

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



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT EN SCIENCES DE LA MER
OPTION : BIOTECHNOLOGIE MARINE**

Thème :

**Caractérisation de la virulence des
entérocoques isolés du milieu marin**

Présenté par :

FALEK Nessrine

HADDAR Imene

Soutenu le devant le jury composé de :

Mme. Alouche S.

- ENSSMAL

Présidente

Mme. Chaou N.

MAA - ENSSMAL

Promotrice

Mme. Boukharouba A.

- ENSSMAL

Examinatrice

Année universitaire : 2024- 2025

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers Dieu pour sa grâce et sa guidance qui ont illuminé mon parcours.

Je remercie sincèrement **ma promotrice, Madame Chaou**, pour son encadrement attentif, sa disponibilité et la qualité de ses conseils. Sa rigueur, sa bienveillance et sa confiance m'ont guidée tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également aux **ingénieurs du laboratoire, Monsieur Djeray, Monsieur Yassine et Madame Houda**, pour leur accueil, leur patience et leur aide précieuse. Leur professionnalisme a grandement contribué à la réussite de ce projet.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers les membres du jury : **madame Alouche et madame Boukharouba** d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents et ma famille pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants, qui ont été des piliers essentiels tout au long de mon parcours.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACE

À mon père **FARID** Ta force silencieuse et ton amour discret ont été mon repère.

Merci d'avoir toujours été là, même sans mots, mais toujours avec le cœur.

À ma mère **NADIA** on amour a été mon abri, ta patience ma lumière.

Dans chacun de mes pas, il y avait ton souffle, ta force et tes prières silencieuses.

Merci pour tes sacrifices, ton soutien indéfectible et ton cœur immense.

À mes sœurs **HIBA, ROA, LINA** Votre amour, votre soutien et vos mots doux ont illuminé ce parcours. Merci d'avoir été mes piliers, mes confidentes, et ma lumière dans les jours gris.

À mon frère **MIDOU** Ta présence discrète et ton regard protecteur ont souvent été ma force.

Merci d'avoir été là, silencieusement, mais toujours avec le cœur.

À mon binôme **IMENE** Merci pour ta confiance, ta patience et ton esprit d'équipe.

Fière d'avoir partagé ce chemin avec toi.

À **ASMA, SOUAD, OUMEIMA, WIDED et MOUDJI** Votre présence a rendu ce parcours plus léger, plus humain, et infiniment plus beau. Merci pour les fous rires, le soutien, les longues soirées d'étude et les petits moments partagés au quotidien.

À mes amis **IBTIHEL, FATEN, FATMA**, Merci pour votre soutien, votre entraide et votre bonne humeur tout au long de cette aventure. Votre présence a transformé ce parcours en une belle expérience collective, pleine de souvenirs et de complicité.

À **ASSIA MOUHOUB** Ton absence laisse un vide, mais ton souvenir demeure vivant dans nos cœurs et dans chaque instant partagé. Que Dieu t'accorde Sa miséricorde et t'accueille dans Son infinie paix.

À mon cher chat **SISOU**, parti trop tôt mais vivant pour toujours dans mon cœur. Ton souvenir est ma lumière éternelle..

NESSRINE

DEDICACE

Avant toute chose, je rends grâce à **Dieu**, Le Très-Haut, Le Clément et Le Miséricordieux, pour m'avoir accordé la force, la patience et la sérénité tout au long de ce parcours. C'est grâce à Sa volonté que ce travail a pu voir le jour. Qu'Il soit loué pour Ses bienfaits visibles et invisibles.

Au terme de ce parcours exigeant mais passionnant, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toutes celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce mémoire. Avant tout, je dédie ce travail à **mes parents**, piliers de ma vie, pour leur amour inconditionnel, leurs encouragements et leurs sacrifices silencieux. À mes frères **Amine** et **Rafik**, ainsi qu'à mes sœurs **Zineb** et **Narimane**, merci pour votre présence, vos rires, et votre soutien précieux dans les moments les plus durs.

Je dédie également ce mémoire à mes deux proches amies **Lamis** et **Ikram**, pour leur bienveillance, leurs mots toujours justes et leur loyauté sans faille. À **Sabrina**, ma cousine et ma meilleure amie, ton écoute et ton énergie m'ont accompagné tout au long de ce chemin ; tu n'as pas simplement été à mes côtés : tu as été une force discrète mais puissante, un moteur dans les moments d'épuisement, un rappel silencieux que je n'étais jamais seule. Ton soutien n'a pas seulement compté, il a été essentiel.

Je dédie avec sincérité ce travail à **Mme CHAOU**, ma promotrice, pour sa patience, sa pédagogie exigeante et son accompagnement méthodique. Son regard professionnel et ses conseils m'ont profondément guidé dans la réalisation de ce travail.

Je dédie également ce mémoire à mon binôme **Nessrine**, pour son sérieux, sa collaboration harmonieuse et son implication continue. À tous mes amis, **Ibtihel**, **Fatma**, **Rania**, **Souad**, **Faten** compagnons de route fidèles, pour leur soutien moral et leurs moments de partage, pour les moments de légèreté, d'inspiration et de solidarité que nous avons partagés. Et à toute ma promotion de biotechnologie, je garde en mémoire cette belle aventure humaine, riche en défis, en apprentissages et en amitiés durables.

Enfin, une pensée profondément émue à mon amie **Assia**, qu'Allah lui fasse miséricorde, qu'Il l'accueille dans son vaste paradis et apaise nos cœurs. Elle restera à jamais présente dans ma mémoire et dans ce travail que je lui dédie humblement.

IMENE

Résumé :

Cette étude a été menée afin d'évaluer la virulence et la résistance aux antibiotiques des entérocoques marins isolés sur le littoral algérois. Un total de 122 souches a été soumis à une série de tests phénotypiques incluant la capacité hémolytique, la production de coagulase, la formation de biofilm et l'activité bactériocinogène. Les résultats montrent que seules 5,93 % des souches présentent une activité hémolytique, avec une répartition variable selon l'origine des isolats. La production de coagulase est restée rare, tandis qu'un pourcentage modéré de souches a montré une capacité à former des biofilms. Par ailleurs, l'activité bactériocinogène s'est révélée limitée, suggérant une faible capacité d'inhibition entre souches. L'étude de la résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur gélose Muller-Hinton a révélé des taux élevés de résistance à l'acide nalidixique. Ces résultats soulignent le potentiel pathogène de certaines souches et la nécessité d'un suivi microbiologique des milieux marins pour prévenir les risques sanitaires.

Mots clés : Entérocoques marins, Biofilm, Bactériocine, Coagulase, Hémolyse, Antibiotiorésistance, Virulence.

Abstract:

This study was conducted to evaluate the virulence and antibiotic resistance of marine enterococci isolated from the Algerian coastline. A total of 122 strains were subjected to a series of phenotypic tests, including hemolytic activity, coagulase production, biofilm formation, and bacteriocin activity. The results showed that only 5.93% of the isolates exhibited hemolytic activity, with variability depending on their origin. Coagulase production was rare, while a moderate proportion of strains demonstrated the ability to form biofilms. Additionally, bacteriocin activity was limited, indicating a low inhibitory capacity among strains. Antibiotic resistance testing, using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar, revealed high levels of resistance to nalidixic acid. These findings highlight the pathogenic potential of certain strains and underscore the need for regular microbiological monitoring of marine environments to mitigate public health risks.

Keywords: Marine enterococci, Biofilm, Bacteriocin, Coagulase, Hemolysis, Antibiotic resistance, Virulence.

:الملخص

أُجريت هذه الدراسة بهدف تقييم الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية لدى المعويات المعوية البحرية المعزولة من الساحل الجزائري. تم إخضاع ما مجموعه 122 عزلة لسلسلة من الاختبارات الفينوتيبية، بما في ذلك النشاط الحالّ للدم، وإنتاج الكوجولاز، وتكوين الغشاء الحيوي، ونشاط البكتريوسين. أظهرت النتائج أن 5.93% فقط من العزلات أظهرت نشاطاً حالاً للدم، مع تفاوت في النتائج حسب مصدر العينة. كان إنتاج الكوجولاز نادراً، في حين أظهرت نسبة معتدلة من العزلات قدرة على تكوين الأغشية الحيوية. بالإضافة إلى ذلك، كان نشاط البكتريوسين محدوداً، مما يشير إلى قدرة تثبيط ضعيفة بين العزلات. وقد كشفت اختبارات مقاومة المضادات الحيوية، باستخدام طريقة الانتشار على وسط مولر-هينتون، عن مستويات مرتفعة من المقاومة لحمض الناليديكسيك. تسلط هذه النتائج الضوء على الإمكانيات الممرضة لبعض العزلات، وتؤكد على ضرورة المراقبة الميكروبيولوجية المنتظمة للبيئات البحرية للحد من المخاطر الصحية المعويات البحرية، الغشاء الحيوي، البكتريوسين، الكوجولاز، تحلل الدم، مقاومة المضادات الحيوية، :الكلمات المفتاحية الضراوة.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT	II
DEDICACE	III
Résumé	V
Liste des figures	X
Liste des tableaux	XII
Liste des abréviations	XIII
INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	4
I.1 Généralités sur les entérocoques	5
I.1.1 Données historiques	5
I.1.2 Taxonomie	5
<i>Caractères culturaux</i>	6
<i>Caractères</i>	7
I.1.3 Habitat	7
I.1.4 Épidémiologie des Entérocoques	8
I.1.5 Isolement	8
I.1.6 Physiopathologie et pouvoir pathogène	8
I.2 La virulence des entérocoques	9
I.2.1 Facteurs de virulence des entérocoques	9
I.2.1.1 Facteurs de virulence favorisant la colonisation des cellules	10
<i>I.2.1.1.1 Protéines « ESP » de surface extracellulaire</i>	10
<i>I.2.1.1.2 Substance d'agrégation « SA »</i>	11
I.2.1.1.4 Antigène spécifique de l'endocardite « EfaA »	12
I.2.1.2 Facteurs de virulence affectant les tissus	13
<i>I.2.1.2.1 Entéroisine</i>	13
<i>I.2.1.2.2 Cytolysine « β-hémolysine »</i>	14
<i>I.2.1.2.3 Hyaluronidase</i>	14
<i>I.2.1.2.4 Gélatinase</i>	15
I.2.1.2.5 Phéromones sexuelles	16
<i>I.2.1.2.6 Formation de biofilm bactérien</i>	17
I.3 Antibiorésistance des Entérocoques	19
I.3.1 Historique et définition	19
I.3.2 Fonctionnement	20

I.3.3 Principaux paramètres influençant l' activité de l' antibiotique :	21
I.3.4 Critères de classification des antibiotiques	22
I.3.5 Classification et mode d' action	23
I.3.6 Résistances des entérocoques aux antibiotiques	24
I.3.7 Rôles et Applications des entérocoques	26
I.3.8 Indicateurs de présence de contamination fécale	26
I.3.9 Utilisation des entérocoques comme probiotiques	26
I.3.10.....	27
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	29
II.1 Présentation de la zone d'étude et origine des souches	30
II.2 Techniques d'identification des entérocoques	33
II.2.1 Revivification des entérocoques	33
II.2.2 Les Tests confirmatifs	34
II.2.3 Tests de virulence	35
II.2.3.1 Formation du biofilm	35
II.2.3.2 Test de coagulase	36
II.2.3.3 Test d' hémolyse	37
II.2.3.4 Production de bactériocine	37
II .4 Étude de la résistance aux antibiotiques par antibiogramme	40
III. RESULTATS ET DISCUSSION	44
III. Résultats et discussion	45
III.1 Résultats des tests de confirmations	45
III.1.1 Revivification des souches	45
III.1.2 L' Isolement	45
III .1.2 Confirmation dans le milieu BEA	46
III.1.4 Test de la catalase	47
III.1.5 Test de l' oxydase	48
III.1.6 Coloration de Gram	48
III.2 Résultats des tests de virulence	49
III.2.1 Test de coagulase	49
III.2.2 Test de biofilm	49
III.2.3 Test de production de bactériocines	51
III.2.4 Test d' hémolyse	52

III.3 Résistance aux antibiotiques	54
III.3.1 L' antibiogramme	54
III.4 Discussion générale	59
CONCLUSION	63
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65
ANNEXES	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1:Arbre phylogénique du genre Enterococcus reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Patel, et al., 1998)	6
Figure 2:Ensemble de protéines extracellulaires exprimées en surface d'une souche Bactérienne (ACHARYA, 2021)	11
Figure 3:Association des acides aminés pour former des peptides de type entérocyne (aguilar-Galvez, et al., 2012)	13
Figure 4:Production de la toxine Cytolysine à partir d'une souche bactérienne (SKALS, et al., 2013).....	14
Figure 5:Structure chimique de facteur de virulence bactérien l'hyaluronidase (RUHAL, et al., 2021)	15
Figure 6:Souches bactériennes productrices de la gélatinase en microscope photonique (DEL PAPA, et al., 2007)	16
Figure 7:Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide (DOUARCHE, et al., 2018)	18
Figure 8:Production du biofilm par une souche d'E. faecalis dans un tissu valvulaire au fil du temps. Image obtenue par comptage sur plaque en microscopie électronique à balayage à haute résolution (FESEM) (CHUANG-SMITH, et al., 2010)	18
Figure 9:Résistance des entérocoques à la vancomycine aux états unis de 1989 à 2003. (Leclercq, et al., 2005)	21
Figure 10:Mode d'action des antibiotiques (Torche S. et Bensegueni L,2020)	23
Figure 11:Mode d'action des antibiotiques (Torche S. et Bensegueni L,2020)	23
Figure 12:Situation géographique des sites de prélèvement (ArcGIS)	30
Figure 13:Situation géographique des sites de prélèvement (ArcGIS)	30
Figure 14:plage ain taya	31
Figure 15: Bateau cassé	31
Figure 16: plage sirène	32
Figure 17:plage sidi fredj	32
Figure 18:Plage Kheloufi I	33
Figure 19:Plage Colonel Abbas	33
Figure 20:: a : La culture bactérienne après 6h d'incubation b : Lavage avec cristal du violet c : La culture bactérienne après fixation par l'éthanol	36
Figure 21:: a : Plasma du lapin b : Culture bactérienne dans du BHIB	37
Figure 22:Schéma du mode opératoire de production de bactériocine	39
Figure 23:disposition des disques	42
Figure 24:Schéma de la disposition des disques d'antibiotiques.	43

