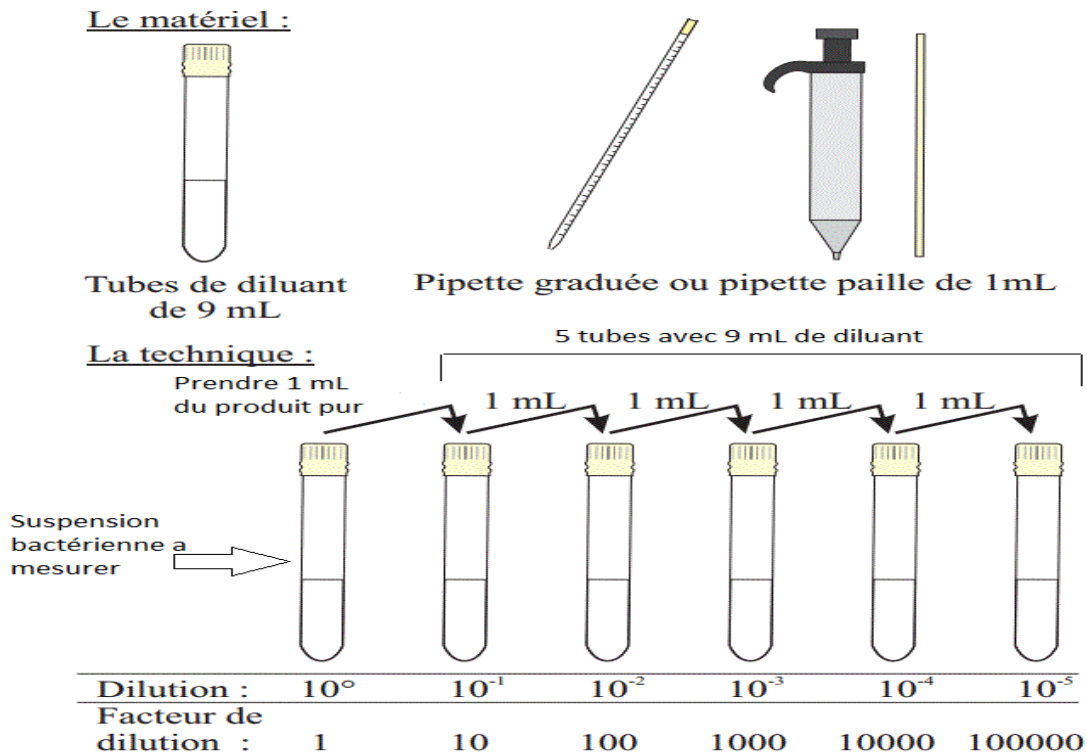


Figure 10 : La méthode du nombre le plus probable NPP (Magniez, 2014)

- **Test confirmatif :**

A partir des tubes positifs, devant le bec bunsen prélever 1ml et repiquer dans le bouillon Schubert, l'incubation à 37°C pendant 48h pour les coliformes totaux et 44°C pendant 48h pour les coliformes fécaux, le dégagement de gaz et le trouble confirment la présence des coliformes.

➤ **Recherche d'*Escherichia coli* :**

Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs aux tubes positifs de coliformes fécaux, l'apparition d'un anneau rouge confirme la présence d'*E. coli*. L'ajout de ce réactif permet de mettre en évidence la production de l'indole suite à la dégradation de l'acide aminé tryptophane par les microorganismes et ce par l'apparition d'une la couleur rouge. (Microbiologie-clinique.com)

B. Les entérocoques :

- **Test présomptif**

Préparation de la Solution mère :

1g de l'échantillon dissout dans 9ml d'eau distillée stérile.

Matériel et méthodes

Préparation des dilutions :

- Préparer trois séries de trois tubes du bouillon Rothe.
- Homogénéiser la suspension microbienne à prélever.
- Dans les conditions stériles, prélever 1ml de la solution mère et le transférer dans le premier tube de chaque série qui contient 9ml de diluant,
- La dilution suivante s'effectue comme la dilution décrite précédemment mais en partant du tube de la dilution précédente.
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 48h.

Le milieu Rothe contient de l'azide de sodium qui favorise la croissance des entérocoques. Un résultat positif est indiqué par un trouble du milieu.

- **Test confirmatif :**

A partir des tubes positifs, à l'aide d'une micropipette, prélever 1ml et inoculer dans le bouillon Litsky, l'incubation se fait à 37°C pendant 48h, le résultat positif se traduit par un trouble et une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube. (CASFM, 2020)

II.3.3. Prévalence de la résistance aux antibiotiques des Entérocoques :

Dans l'eau :

L'évaluation des taux de résistance aux antibiotiques des entérocoques a été effectuée par la filtration de 100ml d'échantillon ou de dilution et l'incubation des membranes sur milieu SLANETZ et BARTLEY additionné ou non des antibiotiques suivants à une concentration critique : la vancomycine (8µg/ml), la gentamicine (32 µg/ml), l'ampicilline (50µg/ml), la tétracycline (5µg/ml), la ciprofloxacine (80µg/ml) et l'azithromycine (0,01g/ml). L'incubation du milieu est effectuée à 37°C pendant 24h. (CASFM, 2020)

Après 24 heures d'incubation, la confirmation se fait sur gélose BEA additionnée ou non du même antibiotique pendant 2h. Les entérocoques apparaissent noirs.

Dans le sédiment

Des aliquotes de 0,1 ml de la solution mère et des dilutions ont été étalés à la surface de la gélose Slanetz et Bartley additionnée de l'un des antibiotiques comme décrit précédemment.

Matériel et méthodes

Calcul du taux de résistance :

Le taux de bactéries entérocoques résistantes a été déterminé en calculant le rapport du nombre de bactérie obtenu sur gélose BEA additionnées d'antibiotique sur le nombre de bactérie obtenu sur milieu sans antibiotique.

$$\text{Prévalence résistance (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre de bactérie sur milieu avec antibiotique}}{\text{Nombre de bactérie sur milieu sans antibiotique}} \right) \times 100$$

II.4. Identification des entérocoques :

II.4.1. Coloration de Gram :

Principe :

La coloration de Gram : est une méthode qui permet de différencier les bactéries en deux catégories Gram positif et Gram négatif, selon les propriétés de la paroi bactérienne. (François Denis et al, 2007)

Mode opératoire :

Sur un frottis préalablement préparé.

- Recouvrir la lame de violet de gentiane 1 minute ;
- Rincer la lame avec l'eau distillée ;
- Recouvrir de lugol : 1 minute ;
- Rincer la lame avec l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool 30 secondes. La lame doit être inclinée ;
- Rincer la lame avec l'eau distillée.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée 1 min.
- Rincer la lame avec l'eau distillée.
- Sécher la lame avec du papier
- Observer à l'objectif x40 puis x100 en ajoutant une goutte de l'huile à immersion.
- Les bactéries à Gram positif ont une coloration violette alors que les bactéries à Gram négatif ont une coloration rose.

Matériel et méthodes

II.4.2. Les tests d'identification des entérocoques :

A. Test de la catalase :

Certaines bactéries ont la capacité de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de l'enzyme catalase qui libère l'oxygène gazeux (François Denis et al, 2007)

Selon la réaction suivante :



Mode opératoire :

- Sur une lame, déposer une goutte de H_2O_2 ,
- Étaler une colonie sur la lame à l'aide d'une anse de platine.

Le dégagement des bulles d'air signifie une catalase positive contrairement à une catalase négative.

B. Test de l'oxydase :

Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase. Les disques oxydase sont des disques de papier absorbant imprégnés de N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride. En présence de cytochrome oxydase, le N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride (incolore) forme un composé coloré en bleu. (François Denis et al, 2007)

- ❖ **Oxydase positive** : une couleur violette sur la surface de disque.
- ❖ **Oxydase négative** : absence de coloration.

Mode opératoire :

- Sur une lame stérile, déposer un disque d'oxydase à l'aide d'une pince stérile.
- Mettre une ou deux gouttes d'eau distillée stérile et émulsionner une colonie pure par l'anse de platine sur le disque.
- Observer l'apparition d'une coloration violette pendant 30 secondes (**microbiologie-clinique.com**).

Matériel et méthodes

C. Test de la résistance à la salinité :

Les entérocoques peuvent résister à une salinité de 6.5% de chlorure de sodium. (Madjmaa et Boulmaize ,2016)

Mode opératoire :

- Dans des tubes contenant 3ml de bouillon hyper salé (6 g /100ml) ensemencés deux à trois colonies puis incubé à 37°C pendant 24h, l'apparition de trouble donne un résultat positif.

D. Test de résistance à la chaleur :

La plupart des entérocoques peuvent pousser à des températures de 60°C pendant 30 minutes (Madjmaa et Boulmaize ,2016)

Mode opératoire :

- Ensemencer des tubes contenant 5ml du bouillon (BHIB) avec des colonies pures.
- Placer les tubes dans un bain-marie à 60°C pendant 30min puis les incubé à 37°C pendant 24h, le résultat positif correspond à l'apparition de trouble.

E. Test de résistance au Tellurite de Potassium :

Ce test permet l'identification d'*Enterococcus faecalis*, qui elle seule peut se développer en présence de Tellurite. (Madjmaa et Boulmaize ,2016)

Mode opératoire :

- Ensemencé de 2 à 3 colonies ayant poussées sur gélose Slanetz et Bartley dans des tubes qui contiennent 4,5 ml de BHIB est additionné de 0,5 ml de tellurite de potassium préalablement dilué au 1/250.
- Incubés à 37°C pendant 24 à 48 h.
- Les cultures positives ont été considérées comme des souches d'*E. faecalis*. (J. Grosjean et al. 2017).

II.5. Production de biofilm :

Les biofilms peuvent être constitués d'une ou plusieurs espèces de bactéries et se développer sur des interfaces solides ou liquides variées, que l'on rencontre par exemple dans l'environnement : fond de rivières, cailloux, racines et dans les organismes vivants : tubes digestifs (Costerton *et al*, 1987).

Matériel et méthodes

Mode opératoire :

- Jeune culture bactérienne de 18h est ajustée à une densité optique entre 0.56 et 0.64 à une longueur d'onde 540 nm.
- Un volume de 250µl est incubé dans une plaque pendant 6h à 37°C.
- Après incubation, les puits sont lavés avec 25µl de cristal violet à 1% qu'on laisse reposer pendant 15minutes.
- On a effectué 3 lavages au PBS stériles (200µL par puits), puis avec 200µl d'éthyle d'alcool.
- Le contenu est mis dans des tubes stériles contenant de 1.2ml d'alcool.
- Après agitation la DO est mesurée à 540nm. (Maldonado et al, 2007)
- Les souches bactériennes sont classées en trois catégories selon la DO :

- 1) $DO > 0.5$ forte production de biofilms
- 2) $0.1 < DO < 0.5$ Production Moyenne
- 3) $DO < 0.1$ Faible production

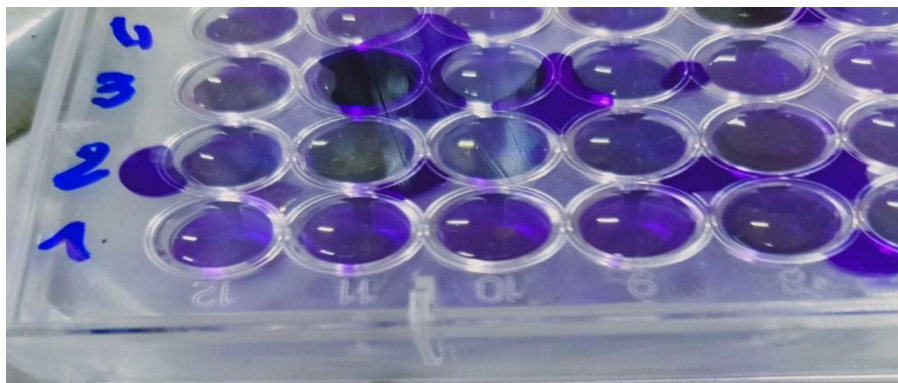


Figure 11 : Le test de biofilm

Matériel et méthodes

II.6. Étude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme :

C'est une méthode qui sert à déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. (CASFM, 2020).