Figure 25:Résultats de l'isolement sur le milieu Slanetz	46
Figure 26:Résultat de la confirmation sur le milieu BEA prise par nous	47
Figure 27:Résultat du test catalase	47
Figure 28:Résultat de test oxydase	48
Figure 29:Résultat de coloration de Gram sous microscope optique Gx20	49
Figure 30:Coagulase négative : pas d'agglutination	49
Figure 31:Résultats de la densité optique du test de biofilm	50
Figure 32:Pourcentage du test de biofilm des souches étudiées	51
Figure 33:Résultat de la production de bactériocine sur la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinique (la même bactérie)	52
Figure 34:Résultat de la production de bactériocine sur la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> marine.	52
Figure 35:Résultat d'hémolyse partiel dans la souche 35 et l'absence d'hémolyse dans la souche 36.	52
Figure 36:Résultat d'hémolyse complète de la souche 49.	53
Figure 37:Pourcentage du test d'hémolyse	54
Figure 38:Profil de la résistance aux antibiotiques des souches	55
Figure 39:Résultats de l'antibiorésistance par site.	58
Figure 40:Résultat de l'antibiorésistance des souches isolées	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Modes d'action des principaux antibiotiques contre les entérocoques et types de résistance associée. (Bourdon, 2011)	25
Tableau 2: Principales sources d' <i>Enterococcus</i> spp. Dans les aliments (aguilar-Galvez, et al., 2012)	28
Tableau 3: Coordonnées géographiques de la plage 'Flots bleus'	31
Tableau 4: Coordonnées géographiques de la plage 'Bateau Cassé'	31
Tableau 5: Coordonnées géographiques de la plage 'Sirène II'	32
Tableau 6: Coordonnées géographiques de la plage 'Sidi Fredj'	32
Tableau 7: Coordonnées géographiques de la plage 'Kheloufi I'	33
Tableau 8: Coordonnées géographiques de la plage 'Colonel Abbas'	33
Tableau 9: Tests d'identifications des entérocoques	34
Tableau 10: liste des antibiotiques en disques utilisés	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ace : protéine de liaison au collagène

Acm : Gène codant une protéine de liaison au collagène

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AK : Amikacine

AMC : Amoxicilline-acide clavulanique

AMX : Amoxicilline

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique

BEA : bile-esculine azide

BHIB : Bouillon Cerveau-Cœur

C : Chloramphénicol

CAZ : Céftazidime

CD : Clindamycine

CFZ : Céfazoline

CIP : Ciprofloxacine

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CTX : Céfotaxime

DOX : Doxycycline

Efa A : Antigène A spécifique des souches d'endocardite

EfAfs: *endocarditis-specific antigen A of Enterococcus faecalis*

EF-G : acteur d'élongation G

ESP : protéine de surface extracellulaire

FimA : sous-unité majeure des fimbriae

GM : Gentamicine

MEC : matrice extracellulaire

MRS : Milieu de Man, Rogosa et Sharpe

NA : Acide nalidixique

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS : Solution saline tamponnée au phosphate

PLP : Protéines de Liaison à la Pénicilline

PsaA : Adhésine de surface A du pneumocoque

SA : substance d'agrégation

ScaA : *Adhésine A streptococcique de liaison au collagène*

SsaB : Antigène de surface B streptococcique

SXT : Triméthoprim Sulfaméthoxazole

TE : Tétracycline

TMP : Triméthoprim

VA : Vancomycine

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le monde microbien représente un vaste univers invisible, peuplé d'une diversité exceptionnelle de micro-organismes jouant un rôle central dans les équilibres écologiques, aussi bien dans les milieux terrestres que marins. Parmi eux, les entérocoques occupent une place notable. Ce sont des Cocci Gram positifs, catalase négative, appartenant au genre *Enterococcus*, naturellement présents dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et de nombreux animaux. Cependant, leur présence fréquente dans divers milieux aquatiques, notamment marins, en fait également de bons indicateurs de contamination fécale (Murray, et al., 2016).

Si leur rôle écologique est bien reconnu, les entérocoques sont également connus pour leur pouvoir pathogène opportuniste, notamment *E. faecalis* et *E. faecium*, responsables d'infections urinaires, bactériémies, endocardites ou encore de plaies infectées, principalement en milieu hospitalier. Leur virulence repose sur plusieurs facteurs, dont la capacité à produire des enzymes extracellulaires (comme la gélatinase ou la coagulase), à former des biofilms, à lyser les hématies (activité hémolytique), ou encore à produire des bactériocines inhibant la croissance de souches concurrentes (Arias, et al.)

Les milieux marins, longtemps considérés comme peu propices à la survie prolongée des bactéries d'origine fécale, sont aujourd'hui reconnus comme des réservoirs potentiels de souches pathogènes ou virulentes, en particulier dans les zones côtières soumises à des rejets anthropiques. Ces environnements sont susceptibles de favoriser l'expression ou l'acquisition de facteurs de virulence via des mécanismes adaptatifs. Cependant, malgré l'importance écologique et sanitaire des entérocoques marins, leur virulence demeure encore peu explorée, en particulier dans le contexte algérien.

En Algérie, les études concernant la virulence des entérocoques d'origine marine restent très limitées, alors que la pollution côtière, notamment par les rejets domestiques, agricoles ou industriels, est une problématique croissante. Une meilleure compréhension du potentiel pathogène de ces souches marines permettrait de mieux évaluer les risques sanitaires associés à la fréquentation des plages ou à la consommation de produits de la mer. (Boufafa, et al., 2021)

Dans ce contexte, ce travail a pour objectif principal l'évaluation de la virulence des souches d'entérocoques isolées à partir de différentes zones du littoral algérois.

INTRODUCTION

L'approche adoptée repose sur une analyse phénotypique comprenant plusieurs tests de virulence : activité hémolytique, production de coagulase, formation de biofilm, et production de bactériocine. Et l'activité antibiorésistance Ces paramètres permettront de caractériser le potentiel virulent des souches étudiées et de mieux comprendre leur impact potentiel sur la santé humaine et les écosystèmes marins.

I. GENERALITES

I. GENERALITES

I.1 Généralités sur les entérocoques

I.1.1 Données historiques

C'est en 1899 que Thiercelinet Jouhaud a utilisé pour la première fois le terme Entérocoque. L'appellation a été suggérée pour identifier la provenance intestinale d'un nouveau diplocoque Gram positif. En raison de leurs ressemblances morphologiques et biochimiques, ces bactéries ont d'abord été catégorisées comme des streptocoques fécaux en 1906 sous le nom de *Streptococcus faecalis*. C'est en 1984, grâce à des tests d'hybridation ADN-ADN et l'étude des séquences de l'ARNr 16S, que la distinction entre les espèces *S. faecium* et *S. faecalis* et les autres streptocoques a été démontrée, justifiant ainsi l'établissement du genre *Enterococcus*. (Schleifer K, et al., 1984)

Cette réévaluation a été déclenchée par l'identification de l'antigène de paroi D, partagé par les entérocoques et certaines espèces du genre *Streptococcus*, comme *Streptococcus gallolyticus* et *Streptococcus infantarius*. La capacité des entérocoques à se développer dans un environnement « hypersalé », contenant 6,5 g/l de NaCl (caractéristique halophile), est principalement utilisée pour les différencier des streptocoques (**Facklam RR et al.1989**).

L'origine du mot « entérocoque » provient de l'union des termes « entérique » et « coque » (Schleifer K, et al., 1984). Cette appellation met l'accent sur leur présence fréquente dans le système digestif, particulièrement dans l'intestin de l'homme, où ces bactéries agissent comme des commensaux habituels. L'expression « entérocoque » souligne donc leur lien fort avec l'environnement intestinal et met en évidence leur rôle crucial en microbiologie, spécialement en ce qui concerne la flore intestinale.

I.1.2 Taxonomie

La découverte et la taxonomie des Entérocoques ont parcouru un chemin fascinant depuis leur première description par Thiercelin. (Thiercelin, 1899)

Cette clarification taxonomique a permis d'obtenir une compréhension plus détaillée de ces bactéries. (Ludwig, et al., 2009)

Selon le BERGEY's (2009), le genre *Enterococcus* est classé comme suit :

- Domaine : Bacteria ou Eubacteria
- Phylum XIII : Firmicutes
- Classe : Bacilli

Ces bactéries ont la capacité de vivre dans des environnements difficiles, ce sont des microorganismes mésophiles qui prospèrent dans une plage de température de 10 à 45°C, avec une préférence entre 35 et 37°C (Higashide, et al., 2005) .

Certaines espèces présentent une forte résistance aux éléments environnementaux, notamment à la température (30 minutes à 60°C). Ils ont aussi la capacité de décomposer l'esculine en présence d'une concentration de 40% de bile grâce à une bêta-Glucosidase, ce qui se manifeste par la formation d'un halo sombre autour des colonies sur la gélose bile esculine. Cependant, la croissance dans un bouillon nutritif peut provoquer une turbidité homogène, qu'il y ait ou non formation de sédiment. Ils se multiplient à un pH alcalin de 9,6 et dans une solution qui contient 6,5% de NaCl. (Higashide, et al., 2005)

Caractères biochimiques

Les entérocoques sont des microorganismes facultativement aérobies à Gram positif qui constituent une part de la flore intestinale normale, présentant des concentrations allant de 10^4 à 10^6 UFC/g de contenu intestinal (LeBlanc, et al., 2006)

Un grand nombre de caractéristiques biochimiques des entérocoques ont été identifiées pour le diagnostic des entérocoques. (Schleifer K, et al., 1984)

➤ Voici les caractéristiques :

- Organismes chimio-organotrophes.
- Aéro-anaérobies facultatives.
- Catalase négatif (bien que certaines espèces montrent une activité semblable à celle de la catalase)
- Réaction positive à VOGES-PROSKAUER.
- Oxydase négative.
- Facteurs de croissance obligatoires pour leur développement.
- Aucune production d'indole ni de sulfure d'hydrogène.

I.1.3 Habitat

Les entérocoques sont omniprésents et leur capacité à s'adapter à des conditions défavorables les rend présents dans divers milieux (eaux usées, douces et marines). Ils se retrouvent aussi dans le sol, sur la flore végétale ainsi que dans le système digestif des animaux à sang chaud, y compris l'être humain. (Manero A. & Blanch A., et al., 1999)

I.1.4 Épidémiologie des Entérocoques

Diverses méthodes moléculaires ont été employées pour étudier l'épidémiologie des entérocoques, aboutissant à des conclusions et résultats souvent divergents et parfois contradictoires, en fonction de la technique adoptée.

Ces recherches se sont concentrées sur l'épidémiologie en milieu hospitalier et la transmission possible de souches animales résistantes à l'homme. (Abele-Horn, et al., 2006)

Historiquement, on considérait que les infections à entérocoques étaient endogènes, c'est-à-dire qu'elles provenaient de la flore microbienne personnelle du patient. Toutefois, des études récentes montrent que la contagion se diffuse d'un patient à un autre.

Il a également été prouvé que certaines souches multi résistantes pourraient diffuser au sein d'un hôpital, voire entre plusieurs hôpitaux, entraînant un grand nombre d'infections nosocomiales (Boyce, et al., 1992).

I.1.5 Isolement

L'isolement des entérocoques à partir d'échantillons pathologiques représente une phase essentielle dans le diagnostic des infections liées à ces bactéries. On utilise divers milieux de culture, tels que les géloses sanguines non sélectives et les géloses sanguines enrichies en colistine (Poly myxine) et en Acide Nalidixique ou Oxolonic, qui sont principalement efficaces contre les bactéries Gram négatif. Ces ajouts sont cruciaux pour freiner le développement d'autres sortes de bactéries, ce qui favorise par conséquent la prolifération des entérocoques. (Petts, et al., 1984)

Les colonies d'entérocoques peuvent être identifiées sur la gélose sanguine selon leurs propriétés hémolytiques, avec des colonies *d'E. faecalis* généralement non hémolytiques ou β -hémolytiques, alors que la majorité des souches du groupe *E. faecium* génèrent des colonies α -hémolytiques (Mundy LM, et al., 2000).

La gélose Slanetz et Bartley, fréquemment utilisée, permet une sélection efficace des entérocoques tout en favorisant la prolifération des colonies *d'E. faecalis*. C'est pourquoi elle est souvent privilégiée dans le cadre de l'isolement.

I.1.6 Physiopathologie et pouvoir pathogène

Les interactions entre les Entérocoques et les êtres humains présentent plusieurs problématiques, notamment leur origine dans le tractus gastro-intestinal, leur intégration dans

la chaîne alimentaire, leur résistance aux antibiotiques, ainsi que leur implication potentielle dans les maladies d'origine alimentaire (Dortu, et al., 2009).

Les Entérocoques, par rapport à des bactéries telles que *Staphylococcus* ou *Pneumococcus*, ne sont généralement pas considérés comme très virulents (Jett, et al., 1994)

Toutefois, pour devenir pathogènes, ils doivent exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion, à la translocation et à l'évitement de la réponse immunitaire (Ben Omar, et al., 2004)

Les deux espèces les plus couramment impliquées dans ces infections sont *E. faecium* et *E. faecalis*, cette dernière est responsable de 80 à 90 % des infections à base d'*Enterococcus*, tandis qu'*E. faecium* n'est associé qu'à 5 à 10 % des cas. (Kayser, et al., 2003)

Des agents pathogènes occasionnels chez l'homme ont été identifiés comme étant d'autres espèces telles que *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. irae* et *E. mundtii*. (Jett, et al., 1994)

I.2 La virulence des entérocoques

Les entérocoques sont des micro-organismes naturellement présents dans la flore intestinale de nombreux organismes. En qualité de pathogènes opportunistes, ces derniers ont la capacité d'entraîner des infections mortelles chez l'humain, comme les infections nosocomiales. (Woźniak-Biel, et al., 2019)

Ces cas sont complexes à gérer, dû aux taux de survie importants des bactéries dans les établissements médicaux, à la résistance naturelle de nombreuses substances antimicrobiennes et à leur capacité remarquable à développer des mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi qu'à divers facteurs de virulence (STRATEVA, 2016).

I.2.1 Facteurs de virulence des entérocoques

On s'accorde désormais généralement à dire que la virulence d'un organisme est définie par les gènes qui le codent, retrouvés dans des zones précises du génome, nommées « îlots de Pathogénicité » (UPADHAYAYA, et al., 2009).

Les entérocoques s'attachent aux cellules de l'hôte grâce à plusieurs facteurs qui favorisent la colonisation, l'invasion des tissus et la manipulation du système immunitaire, provoquant des dégâts et des blessures par le biais de toxines entérococciques. (FIORE, et al., 2019)

Deux catégories principales de facteurs de virulence ont été identifiées et décrites, la première étant définie principalement par des facteurs qui déclenchent et encouragent la colonisation

des cellules hôtes. Le second type inclut les agents sécrétés par les entérocoques qui nuisent aux tissus cellulaires. (BOUSSOUAR, 2017)

I.2.1.1 Facteurs de virulence favorisant la colonisation des cellules

Les entérocoques possèdent une grande capacité à adhérer aux diverses cellules de l'organisme grâce à des protéines nommées « Bacterial adhesins ». Ces antigènes se trouvent à la surface des entérocoques et favorisent l'adhésion aux membranes et aux parois cellulaires. Chez l'homme, elles exercent une grande activité sur les valves cardiaques du côté gauche et sur les cellules épithéliales des reins. C'est pour cette raison qu'on les considère comme des éléments susceptibles de contribuer à la virulence des souches d'entérocoques (BERGMANN, et al., 2004) (CARIP, et al., 2015)

I.2.1.1.1 Protéines « ESP » de surface extracellulaire

Il s'agit d'une protéine liée à la membrane cellulaire de la bactérie du type *Enterococcus*, qui a été identifiée pour la première fois dans une souche particulièrement virulente d'*E. faecalis* résistante à la Gentamicine, extraite d'une bactériémie. On la considère comme la plus grande protéine entérococcique identifiée, avec un poids moléculaire de 200 k Da. Elle présente des traits structuraux similaires à ceux des protéines de surface d'autres bactéries à Gram positif. (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, et al., 2017)

Le gène « esp », qui se trouve sur l'îlot de pathogénicité connu sous le nom de « PAI », code pour la protéine de surface extracellulaire. Sa taille est de 5622 pb et il est communément présent chez les isolats cliniques responsables des infections. Des recherches ont également prouvé que le transfert de ce gène est réalisable entre diverses souches d'*E. faecium* par le biais de la conjugaison plasmidique, tout comme entre les souches d'*E. faecalis* grâce au chromosome de transposition. Cette protéine joue également un rôle dans la création du biofilm bactérien, ce qui pourrait entraîner une résistance face au stress environnemental extérieur. (BERGMANN, et al., 2004).

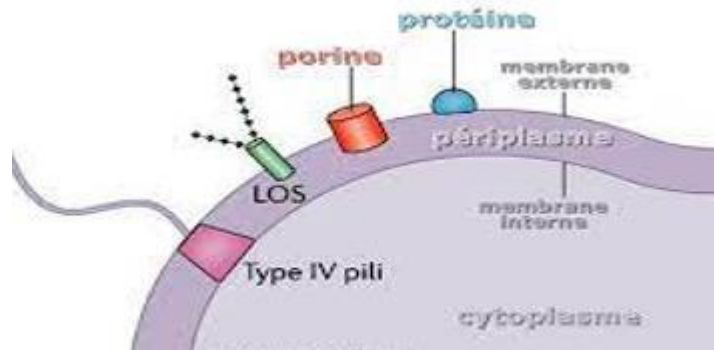


Figure 2:Ensemble de protéines extracellulaires exprimées en surface d'une souche Bactérienne (ACHARYA, 2021)

I.2.1.1.2 Substance d'agrégation « SA »

Les adhésines d'agrégation, de nature glycoprotéique, sont placées sur la surface des cellules. Elles sont codées par des gènes qui sont véhiculés par des plasmides conjugatifs contrôlés par des phéromones d'accouplement. Elles possèdent un poids moléculaire de 137 k Da et adoptent une structure en forme de boucle comme des épingles à cheveux (FOULQUI MORENO, et al., 2006).

Les substances d'agrégation sont jugées être des éléments de virulence majeurs puisqu'elles autorisent le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques (DRAMSI, et al., 2005) . L'agrégation se produit lors de la reproduction bactérienne afin d'autoriser la transmission des plasmides contenant les gènes responsables des substances agrégatives (BERGMANN, et al., 2004).

Il s'agit de protéines glycosylées qui se connectent aux récepteurs situés à la surface des cellules eucaryotes et contribuent de manière essentielle à la colonisation de l'hôte en altérant le transfert des plasmides. Par ailleurs, l'attachement des bactéries du genre « *Enterococcus* » aux cellules hôtes représente une phase essentielle dans le processus infectieux. La présence de ces facteurs d'agrégation au sein de ces souches peut renforcer leur potentiel de colonisation. (aguilar-Galvez, et al., 2012).

I.2.1.1.3 Protéines de liaison au collagène « Ace »

La protéine de liaison au collagène est une protéine de surface dotée de propriétés adhésives, avec un poids moléculaire approximatif de 74 k Da.

Cette protéine a été extraite à partir des *d'E. faecalis*, elle a été prélevée à la fois chez des sujets en bonne santé et chez des personnes souffrant d'infections à entérocoques (Nallapareddy SR, et al., 2006).

Plusieurs études ont révélé que certaines espèces d'*Enterococcus* isolées ont la capacité d'adhérer et de cliver différentes protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène, la laminine, le fibrinogène, la fibronectine, la lactoferrine et diverses autres particules.

Des études sur des gènes susceptibles de coder pour des adhésines potentielles ont abouti à l'identification de l'adhésine « Ace » : une adhésine du collagène *d'E.faecalis*. Les gènes d'adhésion « ace » et « acm » des bactéries « *E. faecalis* » et « *E. faecium* » se fixent respectivement sur les souches de collagène de types 1 et 4, ce qui accroît leur capacité virulente. Le gène « acm » a la faculté de se rattacher à la laminine. L'Ace est jugé essentielle lors des premières phases de l'infection, dans la mesure où elle a la capacité de se rattacher aux éléments de la matrice extracellulaire de l'hôte « MEC » (Arias, et al.)

I.2.1.1.4 Antigène spécifique de l'endocardite « EfaA »

L'EfaA est également nommé l'antigène spécifique de l'endocardite. C'est une protéine adhésive d'environ 34 kDa de poids moléculaire, codée par les gènes « eFAfs » et « eFArm » pour les souches *d'E. faecalis* et *E. faecium*, respectivement (SAVA, et al., 2010)

Pour la première fois, cet antigène a été découvert en utilisant des échantillons de sang prélevés chez des patients atteints d'endocardite due à *E. faecalis*. Il a été démontré, grâce à des méthodes génétiques, l'existence de gènes comparables à « efaA » dans les variétés *d'E. avium*, *E. asini*, *E. durans* et *E. solitarius* (SEMEDO, et al., 2003).

La protéine « EfaA » présente des ressemblances avec les adhésines détectées dans les parois cellulaires des *streptocoques*. Elle partage une similarité avec la protéine « FimA » produite par *Streptococcus parasanguis*, la protéine « ScaA » fabriquée par *S. gorgonii*, la protéine « PsaA » de *S. pneumoniae* et la protéine « SsaB » de *S. sanguis* (ARCHIMBAUD, et al., (2002).

I.2.1.2.2 Cytolysine « β -hémolysine »

Aussi connue sous le nom de « β -hémolysine », la Cytolysine est une exotoxine de type bactériocine produite par des souches d'*E. faecalis* qui sont bêta-hémolytiques. C'est une toxine bactérienne qui a des caractéristiques de β -hémolyse chez l'homme et des propriétés antibactériennes contre d'autres bactéries Gram-positives (Hallgren, et al., 2008).

La production de cytolysine, qui semble être un facteur de risque significatif associé aux entérocoques pathogènes, est le critère de virulence le plus examiné parmi les entérocoques.

Il s'agit d'une toxine de type peptidique, capable de provoquer la lyse des tissus chez l'homme et les animaux en créant des pores sur la membrane cellulaire qu'elle modifie (LeBlanc, et al., 2006).

Les gènes de cytolysine, qui sont généralement présents sur des plasmides et sous le contrôle de phéromones, ont été identifiés chez les espèces suivantes : *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* et *E. raffinosus*. (aguilar-Galvez, et al., 2012) (SEMEDO, et al., 2003).

Une recherche récente indique que le risque de décès lié à une infection par des *entérocoques* β -hémolytiques est cinq fois supérieur à celui associé à une infection par des entérocoques non β -hémolytiques. Une autre étude a démontré que la combinaison de l'hémolysine et de la substance d'agrégation provoque une hausse de la mortalité dans les cas d'endocardite principalement due à *E. faecalis*. (LeBlanc, et al., 2006).

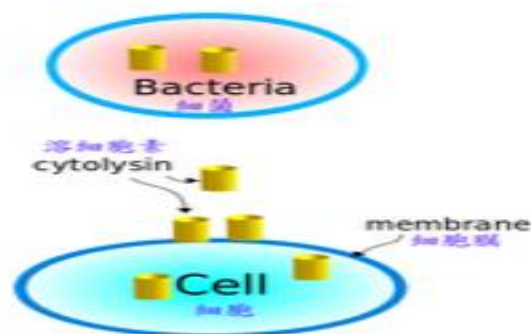


Figure 4: Production de la toxine Cytolysine à partir d'une souche bactérienne (SKALS et al. 2013).

I.2.1.2.3 Hyaluronidase

Les *entérocoques* sont capables de produire une enzyme hydrolytique dénommée « hyaluronidase ». Les hyaluronidases bactériennes (BH) sont considérées comme des éléments

de diffusion. Certaines bactéries, à Gram positif et à Gram négatif, les libèrent. C'est une protéine provenant du génome de l'entérocoque, avec une masse moléculaire d'environ 45 kDa, codée par le gène « hyl » (ARCHIMBAUD, et al., (2002).

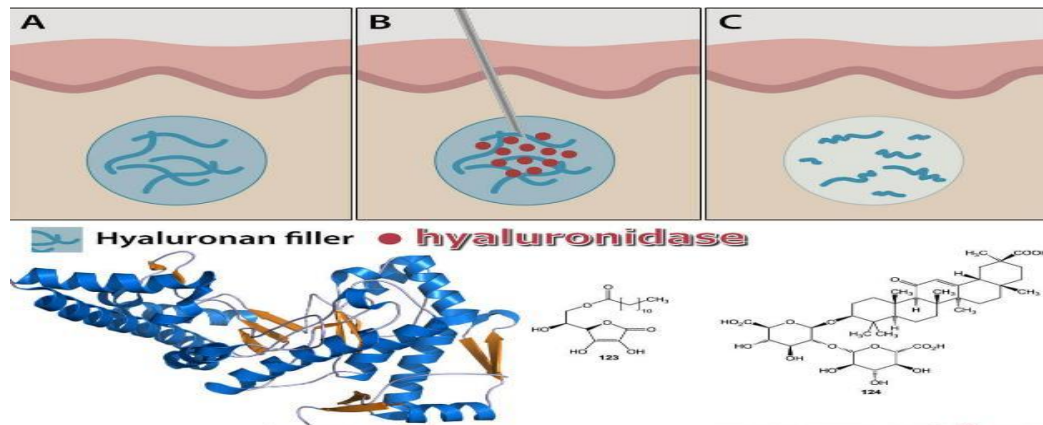


Figure 5:Structure chimique de facteur de virulence bactérien l'hyaluronidase (RUHAL et al. 2021)

L'hyaluronidase est chargée de décomposer l'acide hyaluronique, aussi appelé l'**hyaluronate**. C'est un composant essentiel de la matrice extracellulaire (KAYAOGLU, et al., 2004).

Étant capable de fragmenter la portion muco-polysaccharidique des tissus conjonctifs, cela facilite la diffusion des entérocoques et de leurs toxines dans les tissus de l'organisme hôte. Toutefois, il n'y a aucun élément probant démontrant l'implication de cette enzyme dans les infections dues à ces bactéries (JETT, et al., 1994) (KAYAOGLU, et al., 2004) .

Il a été suggéré que l'hyaluronidase d'*E. faecium* dégrade l'acide hyaluronique de l'hôte en composants plus simples qui sont ensuite transportés et métabolisés dans la cellule bactérienne, fournissant ainsi à la bactérie des éléments nutritifs. Le gène « hyl » est constitué de 1659 paires de bases et codent pour une protéine hypothétique de 533 acides aminés. Cette protéine présente une identité de 42% et une similarité de 60% par rapport à l'hyaluronidase de *S. pyogenes* (RICE, et al., 2003) .

I.2.1.2.4 Gélatinase

Les entérocoques produisent la gélatinase, une protéase. C'est une série de petits peptides hydrophobes composés de sept à huit acides aminés.

Il s'agit d'une métalloprotéase extracellulaire dépendante du zinc, possédant un poids moléculaire approximatif de 30kDa et codée par le gène « gelE ». Elle cible spécifiquement divers substrats tels que la chaîne β de l'insuline, le collagène des tissus, ainsi que des phéromones sexuelles et leurs peptides inhibiteurs (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, et al.,

2017) .

Il est prouvé que la gélatinase découpe les protéines mal repliées de surface d'*E. faecalis* et la fibrine, ce qui diminue les niveaux de phéromones chez cette espèce grâce à l'activation d'un composé nommé « auto lysine ».