Mode opératoire :

➤ Préparation de la suspension :

- Avec une anse de platine stérile, ensemer des colonies pures dans des tubes contenant 5ml d'eau physiologique, afin de préparer une solution bactérienne de 0,5 Mc Farland (10^8 cellules /ml).
- L'inoculum doit être employé dans les 15min qui suivent sa préparation.

➤ Ensemencement :

- Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes.
- Ensemencer en stries sur toute la surface de la boîte, pour écouvillonner la totalité de la surface de la gélose, l'opération se répète encore deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois (trois directions) sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et de passer l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (pourtour de la gélose).

➤ Dépôt des disques :

Avec une pince stérile déposer les disques d'antibiotique sur la gélose inoculée, selon (figure 12). Une fois les disques déposés, ils ne doivent pas être déplacés car ils diffusent rapidement. Il ne faut pas laisser les boîtes plus de 15min sur la paillasse.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

➤ Lecture des boîtes :

L'apparition d'une zone d'inhibition à la surface de la gélose, nous permet de classer les bactéries dans l'une de ces catégories : sensible, intermédiaire ou résistante en mesurant son diamètre par une règle graduée en mm (CASFM, 2020)

Matériel et méthodes

Les associations d'antibiotiques sont caractérisées par ces deux types majeurs d'interactions :

Synergie : l'effet de l'association est significativement supérieur à la somme des activités de chaque antibiotique. (É. Denes a et N. Hidri, 2009)

Antagonisme : l'association diminue l'effet de l'un ou l'autre des antibiotiques. L'activité de cette association est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique. (É. Denes a et N. Hidri, 2009)

Tableau 08 : Liste d'antibiotiques en disque utilisés : (krystyna et Teresa, 2020 ; CASFM, 2020)

Famille	Nom de l'antibiotique	Abréviation	Charge (µg)
Béta-lactamines	Amoxiciline +acide clavulanique	AMC	30
	Céfotaxime	CTX	30
	Céftazidime	CAZ	30
	Aztréoname	ATM	30
	Ampiciline	AM	10
Sulfamides	Triméthoprine	TMP	5
	Triméthoprine-sulfaméthoxazole	SXT	25
Aminosides	Amikacine	AK	30
	Gentamicine	CN	10
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30
Lincosamides	Clindamycine	CD	2

Matériel et méthodes

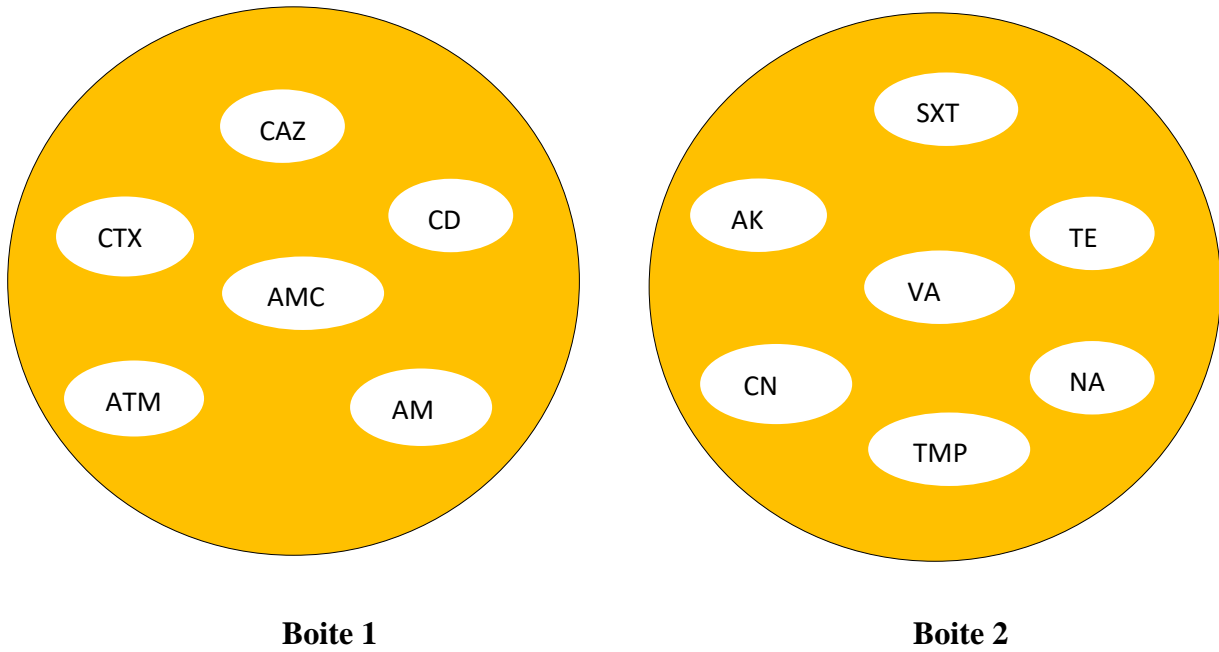


Figure 12 : Disposition des disques d'antibiotiques

Chapitre III : Résultats et Discussion

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion :

Au cours de notre étude, des échantillons d'eau de mer et de sédiments ont été prélevés et analysés. Les résultats obtenus des différentes analyses physicochimiques et bactériologiques sont cités ci-dessous :

III.1. Résultats des paramètres physicochimiques :

Vu que les conditions hydro climatiques influent sur la qualité de l'eau de mer, des mesures ont été réalisées au cours des prélèvements.

- La température de l'eau de mer est un paramètre environnemental, qui influe sur les réactions chimiques et biologiques. Elle affecte le niveau d'oxygène dissout dans l'eau. **(Oram, B. 2014)**. Les valeurs des températures mesurées au cours de notre étude varient entre 15.5°C et 17.2°C est sont dans la moyenne de la saison.
- Le 2eme paramètre mesuré est l'oxygène dissout, élément fondamental qui intervient dans la majorité des processus biologiques des végétaux et des animaux. Ils l'utilisent pour la respiration. **(Jean-Luc Hubiche, 2002)** les valeurs obtenues dans notre étude varient entre 6.4 mg/l et 6.8 mg/l.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (03) :

Tableau 09 :

Tableau 1 : Résultats des paramètres physicochimiques

Station	Heure de prélèvement	Température °C	Oxygène dissout (mg/l)
Ain Taya	9 :54	15.5	6.4
Bateau cassé	10.41	15.9	6.7
La Sirène	11.24	16.6	6.8
Kheloufi I	12.28	17.2	6.6
Colonel Abbes	12.39	16.2	6.6
Sidi Fredj	13.13	16.7	6.5

Résultats et Discussion

III.2. Résultats des analyses microbiologiques :

Afin d'évaluer la qualité microbiologique des stations étudiées, on a cherché des bactéries indicatrices de la pollution et de contamination à savoir les coliformes totaux, fécaux et les entérocoques dans l'eau de mer et dans le sédiment.

- Eau de mer

III.2.1. Les coliformes totaux et thermo tolérants :

Les coliformes sur le milieu Tergitol apparaissent sous forme des colonies jaunes, oranges. (Figure 13).



Figure 13 : Aspect des coliformes sur le milieu Tergitol

D'après les histogrammes (**figure14**), on a remarqué que la concentration des coliformes fécaux est inférieure à celles des coliformes totaux dans toutes les stations. Colonel Abbes et Kheloufi I sont les plus chargées en coliformes totaux et fécaux à cause des eaux usées d'oued Mazafran ainsi que le rejet des déchets. Par contre les concentrations les plus faibles ont été observées aux niveaux des plages la Sirène, Bateau cassée, et Sidi Fredj.

La concentration des coliformes totaux et fécaux ne dépassent pas la valeur limite de la norme algérienne ce qui indique que la qualité de l'eau est acceptable, pour toutes les plages.

Résultats et Discussion

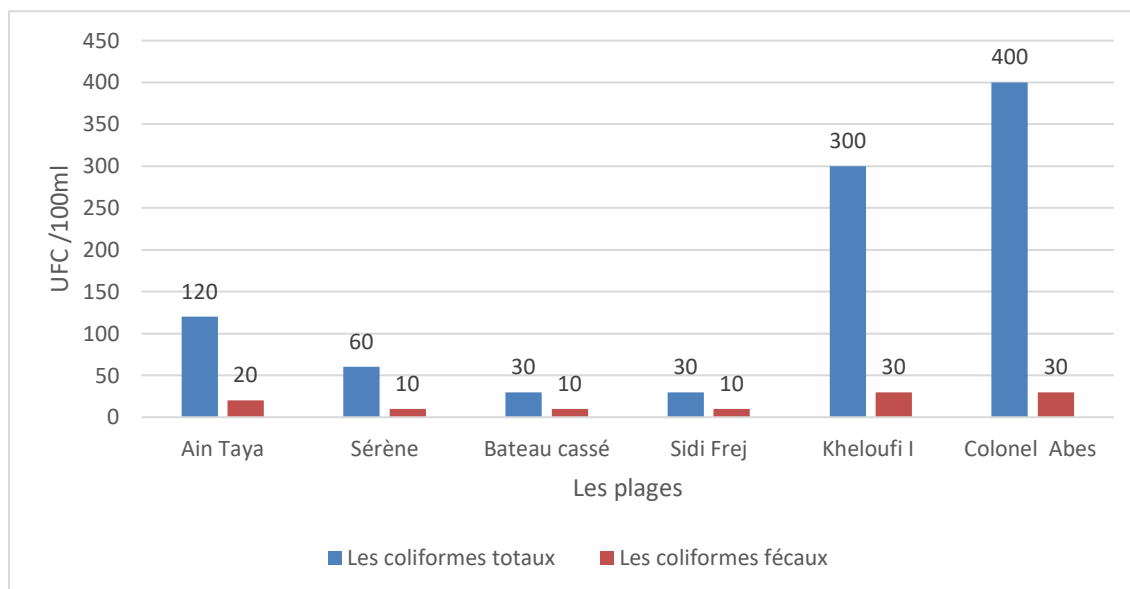


Figure 14 : Résultat de dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans les six plages, exprimé en UFC/100ml.

III.2.2. Les entérocoques :

Les entérocoques apparaissent sous forme des petites colonies noires (**figure 15**), dû à leur capacité à hydrolyser l'esculine, et qu'elles peuvent pousser en présence des sels biliaries.

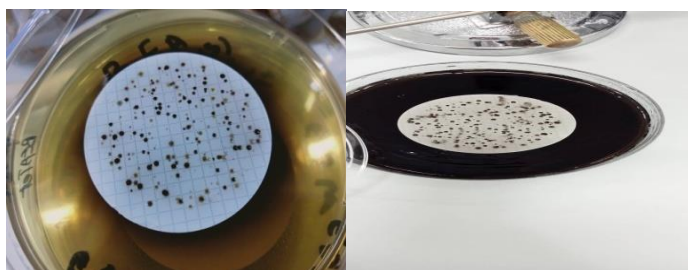


Figure 15 : Aspect des entérocoques sur le milieu BEA

La figure 16 représente les résultats du dénombrement des entérocoques dans les six plages étudiées exprimé en Unité Formant Colonie dans 100ml d'eau (UFC/100ml).