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

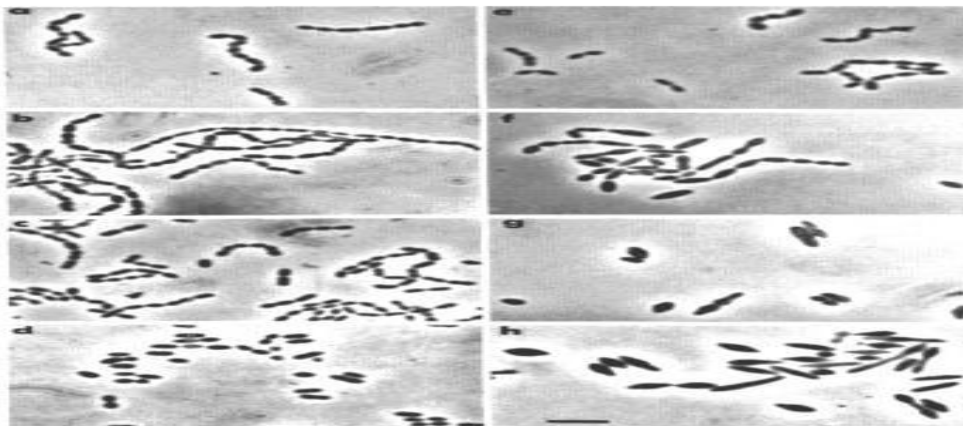


Figure 6: Souches bactériennes productrices de la gélatinase en microscope photonique (DEL PAPA, et al. 2007)

I.2.1.2.5 Phéromones sexuelles

La phéromone est un ensemble d'acides aminés qui constitue un peptide dont la fonction principale est de faciliter le transfert des plasmides lors de la conjugaison bactérienne. Elle est caractérisée comme un facteur d'agrégation conjugué. (CHANDLER, et al., 2005)

Une variante d'entérocoque produit généralement divers types de phéromones qui, non seulement, stimulent l'expression des opérons conjugatifs présents sur les plasmides bactériens, mais également transduisent et activent le gène responsable de l'agrégation.

I.2.1.2.6 Formation de biofilm bactérien

Les biofilms peuvent être définis comme des populations bactériennes incorporées dans une matrice adhérent à une surface ou entre elles. Les biofilms bactériens sont davantage résistants au stress environnemental plus que leurs congénères en liberté, leur adhésion à la nourriture ou aux surfaces alimentaires accélère leur dégradation, complique le nettoyage et favorise la propagation des maladies (JAHAN, et al., 2014)

Les biofilms sont perçus comme un bio-encrassement sur des surfaces industrielles artificielles et ils ont été associés à des infections bactériennes chroniques. (KOO, et al., 2017)

Par ailleurs, un grand nombre de bactéries pathogènes exploitent les biofilms ce qui les rends plus aptes à résister à diverses conditions de stress ou au système immunitaire de l'hôte, car elles ont été entraînées pour survivre dans des environnements externes difficiles (Rahimi, et al., 2018).

Le développement du biofilm est un processus en plusieurs étapes qui débute par la fixation des cellules sur les surfaces et se conclut par des infections sévères généralement liées aux équipements médicaux dans l'organisme (comme les cathéters, les implants articulaires), ce qui les associe ainsi aux valves endocardiques, notamment les plaies ouvertes et les lésions dentaires.

Les éléments constitutants du biofilm, en particulier dans le cas des biofilms bactériens Gram-positifs, englobent les protéines matricielles, les polysaccharides, l'ADNe (ADN extracellulaire) ainsi que les vésicules membranaires. (RUHAL, et al., 2021)

C'est un processus qui se déroule rapidement en plusieurs phases. Initialement, les bactéries doivent se fixer à une surface biotique ou abiotique. Ensuite, les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se reproduire et créer des micro-colonies pendant la phase de maturation.

Dans un biofilm, les bactéries produisent un exo-polysaccharide et divers composants de la matrice polymérique. (RUHAL, et al., 2021)

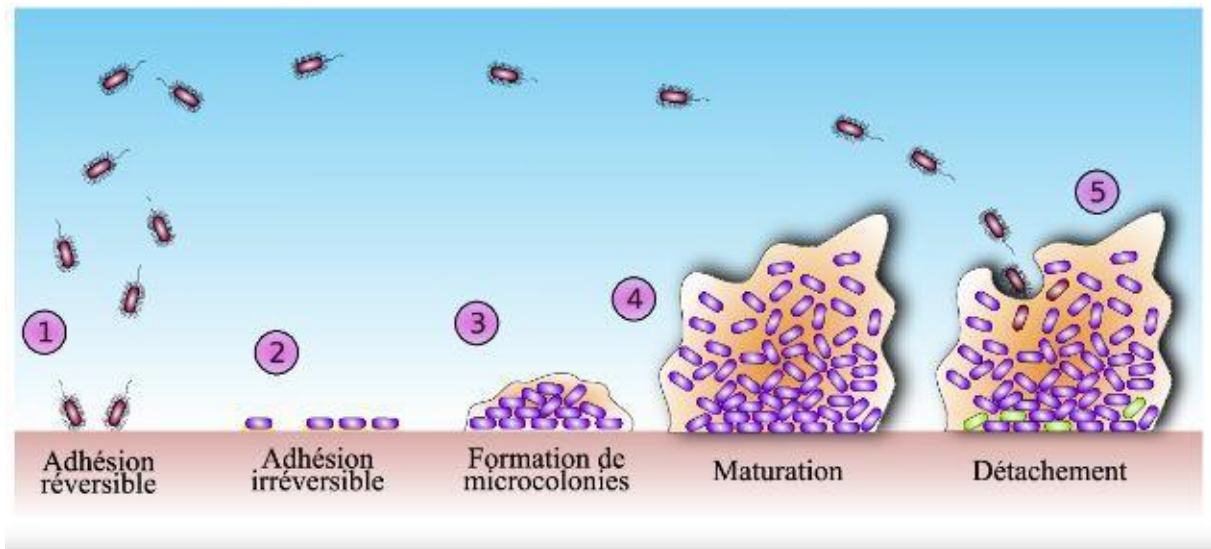


Figure 7: Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide (DOUARCHE et al. 2018)

Les installations de l'industrie alimentaire, qui présentent souvent des surfaces constamment humides, favorisent l'adhérence et la colonisation bactérienne, aboutissant finalement à la formation d'un biofilm. Les bactéries du genre *Enterococcus* présentes dans les biofilms sont plus résistantes. C'est pourquoi la formation de biofilms dans le secteur de l'alimentation constitue un enjeu majeur (RUHAL, et al., 2021).

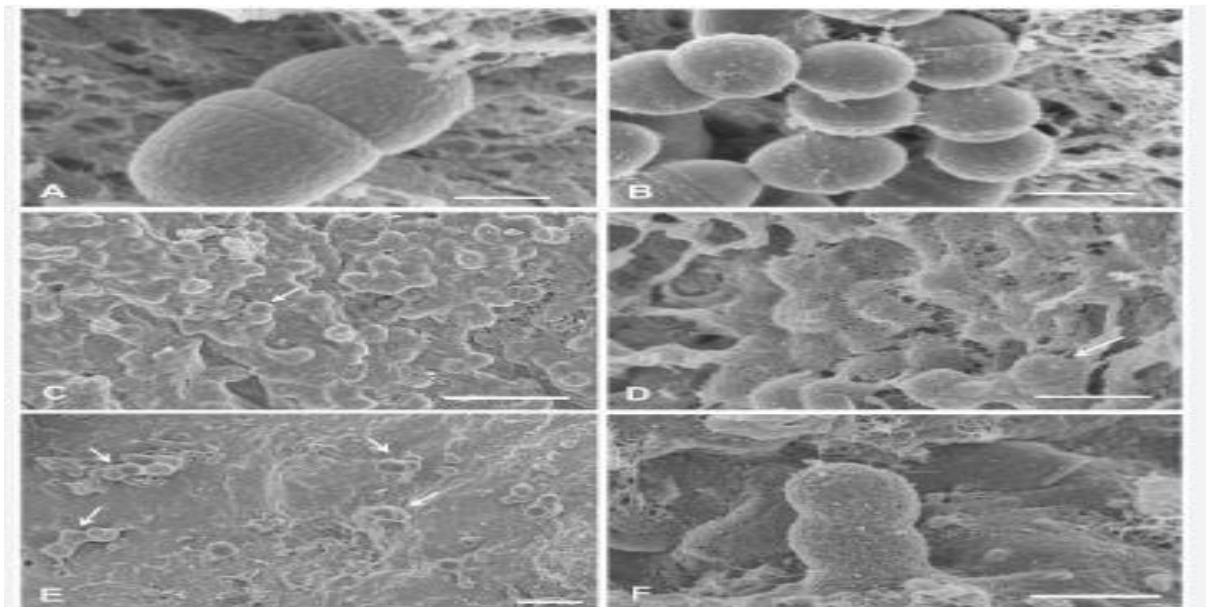


Figure 8: Production du biofilm par une souche d'*E. faecalis* dans un tissu valvulaire au fil du temps. Image obtenue par comptage sur plaque en microscopie électronique à balayage à haute résolution (FESEM) (CHUANG-SMITH et al. 2010)

I.3 Antibiorésistance des Entérocoques

I.3.1 Historique et définition

Le monde microbien pour qu'il assure sa survie a développé des stratégies pour neutraliser et éliminer les espèces concurrentes et la production des antibiotiques est l'une de ces stratégies. L'existence de ces substances est donc aussi vieille que le monde des microbes, en parallèle, les microorganismes ont élaboré des mécanismes de résistance contre ces substances antagonistes. Ce n'est que tardivement que l'homme a su exploiter ces antibiotiques pour lutter contre les maladies infectieuses. (Philippe Bouvet, et al., 2022)

Les antibiotiques représentent l'un des plus grands triomphes médicaux du XXe siècle. 'La pénicilline' est le premier antibiotique découvert en 1928 par ALEXANDER Fleming. Pendant la seconde guerre mondiale en Angleterre, la pénicilline a été produite comme médicament par Norman Heatley, Ernst Chain et Howard Florey. Les premiers tests ont été appliquées d'abord sur les souris, peu de temps après chez l'être humain, permettant de guérir les infections bactériennes et des maladies auparavant incurables. (Landecker, et al., 2021)

Le mot antibiotique vient du terme grec 'antibiose' (anti : contre, biose : la vie), sont des substances chimiques naturelles ou synthétiques qui agissent spécifiquement contre des microorganismes (bactéries et protozoaires). D'une manière ciblée, ils peuvent soit éliminer et tuer le microorganisme, on parle alors d'une action bactéricide, soit bloquer sa multiplication donc c'est une action bactériostatique. (Bambeke, et al., 2008)

La résistance aux antibiotiques est basée sur plusieurs critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) qui ne se recoupent pas forcément. Les classifications les plus couramment utilisées sont basées sur les critères microbiologiques (résistance in vitro) et les critères cliniques (résistance in vivo). (MUYLAERT A., 2012)

En raison de leurs résistances aux basses températures, à un pH faible et à une chaleur modérée, les entérocoques ont été suggérés comme indicateurs de contamination fécale dans certains types de produits alimentaires. (MUYLAERT A., 2012)

Contrairement à certaines bactéries fécales qui sont diffusées dans l'environnement (comme *Escherichia coli*, souvent utilisée comme indicateur de contamination fécale), les entérocoques ont la capacité de persister longtemps, même hors de leurs hôtes naturels. (Kayser, et al., 2008)

La problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques est attachée à deux causes :

- Une variation génétique des bactéries qui pourrait la rendre résistante à n'importe quel antibiotique.
- Une dissémination de souches bactériennes souvent multi résistantes.

Le moteur essentiel de développement de résistance et de la propagation de bactéries résistantes est la pression de sélection exercée par les antibiotiques. (Kayser, et al., 2008)

I.3.2 Fonctionnement

Les antibiotiques sont des substances qui ciblent des endroits spécifiques appelés « sites d'actions des bactéries ». L'objectif est d'éliminer les microorganismes et arrêter leur multiplication en perturbant leur processus de biosynthèse (PLESIAT, 2012).

Ces agents antibactériens doivent se fixer à des cibles bien spécifiques sur la cellule bactérienne afin de l'influencer en bloquant ces fonctions physiologiques particulières comme la formation de la paroi cellulaire, la transcription, la duplication de l'ADN, la production de protéines et la respiration cellulaire tout en évitant d'endommager l'organisme hôte. (PLESIAT, 2012)

Plusieurs antibiotiques sont constitués de molécules naturelles produites par des microorganismes (champignons ou d'autres bactéries) et qui sont destinées à éliminer les bactéries concurrentes avec elles dans le même biotope. (PLESIAT, 2012)

Selon l'OMS, la résistance aux antibiotiques est la capacité des populations bactériennes à survivre à l'effet de la concentration inhibitrice des agents antimicrobiens. Cette résistance peut émerger par plusieurs voies. Une bactérie d'une espèce normalement sensible peut devenir résistante par mutation ou acquisition de nouveaux gènes. Certaines espèces bactériennes sont normalement et intrinsèquement résistantes à certains antibiotiques, tandis que d'autres sont sensibles. La sensibilité a 3 exigences : une cible pour la réaction, un mécanisme de transport dans la cellule avant que l'action de l'antibiotique n'ait lieu et l'absence d'enzymes qui pourraient inactiver ou modifier l'antibiotique. Un changement dans l'une de ces conditions pourrait rendre une bactérie sensible aux antibiotiques, résistante aux médicaments. (LUKASOVA, et al., 2003)

Les entérocoques sont connus pour leur résistance à la plupart des antibiotiques utilisés en pratique clinique. Ils sont naturellement résistants aux céphalosporines, aux aminoglycosides et à la clindamycine et peuvent être également résistants aux tétracyclines et l'érythromycine.

Ils sont moyennement sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline et aux glycopeptides. Les souches qui produisent la β -lactamase sont rares. (LUKASOVA, et al., 2003)

Les entérocoques sont connus pour leur relative facilité d'acquérir une résistance bactérienne et de leur capacité de transférer ses gènes aux autres bactéries. (KÜHN S, 2000) . *Enterococcus faecalis* a été signalé pour transférer des plasmides abritant des caractéristiques de résistance aux antibiotiques à d'autres entérocoques et à *Listeria monocytogenes* dans les stations de traitement des eaux. (MARCINEK H, 1998) .Les transposons conjugatifs d'*Enterococcus faecium* peuvent être transférés de bactéries animales à des bactéries humaines. Ces transposons conjugatifs peuvent également transférer la résistance à la vancomycine à *Staphylococcus aureus*, aux *streptocoques* et aux *lactobacilles*.

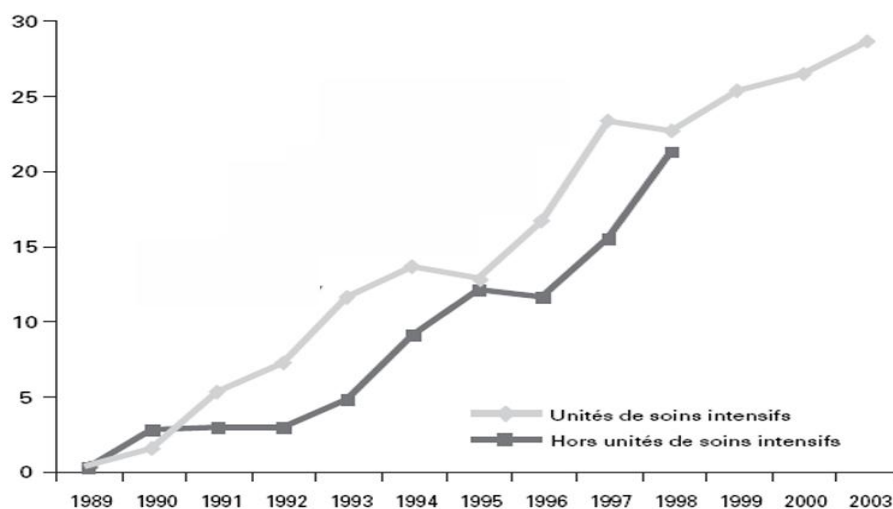


Figure 9:Résistance des entérocoques à la vancomycine aux états unis de 1989 à 2003. (Leclercq et al. 2005)

I.3.3 Principaux paramètres influençant l'activité de l'antibiotique :

Il existe deux paramètres essentiels pour l'évaluation de l'efficacité d'un antibiotique :

- **La CMI** « Concentration Minimale Inhibitrice » : c'est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme (après 18 heures de culture à 37°C)
- **La CMB** « concentration minimale bactéricide » : c'est concentration la plus faible d'un agent antimicrobien entraînant la mort de 99% des micro-organismes (après 18 heures de culture à 37°C)
- ❖ Si le rapport CMB/CMI est égal à 1, l'activité de l'antibiotique est bactéricide.
- ❖ Si le rapport CMB/CMI est supérieur à 1, l'activité de l'antibiotique est bactériostatique. (Cynthia M, et al., 2008)

I.3.4 Critères de classification des antibiotiques

- **Origine**

1. **Antibiotiques naturels** : produits par des organismes vivants (bactéries, champignons).
2. **Antibiotiques synthétiques ou semi-synthétiques** : obtenus par synthèse chimique totale ou modification d'une molécule naturelle.

- **Nature chimique**

Basée sur la structure de base de la molécule (exemple : noyau β -lactame pour les β -lactamines). Ce critère définit les grandes familles : β -lactamines, macrolides, aminosides, tétracyclines, quinolones, etc.

- **Mode d'action :**

1. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (ex : β -lactamines, glycopeptides).
2. Inhibition de la synthèse des protéines (ex : macrolides, aminosides, tétracyclines).
3. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ex : quinolones, rifamycines).
4. Action sur la membrane cytoplasmique (ex : poly myxines).
5. Inhibition de la synthèse des folates (ex : sulfamides, triméthoprime).

- **Spectre d'activité :**

1. **Spectre étroit** : actifs sur un nombre limité de bactéries.
2. **Spectre large** : actifs sur de nombreuses espèces bactériennes, Gram positif et/ou Gram négatif.

- **Modalité d'action** : Bactéricide ou bactériostatique.

- **Indications thérapeutiques** : selon les infections traitées.

- **Voie d'administration** : orale, injectable, locale (collyres, pommades...).

- **Effets indésirables et contre-indications** : allergie, toxicité spécifique à certaines familles. (Cynthia M, et al., 2008)

I.3.5 Classification et mode d'action

En comparaison avec les antiseptiques et les désinfectants, les antibiotiques tendent à cibler spécifiquement certaines structures de la cellule bactérienne. Cette caractéristique distincte d'action explique la raison pour laquelle les antibiotiques demeurent efficaces à des concentrations extrêmement faibles. (Cynthia M, et al., 2008)

Concernant les bactéries, ils ont généralement un effet spécifique en entravant une phase cruciale de leur croissance, qu'il s'agisse de la synthèse de leur paroi cellulaire, de l'ADN, des protéines, ou encore de la production d'énergie... etc. (Cynthia M, et al., 2008)

Ce blocage survient quand l'antibiotique se lie à sa cible : une molécule de la bactérie impliquée dans l'un de ces processus métaboliques vitaux. L'interaction entre l'antibiotique et sa cible est hautement sélective et propre aux bactéries. (Cynthia M, et al., 2008)

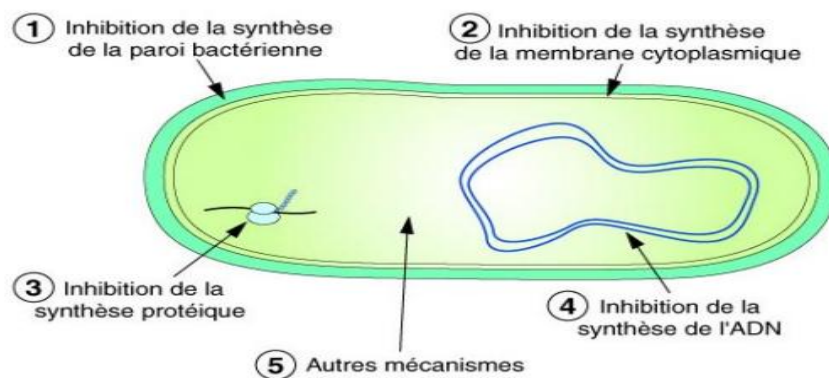


Figure 10: Mode d'action des antibiotiques (Torche S. et Bensegueni L. 2020)

1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

C'est le mécanisme d'action des bêta-lactamines (qui se subdivisent en deux sous-groupes : Pénicillines et Céphalosporines). Le noyau β -lactame de ces antibiotiques est responsable de leur action. Effectivement, ce noyau détient une forte affinité avec le site catalytique des PLP

(Protéines de Liaison à la Pénicilline), enzymes indispensables à la synthèse et au remodelage du peptidoglycane (Muréine) de la bactérie. (Cynthia M, et al., 2008)

2. Antibiotiques inhibiteurs de la membrane cytoplasmique

Les Poly myxines : la Poly myxine B et la Poly myxine E (colistine), sont composées d'un polypeptide cyclique associé à un acide gras. Grâce à leur extrémité hydrophobe, ces antibiotiques traversent la membrane et s'incorporent à la couche lipidique, tandis que l'extrémité hydrophile est dirigée vers l'extérieur, cela entraîne un désordre dans la structure de la membrane, provoquant ainsi la mort de la cellule. (Cynthia M, et al., 2008)

3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines

C'est les plus nombreux. Les antibiotiques exercent leur effet en perturbant certaines phases de biosynthèse indispensables à l'existence des bactéries. Ils agissent en se liant aux ribosomes, aux sous-unités 30S (tels que les Aminosides et la Tétracycline) ou 50S (comme les Macrolides et les phénicoles), ce qui perturbe la synthèse protéique. (Cynthia M, et al., 2008)

4. Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs

1. **La Rifamycine** : agit en bloquant l'ARN polymérase.
2. **Les Quinolones** : inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-gyrase" en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien.
3. **Les Sulfamides** : agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique.
4. **Les Diaminopyridines** : inhibent la réduction de l'acide folique en tirant partie de la différence de sensibilité de la dihydrofolate réductase bactérienne par comparaison avec l'enzyme des cellules eucaryotes.
5. **Dérivés des Nitrofuranes** : agissent en perturbant la réplication de l'ADN.
6. **Les Nitroimidazoles** : agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques entraînant la mort rapide de la bactérie.

(Cynthia M, et al., 2008)

I.3.6 Résistances des entérocoques aux antibiotiques

Les entérocoques sont devenus des agents pathogènes majeurs responsables d'infections nosocomiales en raison de leur capacité à résister à plusieurs antibiotiques. Cette résistance

peut bien être soit naturelle (intrinsèque) envers certaines familles d'antibiotiques, soit alors acquise par transfert de gènes ou mutation, ce qui limite considérablement les options thérapeutiques et complique la prise en charge de ces infections. Le mode d'action, le type de résistance observé concernant chacun d'eux et les principaux antibiotiques utilisés contre les entérocoques sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 1: Modes d'action des principaux antibiotiques contre les entérocoques et types de résistance associée. (Bourdon, 2011)

Antibiotique	Mode d'action	Type de résistance
β-lactamines	Inhibition des protéines de liaison à la pénicilline (PLP), enzymes clés de la synthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne).	Naturelle : Faible affinité de PLP5
		Acquise : Mutations ou hyperproduction de PLP5
Glycopeptides	Fixation à l'extrémité D-alanyl-D-alanine des précurseurs du peptidoglycane, bloquant la formation de la paroi bactérienne.	Naturelle : Présente chez <i>E. gallinarum</i> et <i>E. casseliflavus</i> via opéron vanC.
		Acquise : Acquisition des gènes vanA (résistance à vancomycine et téicoplanine) ou vanB (résistance à vancomycine uniquement)
Aminosides	Fixation à la sous-unité 30S du ribosome, perturbant la synthèse protéique par erreurs de traduction.	Naturelle : Résistance de bas niveau
		Acquise : Production d'enzymes modifiant l'antibiotique (résistance de haut niveau)
Macrolides	Inhibition de l'élongation de la chaîne polypeptidique en se fixant à la sous-unité 50S du ribosome.	Acquise : par acquisition de gènes modifiant la cible ou enzymes inactivant l'antibiotique
Fluoroquinolones	Inhibition de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, enzymes nécessaires à la réplication et transcription de l'ADN.	Acquise : par mutations dans les gènes codant ces enzymes

Rifampicine	Inhibition de l'ARN polymérase bactérienne, bloquant la transcription.	Acquise : par mutations dans le gène de l'ARN polymérase.
Tétracyclines	Blocage de la fixation de l'ARNt au ribosome 30S, inhibant la synthèse protéique.	Acquise : par gènes codant des pompes d'efflux ou protéines de protection ribosomale.
Chloramphénicol	Inhibition de la peptidyl transférase sur la sous-unité 50S du ribosome, bloquant la synthèse protéique.	Acquise : par enzymes inactivant l'antibiotique ou modification de la cible.
Linézolide	Inhibition de la formation du complexe d'initiation de la synthèse protéique sur la sous-unité 50S.	Acquise : rare, par mutations ciblant le site de liaison.
Acide fusidique	Inhibition du facteur d'élongation G (EF-G), bloquant la translocation lors de la synthèse protéique.	Acquise : par mutations dans le gène codant EF-G.

I.3.7 Rôles et Applications des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries lactiques omniprésentes qui ont diverses fonctions dans divers secteurs d'activité (alimentaire, santé, environnement, etc.) (HANCHI, et al., 2018).

I.3.8 Indicateurs de présence de contamination fécale

En tant qu'indicateurs de contamination fécale humaine, les entérocoques ont été sélectionnés pour l'évaluation de la qualité de l'eau potable et des aliments. Cependant, l'emploi des entérocoques comme indicateurs de pollution ou de contamination d'origine humaine peut être problématique, car ces bactéries sont aussi présentes dans les excréments d'animaux, le sol et sur les plantes Source spécifiée non valide..

I.3.9 Utilisation des entérocoques comme probiotiques

On définit les probiotiques comme des micro-organismes vivants (comme les bactéries et les levures) intégrés à certains produits alimentaires. Ils peuvent également être décrits comme « une préparation ou un produit contenant une culture simple ou mixte de microorganismes viables ».

Ils ont un impact positif sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriée et suffisante. (BRAIEK, et al., 2019).

Les probiotiques sont des compléments qui profitent aux animaux et aux êtres humains en renforçant l'équilibre de la barrière intestinale, diminuant les problèmes gastro-intestinaux, modulant le système immunitaire et améliorant la qualité nutritive.

On utilise souvent les bactéries lactiques comme probiotiques, tels que *Enterococcus*, *Bacillus* et *Streptococcus*, ainsi que les levures comme *Saccharomyces*. L'espèce *E. faecium* est employée dans la préparation de probiotiques pour l'homme. Alors qu'*E. faecalis* est fréquemment employé comme supplément nutritionnel (Champagne, et al., 2018).

Effectivement, les entérocoques sont utilisés comme probiotiques à diverses fins, y compris dans les secteurs pharmaceutique, médical (pour les humains et les animaux) et alimentaire. En effet, certains types de ces bactéries pourraient être bénéfiques dans la production d'aliments aux caractéristiques fonctionnelles (BRAIEK, et al., 2019).

I.3.10 Applications des entérocoques dans les aliments

Les entérocoques peuvent exercer une influence positive ou négative sur les denrées alimentaires. Ils peuvent entraîner une détérioration ou contribuer au processus de maturation et d'aromatisation de quelques denrées alimentaires (**SEMEDO, et al., 2003**).

L'intégration de ces micro-organismes dans les produits alimentaires vise plusieurs buts, comme : (**aguilar-Galvez, et al., 2012**)

- Allonger la durée de conservation des aliments.
- Varier les produits en modifiant la matière première.
- Freiner la prolifération de pathogènes pour renforcer la sécurité alimentaire.
- Participer à l'élaboration du goût des aliments.
- Avoir un effet positif sur la flore intestinale.

Des recherches sur la microflore des aliments traditionnels ont révélé que les entérocoques ont une fonction cruciale dans la fermentation et la maturation de certains produits, en contribuant à l'émergence de qualités organoleptiques telles que le goût et l'arôme (BRAIEK, et al., 2019). Certains de ces produits sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2:Principales sources d'*Enterococcus* spp. Dans les aliments (Aguilar-Galvez et al. 2012)

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

II. MATÉRIELS ET **MÉTHODES**

Matériel et méthodes

Ce chapitre présente l'ensemble des protocoles expérimentaux mis en œuvre pour caractériser les propriétés virulentes des souches d'entérocoques isolées de quelques plages algéroises. La méthodologie adoptée s'articule autour de plusieurs axes complémentaires : isolement, identification et caractérisation des facteurs de virulence.