On remarque que le taux le plus élevé a été retrouvé dans la plage Colonel Abbes (780 UFC/100ml), suivi par la plage Ain Taya, Kheloufi I puis Bateau cassé (320 UFC/100ml, 260 UFC/100ml, 180 UFC/100ml) respectivement, elles sont plus élevées que la valeur guide

Résultats et Discussion

(100UFC/100ml) de la norme algérienne ce qui indique que ces plages sont à surveiller (annexe tableau 08).

Tandis que les plages de Sidi Fredj et la Sirène ont enregistré un taux faible de (90 UFC/100ml, 80 UFC/1000ml) respectivement, et inférieur à la valeur guide de la norme algérienne (100UFC/100ml). Ces plages sont de bonne qualité.

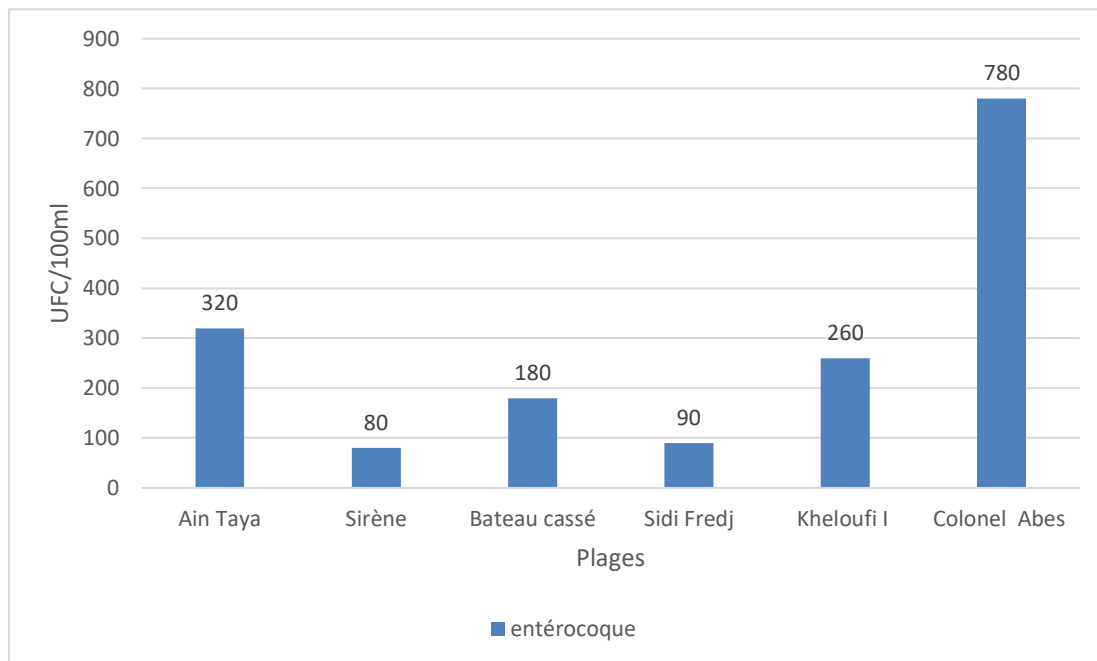


Figure 16 : Variation des charges des entérocoques au niveau des six plages étudiées

Les histogrammes (**figure17**) représentent le taux de résistance des entérocoques aux antibiotiques dans les six plages exprimées en pourcentage.

On a remarqué un taux de résistance important pour la tétracycline pour toutes les stations suivie par l'azithromycine à l'exception Sirène et Sidi Fredj, La gentamicine présente une résistance moyenne au niveau de la plage Khelloufi par rapport aux autres plages. Des faibles taux à la ciprofloxacine ont été observés dans la plage Colonel Abes. Aucune résistance à l'amoxicilline et la vancomycine dans toutes les stations.

La figure montre un taux élevé de résistance de 100% à la tétracycline dans la plage la Sirène suivi par la plage Ain Taya 84%, Colonel Abbes 77%, Bateau cassé 72%, Kheloufi I 64% et Sidi Fredj avec un taux de 30%.

Résultats et Discussion

Ces résultats sont plus élevés que ceux trouvés en 2021 par Chaachoua pour ces mêmes stations : un taux moyen à faible de résistance à la tétracycline, 52% dans la plage Ain Taya 18% dans la plage Colonel Abbès, 3% pour Bateau cassé, 28% pour Kheloufi I, 1.7% pour Sidi Fredj. **(Chaachoua A. 2021)**

Concernant l'azithromycine on a observé une résistance de 51%, 50%, 36%, 17% dans les plages Colonel Abbès, Ain Taya, Kheloufi I et Bateau cassé respectivement. Absence de résistance au niveau des plages la Sirène et Sidi Fredj. Ces résultats sont proches à ceux trouvés en 2021 au niveau de Colonel Abbès et Kheloufi I. **(Chaachoua A. 2021).**

On a constaté qu'au cours de ces deux dernières années le taux de résistance à l'azithromycine a augmenté d'une année à une autre, ceci est probablement dû à la crise sanitaire de la COVID 19, car l'azithromycine est le premier antibiotique que les médecins prescrivent à la suspicion du moindre symptôme à cela se rajoute l'automédication des citoyens.

Ces résultats montrent aussi une résistance moyenne à la gentamicine dans la plage Kheloufi I 36%, et de 4% au niveau de la plage Colonel Abbès. Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés en 2021. **(Chaachoua A. 2021).** On note également une absence totale de résistance à la gentamicine dans les autres plages.

On a remarqué une absence totale de résistance à la vancomycine dans tous les sites étudiés ainsi qu'une absence de résistance à la ciprofloxacine à l'exception de la plage Colonel Abbès avec un taux très faible de 4%. Le même résultat a été obtenu dans l'étude réalisée en 2021. **(Chaachoua A. 2021).**

On a constaté également aucune résistance à l'amoxicilline dans toutes les plages.

Des fluctuations dans les taux de résistances ont été observées, cela est probablement dues aux conditions d'hydrodynamisme qui redistribuent la répartition des microorganismes par les effets de décantation et de remise en suspension **(Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar et al. 2004 ; Ghosh et Mandal, 2010).**

Résultats et Discussion

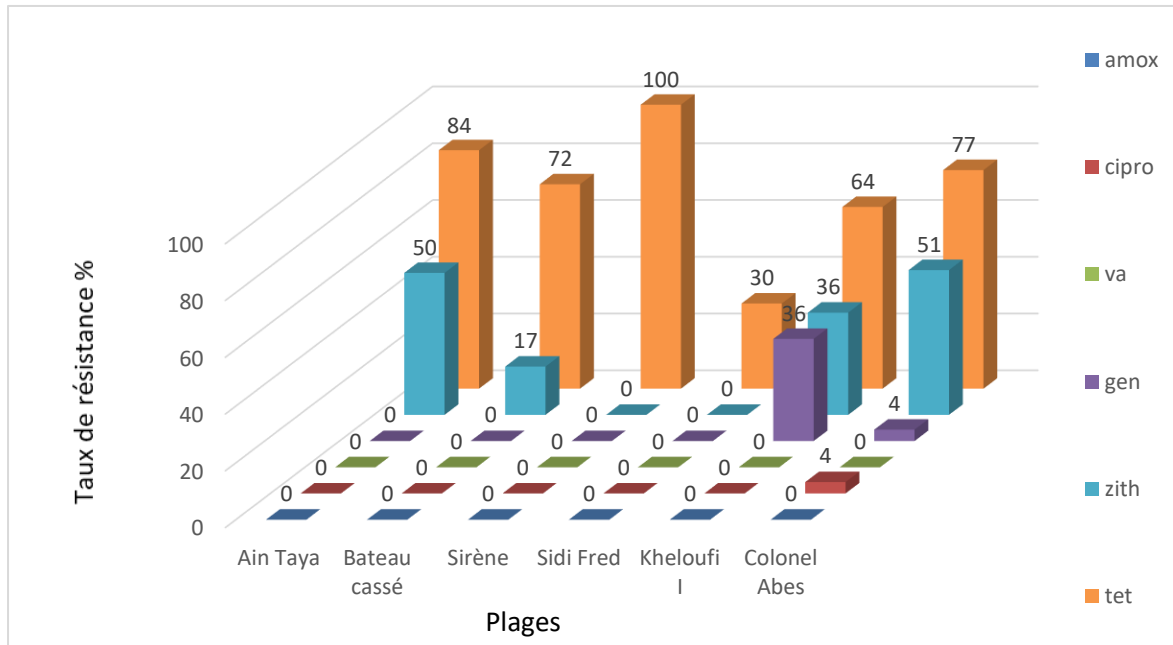


Figure 17 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages (Eau de mer)

amox : amoxicilline ; **cipro** : ciprofloxacine ; **va** : vancomycine ; **gen** : gentamicine ;
zith : azithromycine ; **tet** : tétracycline

- **Sédiment :**

La méthode du nombre le plus probable NPP a été utilisé pour dénombrer les germes présents dans le sédiment.

III.2.3 : Les coliformes totaux et thermo tolérants :

D'après la figure 18 la concentration la plus élevée en coliforme totaux a été retrouvé dans la plage Kheloufi I (1100CT/g), suivi par la plage bateau cassé (43CT/g), puis la plage colonel Abbes (38CT/g), des valeurs de (36CT/g) et (20CT/g) ont été enregistrées dans les plages la Sirène et Ain Taya respectivement. On note l'absence totale des coliformes totaux au niveau de la plage Sidi Fredj.

Résultats et Discussion

Ces valeurs sont dans la norme de 1 à 100CT/g sauf au niveau de la plage Kheloufi I. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux trouvés l'année passée. (Chaachoua A., 2021)

En ce qui concerne les coliformes fécaux, les résultats obtenus montrent des valeurs quasi nulles dans tous les sites.

On note également l'absence d'*E. coli* dans tous nos échantillons (eau et sédiment) contrairement aux résultats trouvés en 2021 (Chaachoua A., 2021).

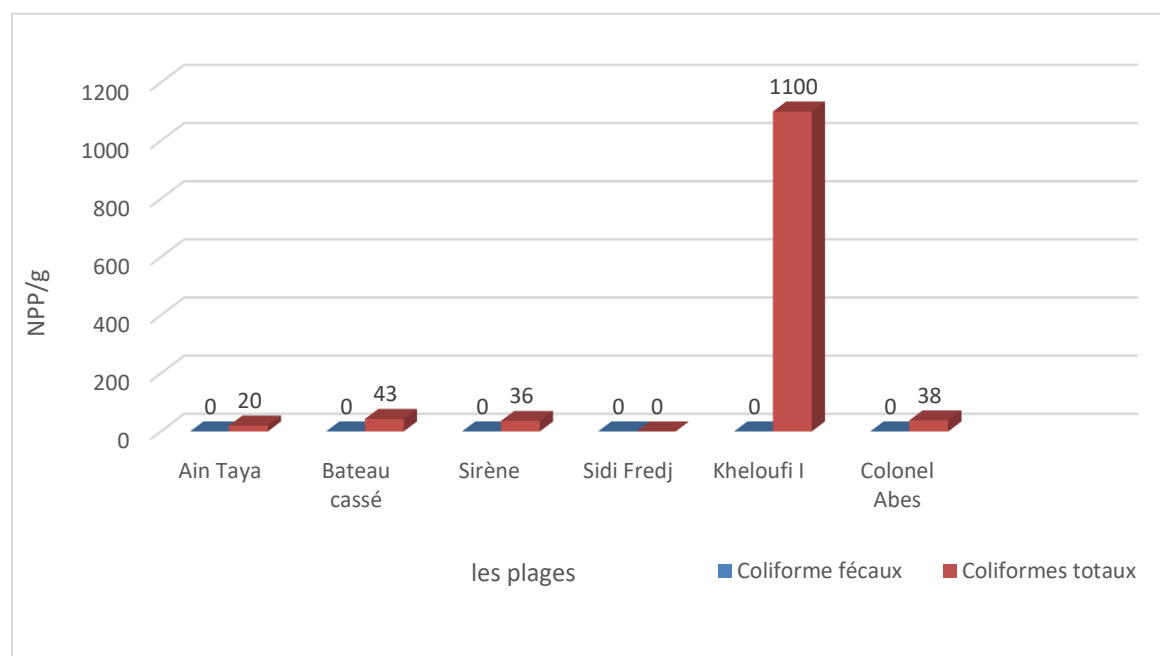


Figure 18 : Résultat de dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans les six plages Étudiées dans le sédiment.