L'objectif est d'établir un profil de virulence et d'évaluer le potentiel pathogène des entérocoques d'origine marine et de comprendre leur capacité d'adaptation aux conditions environnementales spécifiques du milieu aquatique.

II.1 Présentation de la zone d'étude et origine des souches

Les souches ont été isolées au niveau de six plages durant la période printanière des 4 précédentes années (Collection de Mme Chaou, LCVRM) : deux plages situées sur le littoral oriental de la baie d'Alger, trois sites le long de la côte est de la baie de Bou-Ismaïl, ainsi que la plage d'Ain Taya. L'isolement a été fait à partir de prélèvements réalisés à 20 cm de profondeur et à 1 mètre de distance du rivage

La baie d'Alger constitue un élément central du littoral algérien, située à l'Est de la plaine de Mitidja, couvre environ 180 km² et s'étend sur une longueur de 35 km et comprend 11 communes côtières. Les coordonnées géographiques sont 36°46'60" N et 3°9'0" E.

La baie de Bou-Ismaïl, historiquement désignée sous le nom de Castiglione, représente l'une des formations littorales majeures du territoire algérien. Positionnée dans la section médiane du littoral national, elle se trouve à 50 kilomètres à l'ouest d'Alger, au sein de la wilaya de Tipaza entre 36°40' et 36°50' Nord et entre 2°30' et 2°50' est. Cette entité géographique s'étend sur approximativement 350 km².

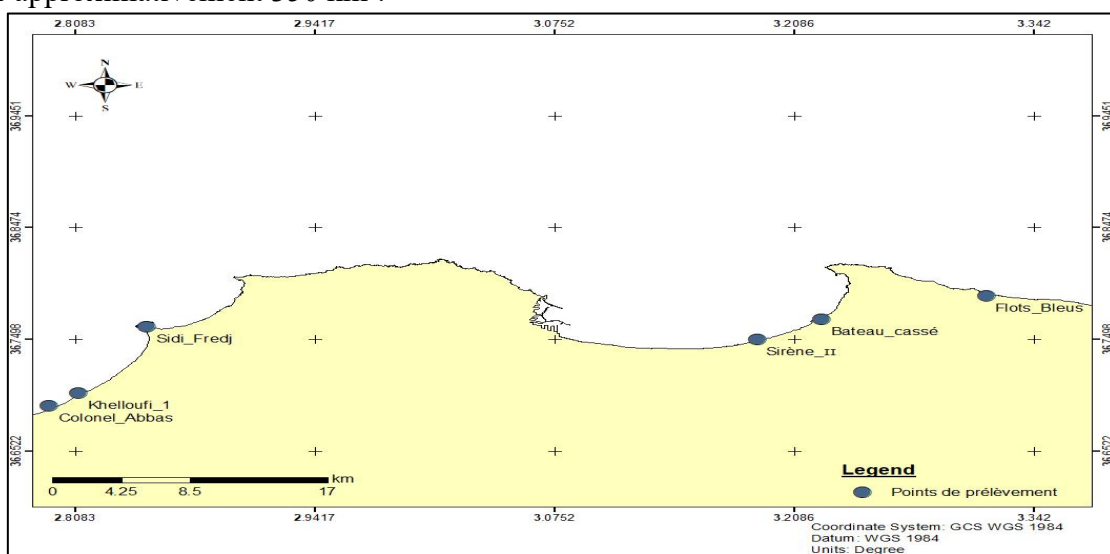


Figure 12: Situation géographique des sites de prélèvement (ArcGIS)

❖ Plage de Ain Taya

Flots bleus, située à Ain Chrob dans la commune de Ain Taya, à 25 kilomètres à l'est d'Alger. La morphologie côtière présente un substrat sablonneux s'étalant sur 600 mètres de longueur avec une amplitude de 10 mètres.



Figure 14:plage Ain Taya

Tableau 3:Coordonnées géographiques de la plage 'Flots bleus'

Coordonnées	DMS
Latitude	36°47'17.054''
Longitude	3°18'56.183''

❖ Plage Bateau Cassé

Située à l'extrémité occidentale de Bordj El Kiffan, en bordure de la wilaya d'Alger. La plage est sablonneuse avec une étendue de 25 mètres en longueur et 110 mètres en largeur, couvrant une superficie de 3822m². Le site se distingue par la présence d'accumulations urbaines importantes à proximité, avec un environnement côtier influencé par les dynamiques.



Figure 15: Bateau cassé

Tableau 4:Coordonnées géographiques de la plage 'Bateau Cassé'

Coordonnées	DMS
Latitude	36°46'2.147''
Longitude	3°13'25.504''

❖ Plage Sirène II

Cette portion littorale s'implante à Bordj El Kiffan, caractérisée par une longueur de 134 mètres et une largeur de 45 mètres. La zone présente un profil côtier autorisé pour la baignade, située à proximité d'infrastructures et d'agglomération.



Figure 16: plage sirène

Tableau 5:Coordonnées géographiques

Coordonnées	DMS
Latitude	36°44'59.66''
Longitude	3°11'15.751''

de la plage 'Sirène II'

❖ Plage Sidi Fredj

Elle se situe à une vingtaine de kilomètres vers l'occident du centre-ville d'Alger. Elle se trouve à 780 mètres de la plage "Sidi Fredj Ouest" qui se trouve de l'autre côté de la presqu'île.



Figure 17:plage Sidi Fredj

Tableau 6:Coordonnées géographiques de la plage 'Sidi Fredj'

Coordonnées	DMS
Latitude	36°45'40.038''
Longitude	3°50'53.051''

❖ Plage Kheloufi I

Elle se situe à Zéralda, avec 1600m en longueur et 60m en largeur. La zone se caractérise par un profil côtier autorisé à la baignade, à l'ouest se trouve l'oued de Mazafran.

Tableau 7:Coordonnées géographiques de la plage 'Kheloufi I'

Coordonnées	DMS
Latitude	36°42'11.069''
Longitude	2°48'35.266''



Figure 18:Plage Kheloufi I

❖ Plage Colonel Abbas

Elle s'étend sur 3 km et présente une large partie de la ville Douaouda marine. La granulométrie de ce secteur côtier se compose de sables fins, moyens et de galets, et elle se trouve à côté de l'embouchure de l'oued Mazafran.



Tableau 8:Coordonnées géographiques de la plage 'Colonel Abbas'

Coordonnées	DMS
Latitude	36°41' 30.748''
Longitude	2°47' 36.64''

Figure 19:Plage Colonel Abbas

II.2 Techniques d'identification des entérocoques

II.2.1 Revivification des entérocoques

Une collection de 113 souches d'entérocoques conservées précédemment, a été revivifiée selon la méthode suivante :

On inocule avec l'anse de platine stérile à partir de chaque souche conservée dans un tube contenant 5 ml de bouillon BHIB stérile, puis on procède à une incubation à 37°C pendant une période de 24 heures.

Les résultats de la revivification se manifestent par l'apparition d'un trouble dans le milieu. (Quinn, et al., 2002)

Les souches revivifiées ont été purifiées en utilisant le procédé d'ensemencement par stries sur gélose Slanetz et mises en incubation à 37°C pendant une période de 24 à 48 heures. Cette étape a été répétée autant de fois nécessaire jusqu'à l'obtention de colonies pures. L'observation de la pureté sera complétée par des tests confirmatifs. (Quinn, et al., 2002)

II.2.2 Les Tests confirmatifs

Suite à la purification des souches, une phase d'identification a été réalisée pour vérifier que les isolats examinés sont bien des entérocoques.

Un test confirmatif a d'abord été réalisé sur gélose bile-esculine azide (BEA), un milieu sélectif permettant de détecter l'hydrolyse de l'esculine en présence de bile.

Ce test a été renforcé par la coloration de Gram, le test de la catalase et de l'oxydase.

Les tests effectués, leurs principes, les techniques et la lecture des résultats positifs sont résumés au tableau suivant :

Tableau 9: Tests d'identifications des entérocoques

Test	Principe	Technique
Confirmation de l'identification sur Gélose BEA, un milieu sélectif qui permet de détecter l'hydrolyse de l'esculine en présence de bile. (MacFaddin, 2000)	Bile : Inhibe la croissance des bactéries autres qu'intestinales. Esculine : Polyoside complexe que les streptocoques fécaux et les entérocoques hydrolysent en libérant de l'aglucone qui donne une coloration noire en présence de sel de fer. Azide de sodium : Inhibe la croissance des bactéries à G-.	Ensemencer l'inoculum en surface et réaliser un isolement selon la méthode des quadrants. Incuber à 37°C/24h. puis effectuer la lecture
Coloration de	Différencier entre deux grands groupes	Réalisation de frottis. Coloration VLAFF

Gram (MacFaddin, 2000)	Bactériens : bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif	(violet de gentiane, Lugol, alcool, fuchsine) Observation microscopique à l'immersion x100.
Test de catalase Source spécifiée non valide.	La catalase est une enzyme qui détruit les peroxydes toxiques pour les bactéries. Elle catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en eau avec libération d'O ₂ $2 \text{H}_2\text{O}_2 - (\text{catalase}) \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Mettre en contact sur une lame une colonie avec de l'eau oxygénée.
Test d'oxydase (MacFaddin, 2000)	Détecter l'enzyme cytochrome c oxydase chez les bactéries. Le réactif est oxydé en présence de l'enzyme → coloration bleu-violet.	Appliquer une colonie fraîche sur une bandelette imprégnée du réactif oxydase et voir s'il y a virage de couleur vers le violet.

II.2.3 Tests de virulence

II.2.3.1 Formation du biofilm

Principe

Le test de formation du biofilm sur microplaque repose sur la capacité des bactéries à adhérer et à former une matrice extracellulaire sur une surface abiotique. Les entérocoques présents dans l'échantillon se fixent aux parois des puits des microplaques et développent une structure tridimensionnelle complexe constituée de cellules bactériennes. La quantification permet une évaluation spectrophotométrique de la densité de biofilm formé.

Mode opératoire

Utiliser des microplaques à 96 puits.

- Une jeune culture bactérienne est ajustée à une densité optique entre 0,56 et 0,64 à une longueur d'onde de 540nm.

- Inoculer 100 μL de la culture dans chaque puit, puis incuber pendant 6h à 37°.

Coloration et quantification :

- Laver les puits avec 25 μL de solution de cristal violet à 1% pendant 15 min.
- Éliminer le milieu et les cellules non adhérentes par 3 lavages délicats avec du PBS stérile (200 μL par puit).
- Fixer les biofilms avec l'éthanol (200 μL par puit) pendant 15 min
- Dans des tubes stériles contenant 1,2 ml d'alcool, verser le contenu des puits.
- Mesurer l'absorbance à 540 nm. (**Maldonado et al. 2007**)

Classification des souches selon leur capacité à former des biofilms :

DO > 0.5 : Forte production de biofilms

0.1 < DO < 0.5 : Production moyenne de biofilms

DO <

0.1 : Faible production de biofilm

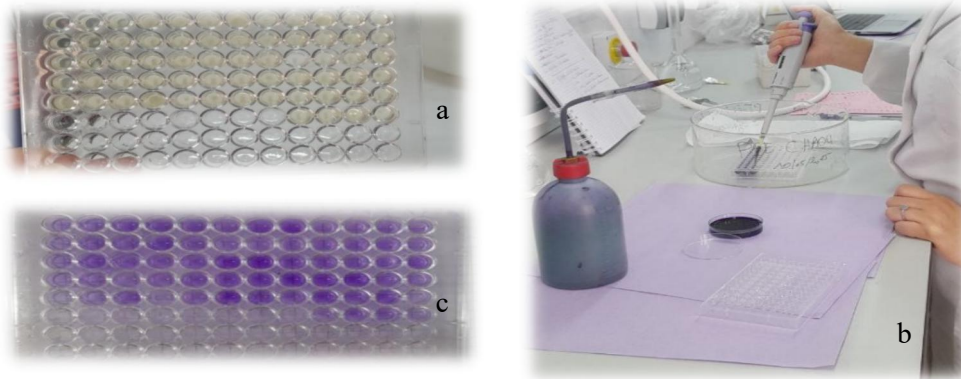


Figure 20: a : La culture bactérienne après 6h d'incubation | b : Lavage avec cristal du violet | c : La culture bactérienne après fixation par l'éthanol

II.2.3.2 Test de coagulase

Principe

La réaction se fait par une enzyme 'la coagulase' qui agit sur le fibrinogène du plasma sanguin pour le transformer en fibrine, provoquant ainsi la coagulation du plasma. (Giri, 2018)

Mode opératoire

- À l'aide d'une anse stérile, prélever 2 à 3 colonies et les ensemencées dans un tube contenant du BHIB.
- Incuber à 37° C pendant 24 h \pm 2 h.
- Dans un autre tube stérile, ajouter aseptiquement 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma de lapin. Incuber à 37° C.

- En inclinant le tube, examiner la coagulation du plasma après 4 h à 6 h d'incubation.

Si le test est négatif, il faut le réexaminer après 24 h d'incubation.

La réaction est considérée comme positive quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide. (JORA 2014)

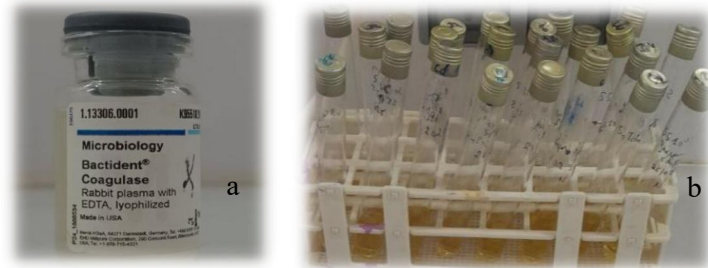


Figure 21: a : Plasma du lapin | b : Culture bactérienne dans du BHIB

II.2.3.3 Test d'hémolyse

L'examen de la capacité pathogène des Entérocoques est associé à la présence d'hémolysine, c'est-à-dire l'enzyme qui provoque la lyse des hématies. Ainsi, les bactéries dotées de l'hémolysine décomposent l'hémoglobine. (Joffin, N, et al., 1999)

Mode opératoire

1. Les bactéries sont inoculées sur de la gélose Columbia enrichie de 3% de sang humain frais,
2. Puis incubées à 37°C pendant une durée de 24 heures.

On distingue trois formes majeures d'hémolyse lors de l'analyse du test hémolytique.

- Hémolyse alpha C'est une hémolyse partielle où la région entourant les colonies bactériennes est teintée de vert. Cela signale une détérioration partielle de l'hémoglobine.
- Hémolyse Beta : Il s'agit d'une hémolyse complète où la zone autour des colonies de bactéries devient transparente.
- Hémolyse Gamma : On n'observe pas d'hémolyse. (Guiraud, et al., 2004)

II.2.3.4 Production de bactériocine

Afin d'évaluer la capacité des souches d'entérocoques marins à produire des bactériocines, le test a été réalisé selon la méthode des puits.

Mode opératoire

Plusieurs auteurs tels que Puizani et al. (1992) ont apporté des modifications à cette méthode :

1. Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées à 37°C pendant 16 à 24h en anaérobiose, ce qui évite la formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
2. Après incubation, le milieu est centrifugé (4000 tours/minute pendant 15 minutes). Le surnageant est ensuite distinct du culot, filtré et traité avec du NaOH (1N) pour atteindre un pH se situant entre 6,8 et 7. Il est par la suite maintenu à une température de 4°C.
3. Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide et initialement inoculée avec les deux souches pathogènes de *Pseudomonas aeruginosa* une d'origine marine et l'autre d'origine clinique (équivalent à 106 UFT/ml à 625nm), par le biais d'écouvillonnage. On permet aux boîtes de sécher à température ambiante pendant une demi-heure, puis on crée des puits en utilisant un emporte-pièce.
4. Ces puits recevront 100µl du surnageant brut les boites seront mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant.
5. Par la suite, les boîtes sont placées en incubation pendant 24 heures à une température de 37°C.

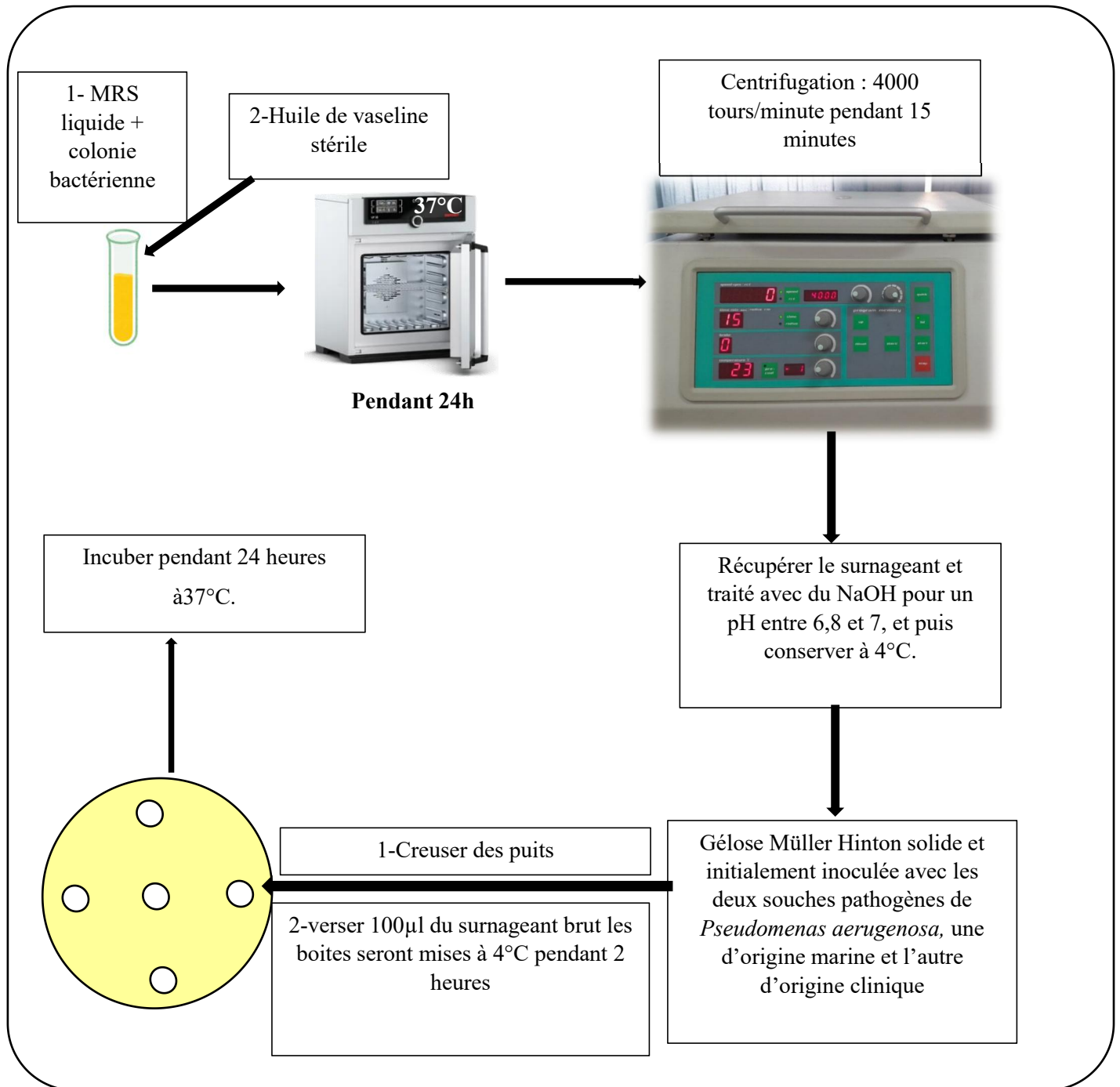


Figure 22: Schéma du mode opératoire de production de bactériocine

II.4 Étude de la résistance aux antibiotiques par antibiogramme

L'antibiogramme est une méthode d'analyse microbiologique qui vise à évaluer la sensibilité et la résistance d'une souche bactérienne face à différents agents antimicrobiens de différentes familles.

Cette technique repose sur la diffusion des antibiotiques à partir de disques imprégnés déposés à la surface d'un milieu gélosé déjàensemencé avec la souche bactérienne à tester. L'antibiotique diffuse de manière concentrique dans la gélose, créant un gradient de concentration décroissant. Si la bactérie est sensible à l'antibiotique, une zone d'inhibition de croissance se forme autour du disque. Le diamètre de cette zone est inversement proportionnel à la résistance de la souche : plus la zone est large, plus la bactérie est sensible. (CLSI, 2023)

Cette analyse est effectuée selon la méthode de diffusion en milieu solide sur gélose (Mueller-Hinton, milieu nutritif non sélectif permettant une croissance homogène des bactéries non exigeantes. L'interprétation des résultats s'est basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition selon le manuel du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2023). (CLSI, 2023)

Mode opératoire

➤ **Préparation de l'inoculum**

Des colonies isolées âgées de 18 à 24 heures ont été prélevées à partir d'une culture pure en gélose. Un prélèvement de 3 à 5 colonies a été effectué à l'aide d'une anse stérile, puis les colonies ont été suspendues dans 5 ml d'eau physiologique stérile.

➤ La densité de la suspension bactérienne a été ajustée à une turbidité équivalente à 0,5 unité de Mc Ferland, correspondant à une concentration approximative de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. La suspension bactérienne ainsi préparée a été utilisée dans l'heure suivant sa préparation afin de garantir la viabilité et la constance de l'inoculum.

➤ **Ensemencement du milieu**

Un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension standardisée, puis essoré sur les parois internes du tube pour éliminer l'excès de liquide.

L'ensemencement de la gélose Mueller-Hinton a été effectué en répartissant l'inoculum uniformément à la surface du milieu selon trois passages croisés : un premier en horizontal,

un second en vertical, un troisième en oblique, après avoir pivoté la boîte de 60°.

Après ensemencement, les boîtes ont été laissées à température ambiante pendant 3 à 5 minutes afin de permettre une légère absorption de l'humidité avant la pose des disques.

➤ **Application des disques antibiotiques**

En utilisant une pince stérile en métal, les disques contenant des antibiotiques (**voir tableau 10**) ont été soigneusement placés sur la surface de la gélose inoculée. Chaque disque a été légèrement pressé pour assurer un contact homogène avec le milieu.

Une attention particulière a été portée au respect d'un espacement minimal de 24 mm (de centre à centre) entre les disques, afin d'éviter tout chevauchement des zones d'inhibition.

Les disques, une fois installés, n'ont pas été déplacés afin d'éviter toute interruption de la diffusion.

➤ **Incubation**

Les boîtes de Petri ont été incubées à l'envers, en condition d'aérobiose, pendant une durée de 18 à 24 heures à 37 °C.

➤ **Lecture et interprétation des résultats**

Suite à l'incubation, nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition créées autour des disques antibiotiques en millimètres en utilisant une règle millimétrique.

(CLSI, 2023)

Tableau 10:liste des antibiotiques en disques utilisés

Famille	Nom de l'antibiotique	Abréviation	Charge (µg)
β-lactamines	Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	30
	Amoxicilline	AMX	25
	Céfazoline	CFZ	30
	Céfotaxime	CTX	30
	Céftazidime	CAZ	30
Aminosides	Amikacine	AK	30
	Gentamicine	GM	10
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
	Ciprofloxacine	CIP	5
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
	Doxycycline	DOX	30
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30
Lincosamides	Clindamycine	CD	2
Phénicol	Chloramphénicol	C	30
Sulfamides	Triméthoprim Sulfaméthoxazole	SXT	25
	Triméthoprim	TMP	10

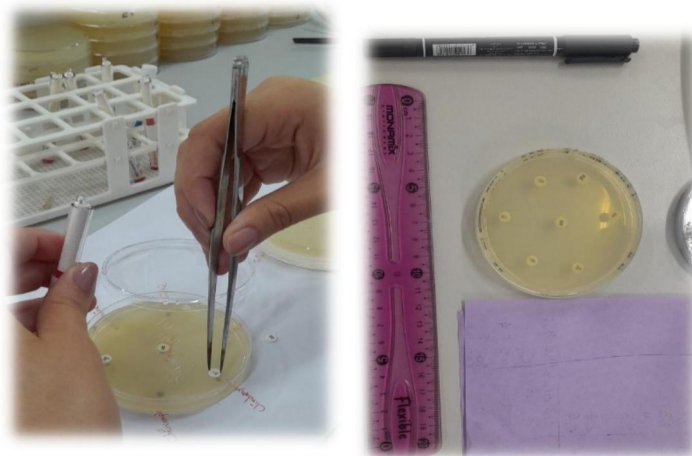


Figure 23:disposition des disques

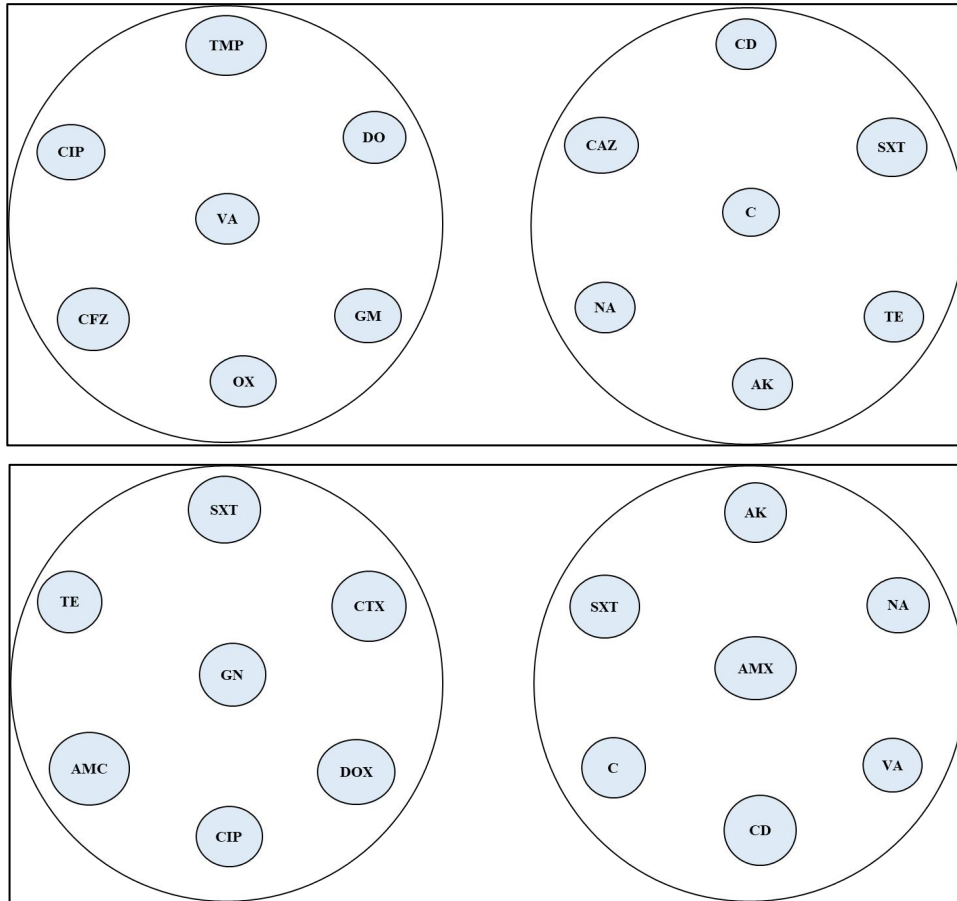


Figure 24: Schéma de la disposition des disques d'antibiotiques.

III.
RESULTATS ET
DISCUSSION

III. Résultats et discussion

Dans cette section, nous présentons les résultats obtenus lors de l'évaluation des facteurs de virulence chez les entérocoques marins isolés. L'analyse porte notamment sur les tests de virulence ainsi que les tests microbiologiques d'identification. Une discussion comparative avec la littérature scientifique permet de situer nos observations dans un contexte plus large et d'en dégager les implications en termes de risque potentiel pour la santé humaine et de persistance dans l'environnement marin.