III.2.4 : Les entérocoques :

Les concentrations des entérocoques obtenues sont illustrées dans la figure ci-dessous.

D'après la figure 19, On a remarqué que les sédiments de la plage Kheloufi I enregistrent la plus grande concentration (23C/g) aux entérocoques et puis Colonel Abbes avec une concentration de (15 C/g) cela peut être expliqué par les courants d'eaux usées apportées par Oued Mazafran qui sont chargés en différents germes.

L'absence des entérocoques aux niveaux des autres plages pourrait s'expliquer par les mauvaises conditions météorologiques qui ont précédé notre échantillonnage.

Résultats et Discussion

Les conditions hydrodynamiques ont provoqué une redistribution des germes dans ces sites de ce fait nos résultats ne sont pas en concordances avec ceux trouvé en 2021. (Chaachoua A., 2021)

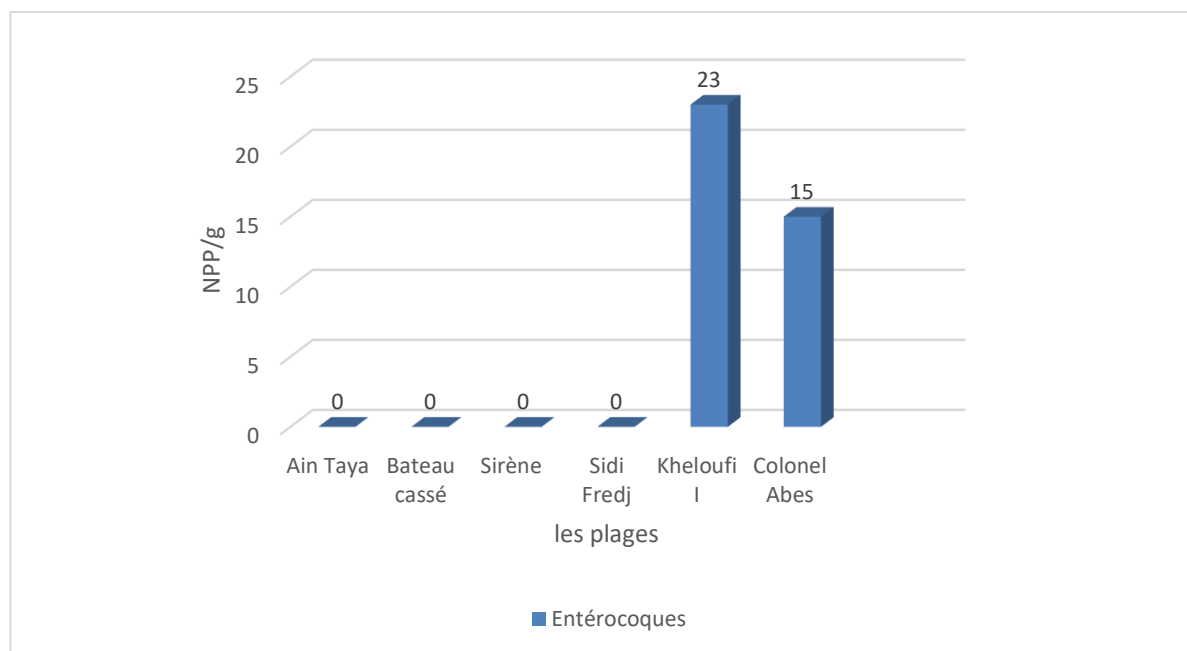


Figure 19 : Les concentrations des entérocoques trouvés par la méthode NPP dans les sédiments.

Le taux de résistance aux antibiotiques dans différentes stations est mentionné dans la figure ci-dessous :

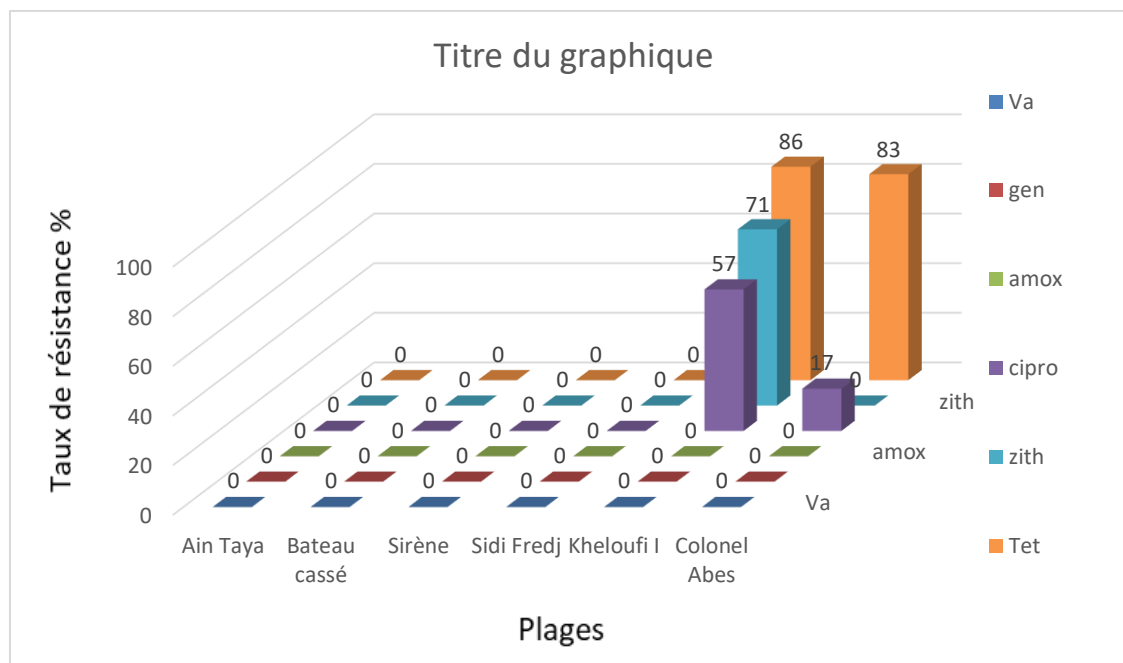
La figure 20 représente le taux de résistance des entérocoques aux antibiotiques dans les six plages par rapport aux sédiments exprimées en pourcentage.

Un taux élevé qu'égal à 86% et 83% à la tétracycline a été observé Au niveau de la plage Kheloufi I et Colonel Abes respectivement, il y a une résistance importante à l'azithromycine, dans la station Kheloufi par rapport aux autre plages , une résistance de 57% à la ciprofloxacine a été enregistrée à la plage Khelloufi et un faible taux de 17% au niveau de la plage Colonel Abes.

Résultats et Discussion

Aucune résistance à l'amoxicilline, gentamicine et vancomycine pour toutes les stations

Les mêmes résultats ont été trouvés lors de l'étude menée en 2021. (Chaachoua A., 2021)



amox : amoxicilline ; **cipro** : ciprofloxacine ; **va** : vancomycine ; **gen** : gentamicine ;
zith : azithromycine ; **tet** : tétracycline

Figure 20 : Taux de résistance aux antibiotiques dans les six plages (sédiment) sur le milieu BEA

III.3. Identification des entérocoques :

Afin d'identifier les entérocoques, différents tests ont été effectués, sur des souches isolées à partir des plages étudiées, dans l'eau de mer et dans le sédiment. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

Résultats et Discussion

a/ Coloration de Gram :

Après la coloration de Gram, on a observé au microscope optique grossissement x100, les souches des entérocoques isolées sous forme de cocci disposées en paire (diplocoque), ou en chainettes de couleur violette, donc les souches sont des Gram positif (**figure 21**).

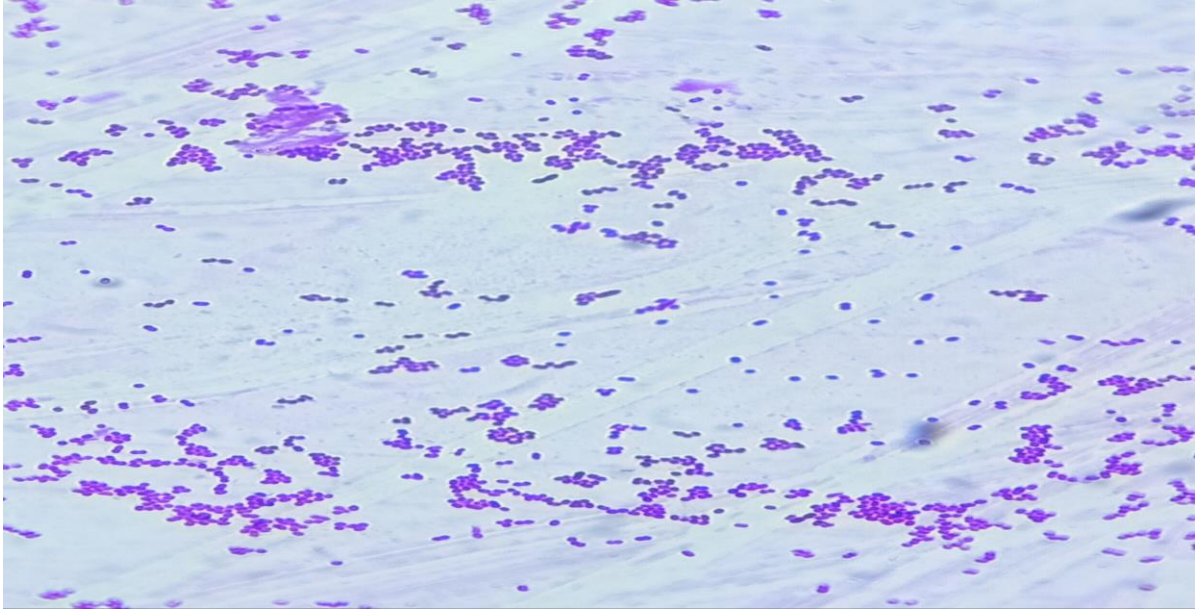


Figure 21 : Aspect des entérocoques après la coloration de Gram observés au microscope Optique (GrX100).

b/ Test de la catalase :

L'absence de dégagement des bulles d'air dans toutes les souches isolées indique une catalase négative. (**Figure 22.**)

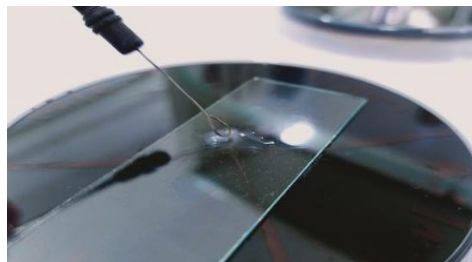


Figure 22 : Résultat du test catalase

Résultats et Discussion

c/ Test de l'oxydase :

Le test oxydase est négatif pour toutes les souches, ce qui explique qu'elles sont dépourvues de l'enzyme cytochrome oxydase (**Figure 23**).



Figure 23 : Résultat du test oxydase

d/ Test de la résistance à la salinité :

Sur les 47 souches isolées, 43 souches sont capables de résister dans le milieu hyper salé. (**Figure 24**).



Avant



Après

Figure 24 : Résultat du test de résistance à la salinité

e/ Test de la résistance à la chaleur :

Presque toutes les souches résistent à la température 60°C pendant 30min (**figure 25**).

Résultats et Discussion



Avant



Après

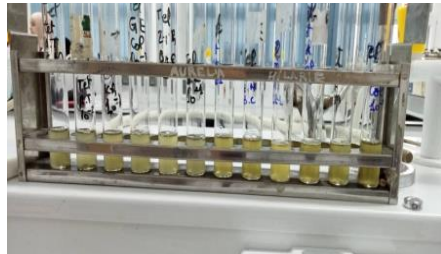
Figure 25 : Résultat du test de la résistance à la chaleur

f/ Test de tellurite de potassium :

Enterococcus faecalis peut se développer en présence de tellurite de potassium, pour cela on a effectué ce test afin d'identifier cette espèce, 42 souches parmi les isolats semblent être des *Enterococcus faecalis* (Figure 26).



Avant



Après

Figure 26 : Résultat du test de Tellurite de potassium

Résultats et Discussion

Le tableau 4 résume tous les résultats des tests réalisés au cours de cette étude

Tableau 10 : Un tableau récapitulatif des différents tests d'identification des entérocoques

Station / antibiotique	Code de la souche	Coloration de Gram	Test de catalase	Test d'oxydase	Test de chaleur (60°C/24h)	Test de salinité (NaCl 6,5%)	Test de Tellurite de Potassium
Ain Taya vancomycine	Ava	+	-	-	+	+	+
Ain Taya tétracycline	Atet	+	-	-	+	+	+
Ain Taya azithromyci ne	Azith	+	-	-	+	+	+
Ain Taya gentamicine	Agen	+	-	-	+	+	-
Ain Taya Bile Esculine Azide	ABEA	+	-	-	+	+	+
Colonel Abes tétracycline	Coltet	+	-	-	+	+	+
Colonel Abes azithromyci ne	Colzith	+	-	-	+	+	+
Colonel Abes gentamicine	Colgen	+	-	-	+	+	+
Colonel Abes ciprofloxac ine	Colcipro	+	-	-	+	+	+
Colonel Abes Bile	ColBEA	+	-	-	+	+	+

Résultats et Discussion

Esculine Azide							
Bateau cassé tétracycline	Bctet	+	-	-	+	+	+
Bateau cassé azithromyci ne	Bczith	+	-	-	+	+	+
Bateau cassé gentamicine	Bcgen	+	-	-	+	+	+
Bateau cassé Bile Esculine Azide	BcBEA	+	-	-	+	+	+
Kheloufi tétracycline	Khtet	+	-	-	+	+	+
Kheloufi azithromyci ne	Khzith	+	-	-	+	+	+
Kheloufi gentamicine	Khgen	+	-	-	+	+	+
Kheloufi Bile Esculine Azide	KhBEA	+	-	-	+	+	+
Sirène tétracycline	Stet	+	-	-	+	+	+
Sirène Bile Esculine Azide	SBEA	+	-	-	+	+	+
Sidi Frej	SFtet	+	-	-	+	+	+
Sidi Frej Bile Esculine Azide	SFBEA	+	-	-	+	+	+

Résultats et Discussion

Production de biofilm :

Les résultats de la production de biofilm sont résumés dans la figure 27. D'après les résultats quasiment toutes les souches étudiées sont productrices de biofilm.

A partir de la figure 27 la majorité des souches étudiées sont moyennement productrice de biofilms avec une densité optique comprise entre 0.1 et 0.5.

La DO la plus élevée est observée au niveau de la souche « SF tet » qui présente potentiellement une adhésion plus importante aux surfaces, Avec une résistance moyenne de 30%.

Les souches « Bc tet » et « col tet » montrent une DO de 0.12 avec une résistance importante de 72%, 77% respectivement.

Les souches « kh GE », « A zith » avec une densité optique de 0.14 et qu'ont une résistance moyenne de ; 36% , 50%, respectivement .

La souche « col zith » est considérée faible productrice de biofilm avec un DO inférieur à 0.1.

On peut comparer nos résultats à une étude rétrospective en Italie qui a déterminé que 80 % des *E. faecalis* des isolats cliniques et 48 % des isolats d'*E. faecium* formaient des biofilms. (**Baldassarri L et al ,2001**). Tandis qu'une autre étude de 47 isolats cliniques a révélé que le phénotype biofilm était associé avec 87% d'*E. faecalis*, mais seulement 16% de souches d'*E. faecium* (**Duprè, Zanetti, Schito, Fadda & Sechi, 2003**).

Une étude ultérieure dans la même région géographique a révélé que 96% de 52 *E. faecalis* provenant d'infections orthopédiques a produit des biofilms in vitro (**Baldassarri L et al ,2006**).

Une étude en Espagne a révélé qu'un peu plus de la moitié des 152 isolats cliniques d'*E. faecalis* ont pu former des biofilms in vitro (**Toledo-Arana et al, 2001**).

Des études au Royaume-Uni ont analysé 109 isolats d'infections du sang et ont montré que, bien que tous les isolats d'*E. faecalis* (n = 71) aient formé des biofilms, moins de la moitié (16/38) des isolats d'*E. faecium* l'ont fait (**Dworniczek E et al, 2005**).

Tous ces résultats sont en concordance avec nos résultats car 89 % de nos bactéries sont des *E. faecalis* et produisent du biofilm.

Résultats et Discussion

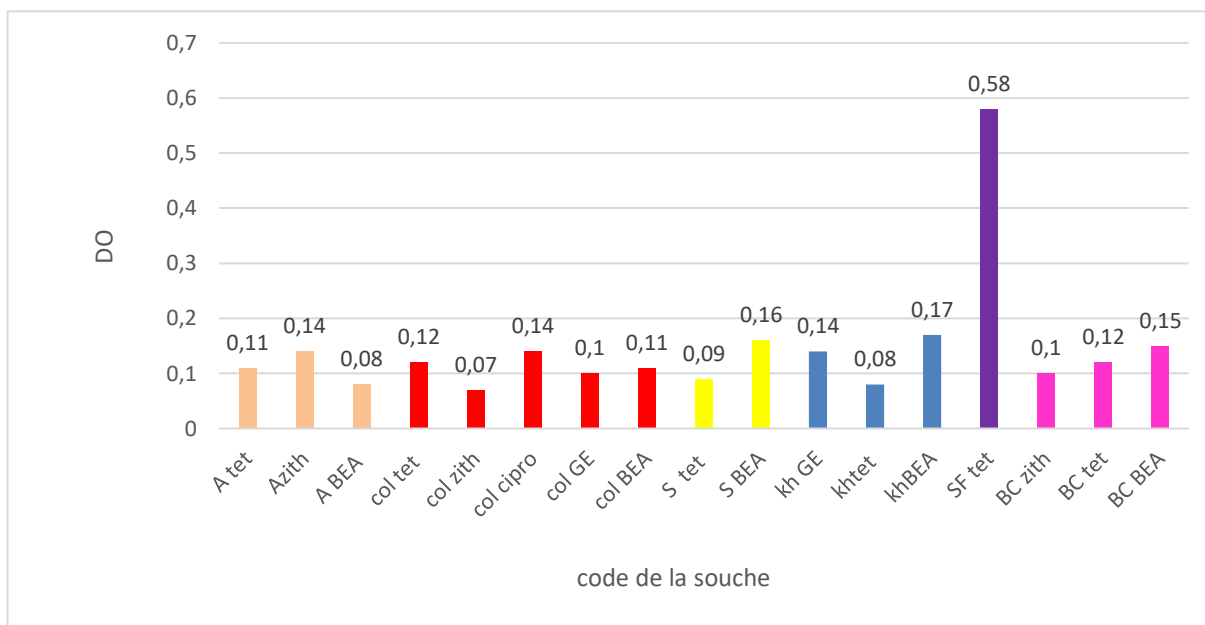


Figure 27 : Résultats de test de production de biofilm par les souches étudiées

III.4 : Antibiogramme :

La résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés à partir de l'eau de mer et des sédiments a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Une collection de 47 souches isolées à partir de l'eau et du sédiment a été mise en place pour l'évaluation de l'état de résistance dans ces plages. Les résultats sont représentés dans les Figures 28 et 29.

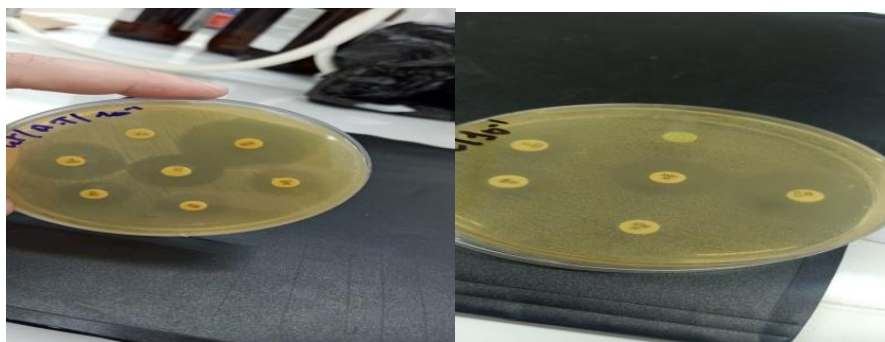
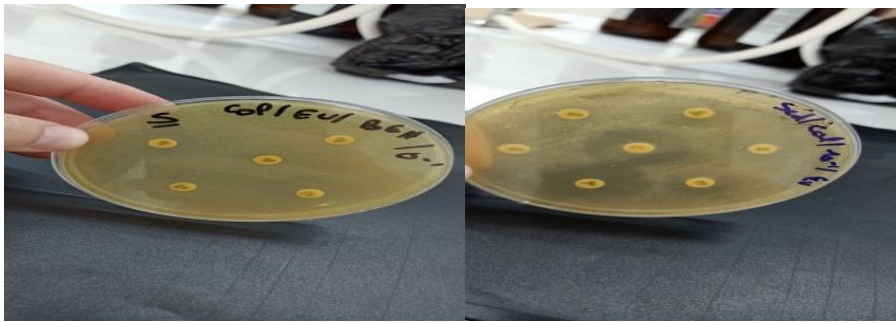


Figure 28 : Résultat d'antibiogramme d'une souche isolée de l'eau de mer

Résultats et Discussion



L'acide nalidixide (NA) ; ceftazidime (CAZ) ; aztréonam (ATM) ;
triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT) ; clindamycine (CD) ;
l'amokacine (AK) ; la gentamicine (CN) ; céfotaxime (CTX) ;

Figure 29 : Résultat d'antibiogramme d'une souche isolée du sédiment

Test de synergie et d'antagonisme : la recherche de la production de céphalosporinases et de bêta-lactamase à spectre élargi chez les souches étudiées a montré qu'aucune image d'antagonisme ou de synergie n'a été constatée.

D'après la figure 30 les isolats montrent une résistance totale 100% à l'acide nalidixique (NA) au niveau de ces stations : Ain taya , Bateau cassé , Khelloufi , et une résistance de haut niveau, 98% pour ceftazidime (CAZ) et aztréonam (ATM), et 93% pour triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT).

Nos résultats sont en concordances avec ceux de Ayten qui a rapporté une résistance de 98% par rapport à l'acide nalidixique . (Ayten Kimiran-Erdem et al, 2006).

Une étude montre un pourcentage de résistance de 19,23% à la triméthoprim-sulfaméthoxazole qui est inférieur par rapport à nos résultats. (Kacimi et Ouazzi, 2018).

Une résistance a été enregistrée pour la tétracycline, la clindamycine (CD), l'amikacine (AK), la gentamicine (CN) et la céfotaxime (CTX) avec des pourcentages de 60%, 45%, 36%, 29%, 24%, respectivement.

Le taux de résistance observé dans notre étude est inférieur à celui retrouvé par Rice en 2001, 95% de résistance à la clindamycine. (Hamchache Z et Oughlici B, 2015)

Résultats et Discussion

Nos résultats montrent des taux de résistance un peu faible à la céfotaxime (24%) par rapport à 63% retrouvé par Adel M. (Adel M et al, 2017). Et 83% retrouvé par Rekik en 2020. (Rekik M., 2020)

Le taux de résistance à l'amikacine retrouvé en 2006 par Ayten Kimiran-Erdem est de 25%, nos résultats sont légèrement supérieurs avec une résistance de 36%. (Ayten Kimiran-Erdem et al, 2006)

Les résultats de la résistance à la gentamycine se rapprochent de ceux retrouvés en France en 1998 avec un taux de 37% (Papa Abdoulaye, 1998). Cependant, d'autres études faites en Algérie en 2012 (Djahmi et al. 2012), en Espagne 2014 (Medell et al. 2014) et en Egypte 2015 (Yassin et al., 2015) ont présentés des taux plus élevés de résistance avec des pourcentages de 54,4%, 66% et 56% respectivement.

Le taux de résistance le plus bas a été observé vis-à-vis de la triméthopime (TMP) 12% et l'ampicilline (AM) 14%.

Nos résultats sont inférieurs à ceux trouvés par Fatemeh Shahi en 2020 concernant ampicilline (69.7%). (Fatemeh Shahi et al, 2020)

Pour la triméthopime-sulfaméthoxazole (SXT), nos résultats montrent une résistance de 98% contrairement à ceux de Chaachoua avec une résistance de 36%. (Chaachoua, 2021).

Le taux de résistance à la tétracycline obtenue est inférieur à celui rapportés en France en 1998 avec 80% (Papa Abdoulaye LO, 1998), et en Algérie en 2012 avec 82,4% (Djahmi et al., 2012).

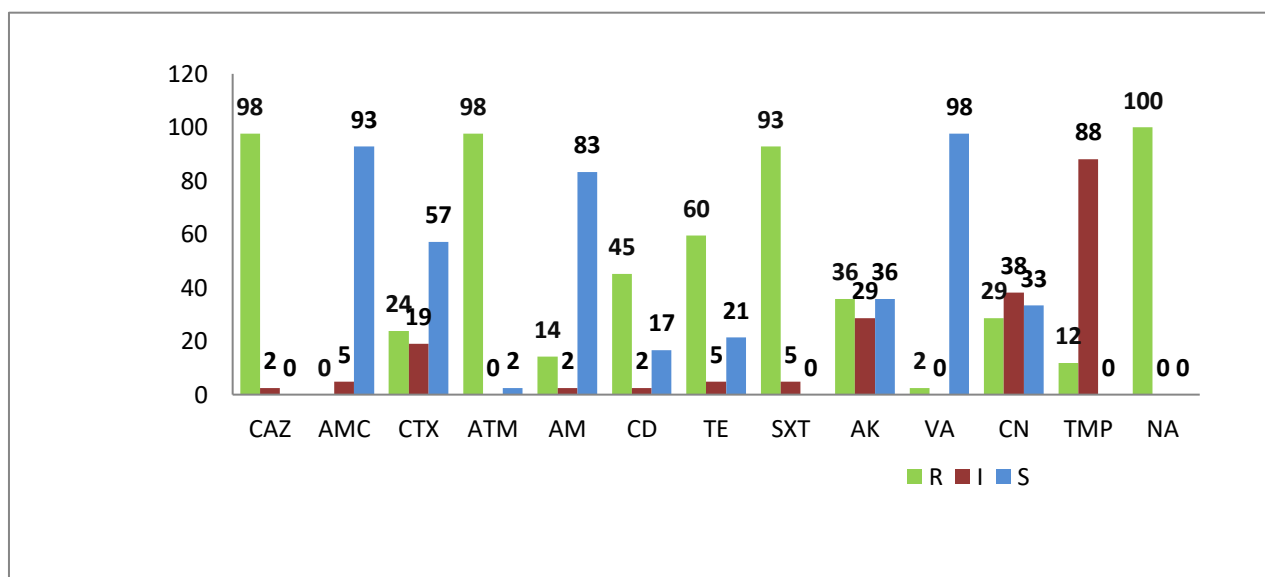
Toutes les souches d'entérocoques ont été sensibles à l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et à la vancomycine (VA).

Concernant la vancomycine, nos résultats sont en concordance avec ceux décrits par une étude multicentrique française qui a rapporté qu'uniquement deux souches sur 1310 souches d'*Enterococcus faecalis* sont résistantes à la vancomycine. (Leclercq, 1994 ; Streff et al., 1996). Et également avec les résultats de 2012, menés au CHU de Annaba où le taux de résistance à la vancomycine était faible (3,2%) (Djahmi et al., 2012).

Nos résultats sont en adéquation avec ceux réalisés en 2015 en Egypte, avec un taux bas de 2%. (Yassin et al., 2015).

Résultats et Discussion

Nos résultats concordent également avec ceux de Rekik (2020), en ce qui concerne la vancomycine. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches isolées ont montré une sensibilité à la Vancomycine.



L'acide nalidixique (NA) ; ceftazidime (CAZ) ; aztréonam (ATM) ; triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT) ; clindamycine (CD) ; l'amikacine (AK) ; la gentamicine (CN) ; céfotaxime (CTX) ; triméthoprim (TMP) ; l'ampicilline (AM) ; tétracycline (TE) ; l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) ; la vancomycine (VA).

Figure 30 : Prévalence de la résistance de 42 souches d'entérocoques isolées aux antibiotiques

Résultats et Discussion

Discussion générale :

Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à une large gamme d'antibiotiques, par conséquent, cela a toujours limité le choix des antibiotiques utilisés contre ces organismes ; *Enterococcus faecalis* vient en première position suivi d'*E. faecium* dans les infections à entérocoques chez les humains (Sujatha R. et al. 2007).

Les entérocoques sont des micro-organismes qui peuvent être trouvés dans le sol, à la surface de l'eau, dans les plantes et les légumes, mais aussi dans les aliments et qui peuvent provoquer des infections telles que l'endocardite, la bactériémie, les voies urinaires et le botulisme néonatal. Leur capacité à développer une résistance contre une large gamme d'antibiotiques pourrait être l'une des raisons de l'augmentation des infections nosocomiales à entérocoques. (Luciana Furlaneto-Maia et al, 2013)

Les entérocoques sont naturellement résistants à divers types d'antibiotiques, y compris les aminosides (à bas niveau), β -lactamines, les fluoroquinolones, les céphalosporines ou encore la clindamycine chez toutes les espèces sauf *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. En plus, on a des résistances dites acquises aux principales classes d'antibiotiques tels que les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides lorsque ces derniers sont utilisés en association (haut niveau de résistance). (Cattoir et Leclercq 2013).

La capacité des entérocoques à acquérir une résistance aux antibiotiques par l'échange de chromosomes, le transfert de transposons et de plasmides, ou des mutations qui rendent difficile la mise en place de mesures thérapeutiques appropriées. (Fatemeh Shahi et al, 2020)

La résistance aux B-lactamines chez les Entérocoques repose sur deux grands types de mécanismes : un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes une bêta-lactamase qui hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines les rendant inactives et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP. (Quincampoix, J.L. Mainardi , 2001)

Toutes les espèces d'*Enterococcus* sont naturellement résistantes aux céphalosporines, à l'exception du ceftobiprole vis-à-vis d'*E. faecalis*. (CASFM, 2020)

Résultats et Discussion

Nos résultats ont montré que les entérocoques isolés présentent une sensibilité à l'amoxicilline + acide clavulanique (93%) et à l'ampicilline (83%). Les souches enregistrent aussi des résistances de bas niveau à céfotaxime (24%) et de haut niveau aux ceftazidime et aztréonam (98%).

Comme tous les streptocoques, les entérocoques possèdent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides en inhibant la synthèse d'ARN. La synergie entre la gentamicine et les bêta-lactamines, permet une action bactéricide. (CASFM ,2020)

Les résultats obtenus dans notre étude montrent une résistance de 36% pour l'amikacine (AK) et 29% pour la gentamicine (CN).

Le traitement des infections sévères à entérocoques par l'ampicilline nécessite des doses élevées d'ampicilline associée à un aminoside pour obtenir une activité bactéricide. (CASFM ,2013)

Les entérocoques sont naturellement sensibles à la vancomycine et à la teicoplanine, à l'exception des trois espèces *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*, qui sont intrinsèquement résistants à bas niveau à la vancomycine et portent le génotype VanE. (Cattoir V. et Leclercq R., 2010).

Un pourcentage de 2% de résistance à la vancomycine a été retrouvé dans notre étude. La résistance à la vancomycine est due à l'acquisition de la souche de l'opéron Van. Il existe quatre types : le type VanA, qui confère une résistance inductible à haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine ; les souches de type VanB confèrent une résistance de niveau variable uniquement à la vancomycine ; les type VanD sont résistants à bas niveau à la vancomycine et à la teicoplanine ; la souche de type VanE possède une résistance de bas niveau à la vancomycine. (F. Garnier et al, 2002)

La résistance aux macrolides est généralement causée par une modification de la cible, elle est le fait d'une méthylase codée par les gènes ermA ou ermB, ou par une existence d'un mécanisme d'efflux par deux déterminants impliqués chez les entérocoques : le gène msrC et le gène mef. (Quincampoix, J.L. Mainardi, 2001)

Les entérocoques possèdent une résistance intrinsèque à la clindamycine, nos souches montrent une résistance de 45% qui est inférieur à celui présenté par Rice en 2001.

Résultats et Discussion

Concernant le profil de résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques triméthoprim-sulfaméthoxazole, l'acide nalidixique et la tétracycline, l'antibiogramme indique une résistance de 93%, 100% et 17% respectivement.

La résistance à la tétracycline est due à une protection de la cible ribosomale par le gène tet M ou par un efflux. (**Garcia Solache M. et Rice I. B., 2014**)

En plus de leur multirésistance aux antibiotiques, toutes les souches étudiées sont capables de produire du biofilm, ceci augmente leur virulence et leur pathogénicité.

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

Cette étude avait comme objectifs, l'évaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Enterococcus* au niveau de 6 plages Algéroises (eau et sédiment) et la caractérisation phénotypique de cette résistance chez des souches résistantes isolées.

A partir des résultats des analyses microbiologiques des coliformes totaux, fécaux et des entérocoques, ces plages ont une qualité d'eau acceptable.

L'évaluation de la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les souches d'entérocoques isolées à partir des eaux de ces sites, a montré :

- Un taux élevé de résistance pour la tétracycline suivie par l'azithromycine,
- Une résistance moyenne pour la gentamicine ainsi que de faible taux de résistance à la ciprofloxacine.
- Toutes les souches présentent une sensibilité à l'amoxicilline, molécule importante en clinique.
- Un très faible taux de résistance (2%) à la vancomycine.
- Presque toutes les souches étudiées sont multi résistantes aux antibiotiques.

Les apports anthropiques influent sur la résistance des bactéries aux antibiotiques dans le milieu marin.

La majorité des souches étudiées sont moyennement productrice de biofilms avec une densité otique comprise entre 0.1 et 0.5.

En perspective, et en continuité à ce travail il est important de caractériser génotypiquement les mécanismes de résistance chez ces souches afin de comprendre leur mécanisme de dissémination et de rechercher d'autres mécanismes de virulence ainsi que de tester un potentiel probiotique de ces souches dans le domaine agroalimentaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A.H.Hammerum (2012). Enterococci of animal origin and their significance for public health , *department of microbiological surveillance and research, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark.*

Adel M. Attia et al., (2017). Phenotypic and Genotypic Identification of Vancomycin Resistant Enterococci from Different Sources. *Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, 44511, Egypt. Food Hygiene Department, Animal Health Research Institute (AHRI ARC 60019332), Zagazig Provincial Lab. Microbiology Department, Animal Health Research Institute (AHRI ARC 60019332), Zagazig Provincial Lab.*

Ana Aguilar-Galvez, Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique, Universidad Nacional Agraria La Molina. Instituto de Biotecnología. Av. La Molina s/n. Lima (Perú). (2) Univ. Liège - Gembloux Agro-Bio Tech. Unité de Bio-industries. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgium). E-mail : bioindus.gembloux@ulg.ac.be

Andrewes F. W., Horder T. J., (1906). A study of streptococci pathogenic for man. *The Lancet.*;168 (4335): p.p 852–855.

Ayten Kimiran-Erdem et al., (2006). Isolation and Identification of Enterococci from Seawater Samples: Assessment of Their Resistanceto Antibiotics and Heavy Metals.

Baldassarri L et al., (2001). Enterococcus spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol (Berl).*; 190(3):113–120. PubMed PMID: 11827199.

Baldassarri L et al., (2006). Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Organs.*;29(4): p.p 402–406.

Bellomo et al., (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhea in pediatrics. *Curr. Ther. Res.*, **28**, p.p 927-936.

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

Berche, P.,et al ., (1988). Bactériologie : Bactérie des infections humaines. Paris : Flammarion, , p.p. 576-592.

Références bibliographiques

Biokar, diagnostics. [en ligne]. [consulté le 11/6/2022] disponible sur le web : www.biokar-diagnostics.fr

Canani R. B et al., (2007)., Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children : randomised clinical trial of five different preparations. *British Medical Journal* p.p 335, 340.

CASFM. (2013). comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie . rapport d'activité . Document non publié.France. France : CASFM.

CASFM. (2020). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie . . rapport d'activité . Document non publié.France : CASFM.

Cattoir V et Leclercq R, (2010). Les entérocoques résistants aux glycopeptides, *MEDCINESCIENCE*2010.vol26.p.p936-942

Cattoir V, Leclercq R. (2013). Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: Is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (4) :p.p 731–42.

CEAEQ. (2014). Centre d'expertise en Analyse Environnementale du Québec : Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et Confirmation à l'espèce *Escherichia coli*. Rapport d'activité .Document non publié .Québec : CEAEQ

CEAEQ.(2016). Centre d'expertise en Analyse Environnementale du Québec : Recherche des coliformes totaux. Rapport d'activité .Document non publié .Québec : CEAEQ

Chaachoua A (2021). caractérisation et évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques dans le milieu marin. Mémoire d'Ingénieur. Biotechnologie marine. Dely brahim : école nationale supérieure des sciences de la mer et aménagement du littoral, p .20

Champagne C., Møllgaard H., (2008). Production of probiotic cultures and their addition in fermented foods. In: Farnworth E., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Second ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group, p.p 71-88.

Christophe ISNARD., (2017). « Enterococcus spp : entre pathogènes opportunistes et probiotiques » *Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie*.

Cindy-Love Tremblay., (2012). Étude de la résistance aux antibiotiques des Entérocoques d'origine animale du Québec, *Département de pathologie microbiologie*. Faculté de médecine vétérinaire

Références bibliographiques

Costerton J.W et al., (1987).Bacterial biofilms in Nature and disease.*annual Review of Microbiology*[en ligne], volume 41, Issue 10.Disponible sur le web:<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251?journalCod=micro>>

Del Papa M et al ., (2007). Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.*, 189(24), p.p 8835-8843.

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

Duprè I et al ., (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol.*; 52(Pt 6):p.p 491–498. PubMed PMID: 12748268.

Dworniczek E et al ., (2005). Virulence of *Enterococcus* isolates collected in Lower Silesia (Poland). *Scand J Infect Dis.* ; 37(9) :p.p 630–636. PubMed PMID : 16126561.

É. Denes A ., N. Hidri, (2009). Synergie et antagonisme en antibiothérapie Antibiotic synergy and antagonism, Service de maladies infectieuses et tropicales, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87000 Limoges, France b Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, CHU Dupuytren, 87000 Limoges, France.

FAO/OMS., (2004). *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo.* Roma : Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud.

FAO/WHO., (2006). *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.* Roma : Estudio FAO Alimentación y Nutrición 85.

Fatemeh Shahi., (2020). Virulence determinants and biofilm formation in clinical isolates of *Enterococcus*: A cross-sectional study

Ferrero L.,(1994). Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: A primary target of fluoroquinolones. *Molecular Microbiology* 13,p.p 641–53.

Folli C et al., (2003). Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus*

François Denis et al., (2007). Bactériologie médicale Techniques usuelles.

Références bibliographiques

Franc E., Colin .N.A. (2019). Detection of Virulence Genes in Multidrug Resistant Enterococci Isolated from Feedlots Dairy and Beef Cattle: Implications for Human Health and Food Safety, *Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, North-West University, Mafkeng, Private Bag X2046, Mmabatho, South Africa*

Frank Eric Tatsing Foka., Collins Njie Ateba, (2019). Detection of Virulence Genes in Multidrug Resistant Enterococci Isolated from Feedlots Dairy and Beef Cattle: Implications for Human Health and Food Safety. *Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, North-West University, Mafkeng, Private Bag X2046, Mmabatho, South Africa*

Garcia Solache M., Rice I. B. (2014). the Enterococcus: a Model of Adaptability to It's from Soft Cheese in Southern Brazil. *Advances in Microbiology*.p.p 175-181.

Garneau-Tsodikova S., Labby KJ (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives. *Med. Chem. Commun.* 7, p.p 11-27.

Garnier F et al. Sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylocoques et d'entérocoques isolées en pédiatrie Antibiotic susceptibility of staphylococcus and enterococcus in pediatrics, a Laboratoire de microbiologie, hôpital St-Vincent-de-Paul, 82, av. Denfert-Rochereau, 75014 Paris, France.

Gaudy., Bbuxeraud, (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Paris: Elsevier, , P216-219, p.p 232-233.

Gracia-solache M., Rice L.B., (2019). The enterococcus: a model of adaptability to is environment. *Clinical Microbiology Reviewes* 2019.vol32 p.p. 1-28

Grosjean J., et al. 2017. bactériologie et virology pratique.3^eédition révisée .Paris (France) : De boek superieur. [En ligne]. Disponible sur le web : <http://www.unitheque.com/bactériologie-virologie-pratique/de-boek-superieur/Livre/103839.292> p.

Hamchache ., Oughlici B, (2015). Isolement, identification et caractérisation des entérocoques multirésistantes isolées au CHU de Bejaia (Bejaia).Memoire de Master .pharmacologie moléculaire. Bejaia : Université A.Mira .p48.

HammerumetA.M (2012), Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Meat: A Human Health Hazard *Foodborne Pathog Dis.* 7(10):

Références bibliographiques

Jett B., Huycke M., Gilmore M., (1994). Virulence of enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 7(4), p.p. 462-478.

Kalina A. P., (1970). The position of enterococci in the system of microorganisms. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii p.p . 47:20–1.

Kayser F., (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. Int. J. Food Microbiol. 88, p.p 255-262.

Krystyna CYBULSKA., Teresa KRZYŚKO-ŁUPICKA., (2020). ANTIBIOTICS RESISTANCE IN Enterococcus ISOLATES FROM POULTRY WASTE

LeBlan., (2006), Les entérocoques : avantages et inconvénients en Biotechnologie (synthèse bibliographique), *Universidad Nacional Agraria La Molina*.

LECLERCQ R .,(2001). Faut-il identifier les entérocoques, et comment ? La lettre de l'infectiologie-Tom XVI –n°7-septembre p.p.217-222

Leclercq, R. (1994). Epidémiologie des infections nosocomiales à entérocoques. Médecine Mal Infect 24, p.p 199–206.

Luciana Furlaneto-Maia., (2014). Antimicrobial Resistance in Enterococcus sp Isolated from Soft Cheese in Southern Brazil, 1 Department of Food Microbiology, Technological Federal University of Paraná, Londrina, Brazil 2 Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, Brazil.

Madjmaa ., Boulmaize., (2016). Isolement et caractérisation des souches d'entérocoque multi résistantes en clinique au niveau de CHU Khellil Amrane, Mémoire de Master .Microbiologie en secteur biomédical et Vétérinaire .Bejaia : Université A.MIRA.57p.

Magniez (2014) . Méthode de dénombrement des micro-organismes en milieu liquide (Méthode dite du nombre le plus probable. [en ligne]. [consulté le 15/6/2022]. Disponible sur le web : <http://biotechnologie.over-blog.com/2014/11/methode-de-denombrement-des-micro-organismes-en-milieu-liquide-methode-dite-du-nombre-le-plus-probable.html>

Mainardi J.-L et al., (2008). Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Reviews 32, p.p. 386–408.

Références bibliographiques

Maldonado N et al., (2007) .A simple technique to ditecte Klebsiella biofilm-forming-strains.Inhibitory potentiel of Lactobacillus fermentum CRL 1058 whole cells and products.Communication current Research and education Topics and Trends.applied microbiology [en ligne]. [consulté le 2/6/2022] Disponible sur le web : <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1319562X20304332>>

Manero A., Blanch A., (1999). Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Appl. Environ. Microbiol., 65(10), p.p. 4425-4430.

Matyara F et al., (2008). Antibacterial agents and heavy metal Références bibliographiques resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment. 407, p.p 279-285.

Medell, M., et al., (2014). Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium obtenidos de pacientes hospitalizados. Biomédica 34, p.p 50–57.

Michael S et al ., (2014). Enterococci from Commensals to Leading Causes of Drug Microbiologie, CHU de Caen, avenue Côte de Nacre, 14033 Caen, France.

Miller W et al., (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Review of Anti-Infective Therapy 12, p.p. 221–36.

Monica G., Louis B.,(2019). The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment, *a Department of Medicine, Rhode Island Hospital, Warren Alpert Medical School of Brown USA. University: Providence, Rhode Island,*

Murray., (1990). The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev., 3(1), p.p 46-65.

Muruleedhara N., (2021). Enterococci in the Environment

Nauciel C., Vildé JL., (2005). Principales familles d’antibiotiques et leur mode d’action Edition Paris : Masson, .p.p. 49-56p.

Références bibliographiques

Oram, B. (2014). *Stream Water Quality – Importance of Temperature*. [en ligne]. [consulté le 2/6/2022] disponible sur le web : <https://www.water-research.net/index.php/stream-water-qualityimportance-of-temperature>

Papa Abdoulaye LO. (1998). vancomycine resistance et haut niveau de resistance aux aminosides de souches d'enterocoques isolées à Dakar.

Pendleton J. N., et al ., (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert review of anti-infective therapy 11, p.p 297–308.

Quincampoix J.C., Mainardi. J.L, (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Service de microbiologie clinique, hôpital européen Georges-Pompidou, 20, rue Leblanc, 75015 Paris, France*

Rekik M. (2020). Caractérisation et évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques dans le milieu marin, mémoire d'Ingenieur.biotechnologie marine. Dely Brahim : école nationale supérieure des sciences de la mer et aménagement du littoral.p.17

Rodier et al., (2005). analyse de l'eau, des eaux naturelles, des eaux résiduelles, eaux de mer .Ed. paris : DUNOD, p.1383.

Santé journal des femmes. (2022).Enterococcus faecalis : définition,urine, est ce que grave ?

Schleifer K. H., 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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.;34(1) p.p :31–34.

Sherman JM.,(1937). The streptococci. Bacteriological Reviews.p.p ;1:3–97

Singleton P., (2005), ., Bactériologie. 6emeédition. Paris : Dunod, P.p.115-125.

Soussy CJ., (2007). Résistance bactérienne aux antibiotiques. In Soussy CJ. Les infections urinaires : Monographies en urologie. pp. 21-46

Streff, K., (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. Médecine Mal Infect 26, p.p 704–713.

Stucki K et al .,(2014) .Infection à entérocoques : du plus simple au plus complexe

Références bibliographiques

Theresa Wagner., (2018). Virulence Determinants of *Enterococcus faecium*. *Adissertation for the degree of Philosophoae Doctor.*

Toledo-Arana A et al., (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* bio€lm formation. *Appl Environ Microbiol.* 67(10) : p.p. 4538–4545.

Turcotte C et al., (2004). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol*, **90**, p.p .283-293.

Van Tyne D., M. Gilmore., (2014). Friend Turned Foe: Evolution Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance .*Annu Rev Microbial.*2014.vol.68.p 337-356.doi:10.1146.

Woodford N., (1993). Comparison of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, p.p 681–84.

Wunderlich P et al., (1989). Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus SF68* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *The Journal of International Medical Research* 17, p.p 333–38.

Yala D et al., (2001). Resistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* 91,p.p. 6-14.

Yassin, A., (2015). Molecular characterization of *Enterococcus* spp. clinical isolates from Cairo, Egypt. *Indian J Med Microbiol* 33, p.80.

Yomna A Hashem et al., (2017). Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin

Zitvogel L et al ., (2015). Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Science Translational Medicine* 7,p. 271

Annexes

Annexes

Tableau 04 : Résultats de l'antibiogramme des souches d'entérocoques étudiées

(R : Résistant ; S : Sensible ; I : Intermédiaire ; m : mutants ; le diamètre en mm)

	CAZ	AMC	CT X	AT M	A M	C D	T E	SX T	A K	V A	C N	TM P	N A
Ava	0	10S	30S	0	12S		30 S	10m R	25 S	14 m R	2R	10R	0
Atet	0	15 S	20I	0	7R	9R	35 S	15R	13 R	23 S	10 R	22 I	0
A0. zith	15m I	16mS	36m S	40m S	0	10 R	7 R	20R	20 S	22 S	17 S	27 I	0
Agen	0	15S	32S	0	25S		35 S	20R	15I	25 S	10 R	2R	0
ABEA	0	17mS	27m S	0	2m R	9m R	35 S	15R	10 R	20 S	10 R	25R	0
Coltet	0	19m S	15m I	0	11S	10 m R	25 m S	19R	22 S	24 S	14 mI	26 I	0
Colzith	0	13S	24S	0	13S	12 R	32 S	21R	18 S	22 S	16 S	26 I	0
Colgen	0	8R	10m R	0	7 R		10 R	18R	9R	25 S	0	23 I	0
Colcipro	0	19S	0	10R	11 S	10 R	10 R	0	22 S	5R	16 S	0	0
ColBEA	0	20S	26S	0	15S	12 R	35 S	20R	15I	22 S	19 S	31 I	0
Bctet	0	19S	24S	0	11 S	30 mS	35 m S	21R	15I	25 S	12 I	26 I	0
Bczith	0	11m S	14m I	0	10 mS		10 m R	23m R	18 S	26 S	13 I	29m I	9m R

Annexes

Bcgen	0	8 R	10M R	0	7 R		10 R	18 R	9 R	25 S	0	23 I	0
BcBEA	0	20 S	25 S	0	12 S	13 S	35 S	6 R	13 R	22 S	14 I	25 I	0
Khtet	0	13 S	21 I	0	20 S	35 R	33 S	19 R	16 I	23 S	13 I	25 I	0
Khzith	0	18m S	25m S	0	23 m S		9 R	18 R	18 m S	25 S	16 m S	24m I	0
Khgen	0	21 S	23 S	0	9m I		40 S	27 R	0	25 S	0	33 I	10 R
KhBEA	0	20 S	0	0	15 S	15 m I	34 S	20 R	16 I	23 S	14 I	22 I	0
Stet	0	24 S	32 S	0	17 S	9 R	33 S	22 I	16 I	22 S	17 S	26 I	0
SBEA	0	14 S	25 S	0	12 S	10 R	32 S	15 R	20 S	25 S	15 S	25 I	0
SFtet	0	23 S	25 S	0	15 S	6 R	34 S	20 R	5 R	21 S	14 I	25 I	0
SFBEA	0	25 S	36 S	0	0	20 S	21 S	2 R	20 S	6 R	23 S	36 I	0

Tableau 05 : Dénombrement des entérocoques et des coliformes isolés à partir de l'eau de mer :

	Entérocoques	Les coliformes totaux	Les coliformes fécaux
Ain Taya	32	12	0
Sérène	8	0	2
Bateau cassé	18	9	2
Colonel Abes	78	0	2
Kheloufi I	14	3	0
Sidi Frej	10	0	0

Annexes

	Ain Taya	Bateau cassé	Sirène	Colonel Abes	Kheloufi I	Sidi Frej
Va	10	0	0	0	0	0
Tet	27	13	8	0	9	3
Gen	0	0	0	3	5	0
Zith	16	3	0	40	5	0
Cipro	0	0	0	3	0	0
Amox	0	0	0	0	0	0
BEA	32	18	8	78	14	10

Tableau 06 : Taux de la résistance (prévalence résistance) des souches d'entérocoques isolé à partir de l'eau de mer

	Ain Taya	Bateau cassé	Sirène	Colonel Abes	Kheloufi I	Sidi Frej
Amox	0	0	0	0	0	0
Cipro	0	0	0	4	0	0
Va	31	0	0	0	0	0
Gen	0	0	0	4	36	0
Zith	50	17	0	51	36	0
Tet	84	72	100	0	64	30

Tableau 07 : Dénombrement d'entérocoques par la méthode NPP isolé à partir de sédiments

	Entérocoques	Coliforme fécaux	Coliformes totaux
Ain Taya	0	0	210
Bateau cassé	0	0	310
Sirène	0	0	100
Colonel Abes	15	0	301
Sidi Frej	0	0	0
Kheloufi I	23	0	332

Annexes

Taleau08 : Les normes de salubrité des plages, normes algériennes (Décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993) (BENAMAR, 2006)

Germes	Valeurs limites
Coliformes totaux /100ml	500 - 10000
Coliformes fécaux /100ml	100 -2000
Entérocoques / 100ml	100

Les composants des milieux de cultures :

Le milieu de Slanetz et Bartley :

Peptone	20g
Extrait de levure	5g
Glucose	2g
Monohydrogénophosphate de potassium	4g
Azide de sodium	0,4g

Le milieu BEA :

Tryptone	17g
Peptone	3g
Extrait de levure	5g
Bile déshydratée de bœuf	10g
NaCl	5g
Citrate de sodium	1g
Esculine	1g
Citrate de fer ammoniacal	0,5g
Azide de sodium	0,25g
Gélose	15g

Annexes

Le milieu tergitole :

Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Lactose	20g
Bleu de bromothymol	0,05g
Agar	20g

Le bouillon BLBVB :

• Peptone	10,0 g
• Lactose	10,0 g
• Bile	20,0 ml
• Vert brillant	13,0 mg
• pH = 7,4	

Le bouillon BHIB :

Digestion enzymatique de tissus animaux	10.0 g
Infusion De Cerveille De Veau Déshydratée	12.5 g
Infusion de coeur de boeuf déshydraté	5.0 g
Glucose	2.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Hydrogénophosphate disodique, anhydre	2,5 g

Le milieu muller-hinton :

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12,5 mg
Agar	15,0 g
pH = 7,4 +/- 0,2	
Eau distillée qsp 1 L	

Annexes

Le milieu Litsky :

peptone	20,0 g
glucose	5,0 g
azide	0,2 g
éthyl-violet	0,5 g
NaCl	5,0 g
hydrogénophosphate de potassium	2,7 g
dihydrogénophosphate de potassium	2,7 g
pH= 6,8	

Résumé

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

Un total de 47 souches d'Entérocoques a été collecté, en mois de mars, à partir de différents plages algéroises. Les souches isolées ont été soumises à l'étude de leur résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton.

Les taux résistance les plus élevés concernent l'acide nalidixique (NA), la ceftazidime (CAZ), l'aztréonam (ATM), la triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT). Le taux de résistance le plus bas a été observé vis-à-vis de la triméthoprime (TMP), l'ampicilline (AM) et la tétracycline (TE). Les souches d'entérocoques présentent une sensibilité à la vancomycine.

Mots clé : Entérocoques, Résistance, Antibiotiques, Sensibilité

Abstract

Enterococci are bacteria that have been used for centuries in food processing. However, these are faecal contamination markers, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the most encountered species.

47 strains of Enterococci were collected in March from different Algiers beaches. The isolated strains were subjected to the study of their resistance to antibiotics by the method of diffusion of discs on Mueller-Hinton agar.

The highest resistance rates concern nalidixic acid (NA), ceftazidime (CAZ), aztreonam (ATM), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). The lowest resistance rate was observed against trimethoprim (TMP), ampicillin (AM) and tetracycline (TE). Strains of enterococci show sensitivity to vancomycin.

Keywords: Enterococci, Resistance, Antibiotics, Sensitivity

الملخص

المكورات المعوية هي بكتيريا تم استخدامها لعدة قرون في معالجة الأغذية. ومع ذلك هي علامات التلوث البرازي، *Enterococcus faecium* والمكورات المعوية البرازية وهي أكثر الأنواع التي تمت مواجهتها.

تم جمع 47 من المكورات المعوية في مارس من شواطئ مختلفة في الجزائر العاصمة. تم إخضاع السلالات

المعزولة لدراسة مقاومتها للمضادات الحيوية بطريقة انتشار الأقراص على أجار مولر-هينتون.

أعلى معدلات المقاومة تتعلق بحمض الناليديكسيك، سيفتازيديم، أز تريونام، تريميثوبريم-سلفاميتوكسازول.

والنتراسيكلين لوحظ أقل معدل مقاومة ضد تريميثوبريم. تظهر سلالات المكورات المعوية حساسية تجاه الفانكوميسين الأمبسلين

الكلمات المفتاحية: المكورات المعوية، المقاومة، المضادات الحيوية، الحساسية