III.1 Résultats des tests de confirmations

III.1.1 Revivification des souches

L'ensemencement de 122 souches d'Entérocoques marins dans le bouillon Infusion de Cœur et de Cerveau (BHI-B) a entraîné une restauration efficace de leur activité métabolique après leur conservation. Ce milieu nutritif, riche en extraits de cerveau et de cœur de bœuf, offre un environnement favorable à la croissance de bactéries exigeantes ou affaiblies, comme celles issues de longues périodes de stockage.

Le choix du BHI-B comme milieu de revivification est justifié par sa composition équilibrée en acides aminés, peptides et vitamines (Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme, 1989), qui favorisent la restauration rapide des fonctions cellulaires. Dans notre étude, les souches ont été transférées dans ce milieu puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Une croissance turbide homogène a été observée dans la majorité des cas, traduisant une reprise métabolique satisfaisante.

III.1.2 L'isolement

L'isolement des entérocoques marins a été réalisé en utilisant le milieu sélectif Slanetz et Bartley, réputé pour sa capacité à cibler spécifiquement les espèces du genre *Enterococcus* dans des échantillons complexes, comme ceux issus de l'environnement marin. Ce milieu contient de l'azide de sodium, qui inhibe la flore à Gram négatif, et du chlorure de tétrazolium, un indicateur redox qui permet une coloration caractéristique des colonies.

Après une incubation à 37 °C, on a noté la présence de colonies de couleur allant du rose au rouge, de petite taille, lisses et circulaires, typiques des entérocoques. Ces résultats attestent de l'efficacité de ce milieu pour l'isolement primaire, garantissant à la fois la sélectivité et la visibilité des colonies visées. (Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium, 1957) .

L'efficacité de ce milieu dans un contexte marin témoigne de la résilience écologique des entérocoques, capables de survivre dans des conditions salines et de s'adapter à divers environnements. Cette robustesse explique également leur utilisation comme indicateurs de contamination fécale dans les eaux marines et côtières (Enterococci in the environment., 2012).

Cependant, afin de surmonter les contraintes du milieu Slanetz, en particulier la potentialité du développement de bactéries similaires. (Ex. : *Streptococcus*, *Lactococcus*), une confirmation a été systématiquement réalisée (coloration de Gram, test catalase, test oxydase). Cette approche a permis de valider l'identification des colonies présumées entérocoques avant d'entamer les tests de virulence.

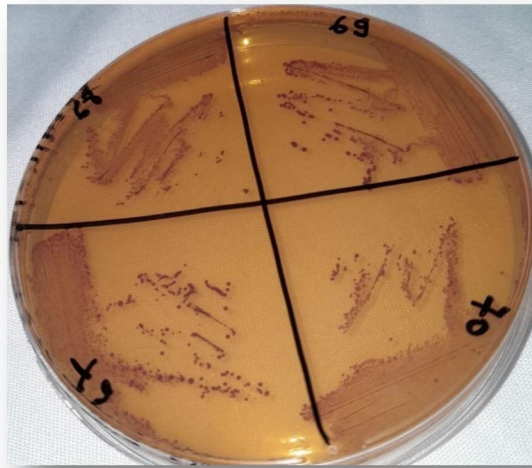


Figure 25: Résultats de l'isolement sur le milieu Slanetz

III .1.2 Confirmation dans le milieu BEA

Après l'isolement sur le milieu Slanetz et Bartley, la confirmation des colonies présumées *Enterococcus* a été réalisée sur le milieu BEA (Bile Esculine Azide agar). Ce milieu est à la fois sélectif et différentiel, permettant d'identifier spécifiquement les entérocoques sur la base de leur capacité à hydrolyser l'esculine en présence de sels biliaries et d'azide de sodium.

L'ensemble des souches isolées ont produit un noircissement du milieu autour des colonies après 24 heures d'incubation à 37 °C. Ce phénomène est dû à la formation de composés phénoliques issus de l'hydrolyse de l'esculine, qui réagissent avec le citrate de fer pour former un précipité noir. Cette réaction positive constitue un critère clé d'identification des entérocoques (Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme, 1989).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats confirment que les colonies sélectionnées sur le milieu Slanetz étaient bien des souches d'entérocoques, justifiant ainsi la poursuite des tests de virulence (hémolyse, biofilm, etc.). L'utilisation conjointe du milieu BEA et des tests biochimiques comme la catalase (négative chez les entérocoques) a permis une identification fiable, rapide et économique, conforme aux recommandations en microbiologie environnementale.

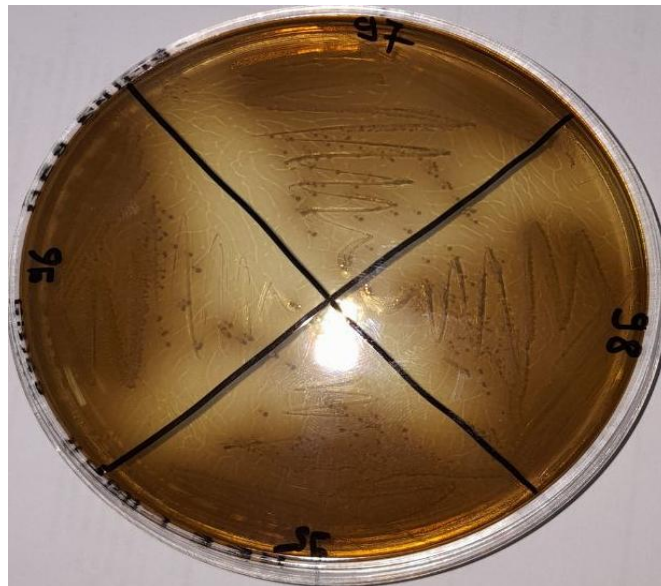


Figure 26:Résultat de la confirmation sur le milieu BEA prise par nous

III.1.4 Test de la catalase

Le test de la catalase a été utilisé comme méthode complémentaire d'identification pour confirmer l'appartenance des souches isolées au genre *Enterococcus*. (MacFaddin, 2000)

Dans notre étude, aucune formation de bulles n'a été observée après l'ajout de H_2O_2 à une colonie fraîchement cultivée sur lame, indiquant une réaction négative au test de catalase pour toutes les souches testées. Ce résultat est cohérent avec les caractéristiques biochimiques classiques du genre *Enterococcus*, connu pour être catalase-négatif.



Figure 27:Résultat du test catalase

III.1.5 Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase a été utilisé comme critère différentiel complémentaire pour confirmer l'identité des souches isolées. Ce test permet de détecter la présence du cytochrome oxydase, une enzyme de la chaîne respiratoire impliquée dans le transfert d'électrons à l'oxygène moléculaire. La présence de cette enzyme est révélée par un virage coloré violet foncé lors de l'application d'un réactif à base de tétraméthyl-p-phénylènediamine. (Koneman, et al., 1997)

Dans notre étude, toutes les souches testées ont montré une réaction négative au test d'oxydase, c'est-à-dire absence de coloration violette dans les 30 secondes, ce qui est conforme aux caractéristiques du genre *Enterococcus*, connu pour être oxydase-négatif. Ce résultat, en cohérence avec le test de catalase négatif, renforce la fiabilité de l'identification biochimique.



Figure 28: Résultat de test oxydase

III.1.6 Coloration de Gram

La coloration de Gram a été utilisée comme méthode de base pour caractériser morphologiquement les souches isolées à partir du milieu marin. Cette technique différentielle repose sur la capacité des parois bactériennes à retenir le violet de gentiane après fixation et traitement à l'alcool.

L'observation microscopique après coloration a révélé des Cocci à Gram positif, disposés en chaînettes ou en paires, ce qui correspond au profil morphologique typique des bactéries du genre *Enterococcus*. Ce résultat est en cohérence avec les données de la littérature, qui décrivent les entérocoques comme des Cocci Gram positif non sporulés, souvent disposés en diplocoques ou en courts amas. (Koneman, et al., 1997)

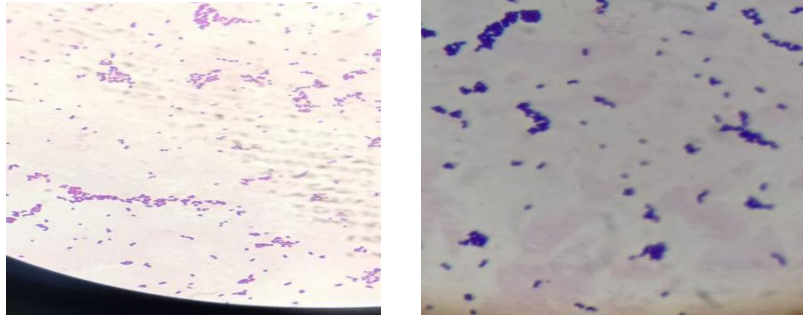


Figure 29:Résultat de coloration de Gram sous microscope optique Gx20

III.2 Résultats des tests de virulence

III.2.1 Test de coagulase

L'ensemble des 122 isolats d'entérocoques a été soumis à un test de coagulase. Comme attendu, toutes les souches se sont révélées négatives, confirmant que les entérocoques sont des bactéries coagulase négative. Ce résultat est conforme aux caractéristiques microbiologiques typiques et classiques des entérocoques qui sont naturellement dépourvues de l'enzyme coagulase. (Huycke et al. 1998)

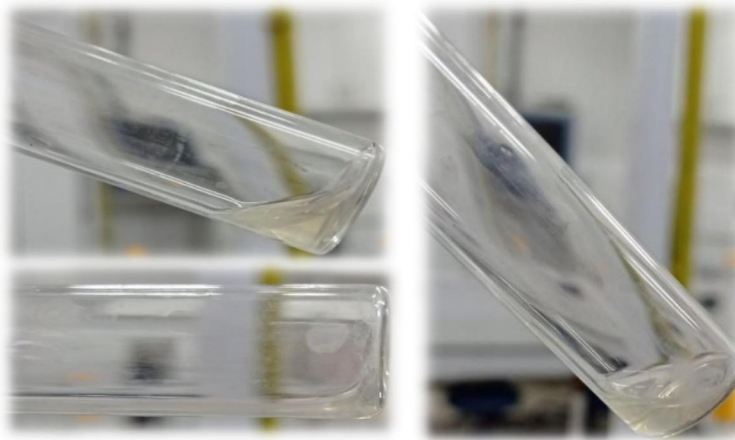


Figure 30:Coagulase négative : pas d'agglutination

III.2.2 Test de biofilm

Selon les résultats présentés dans la figure ci-dessous, 12,5% de nos souches ne produisent pas de biofilm in vitro, avec une DO inférieure à « 0,06 », elles sont moins persistantes que les autres souches. L'absence de production de biofilm chez ces souches pourrait s'exprimer par leur adaptation à des conditions environnementales spécifiques où la production de biofilm n'est pas nécessaire, ou par le fait qu'elles ont développé des stratégies alternatives de survie autre que la production de biofilm.

87.5% des isolats (107/122 bactéries) étaient capables de former des biofilms :

Nos résultats montrent que 75% des souches d'entérocoques sont de faibles productrices de biofilm, avec une densité optique (DO) inférieure à « 0,1 ».

Seulement 5% sont considérées comme moyennement productrices de biofilm dont nous citons : S genta 10^{-2} et S20 avec une DO comprise entre « 0,1 et 0,27 », cette capacité modérée à produire un biofilm, bien que moins prononcée que celle des souches fortement productrices suggère que ces bactéries pourraient avoir un pouvoir pathogène significatif en fonction de conditions environnementales.

Les 5 souches Sgenta 10^{-1} ; S8 ; S57 ; Stetra 10^{-2} et S5 se révèlent être de fortes productrices de biofilm, représentant 7,5% des souches étudiées avec des densités optiques de 0,6 ; 0,3 ; 0,61 ; 0,6 ; 0,4 respectivement.

La capacité de 87,5% des isolats à former le biofilm est préoccupante, car les biofilms augmentent la persistance bactérienne et la résistance aux traitements. (Ullah, et al., 2023)

Nos résultats sont en concordance avec ceux de (Maameri et al., 2024). Leurs résultats ont montré que la majorité des souches (83%) étaient de faibles productrices de biofilm, tandis que 9% moyennement productrices (4 souches) et seulement 5% (2 souches) étaient fortes productrices.

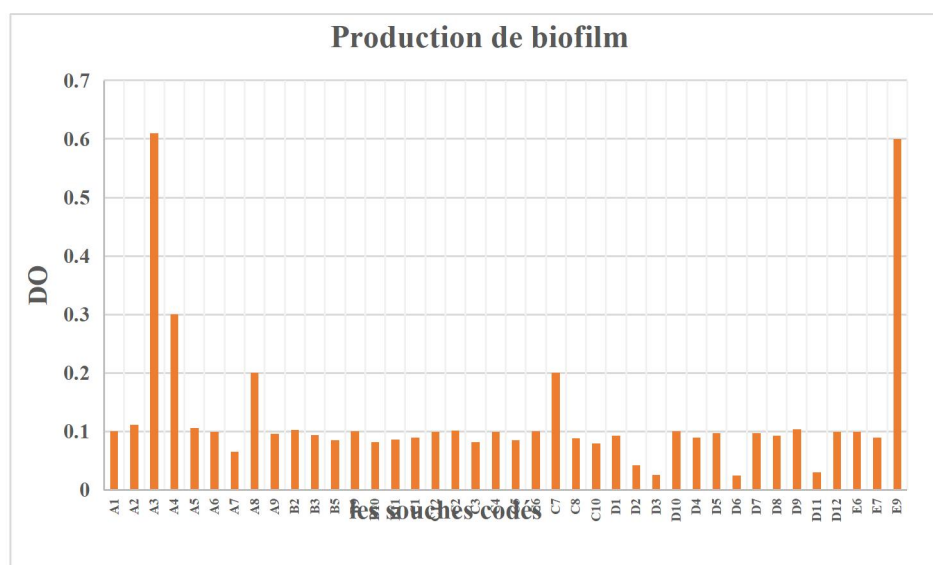


Figure 31: Résultats de la densité optique du test de biofilm

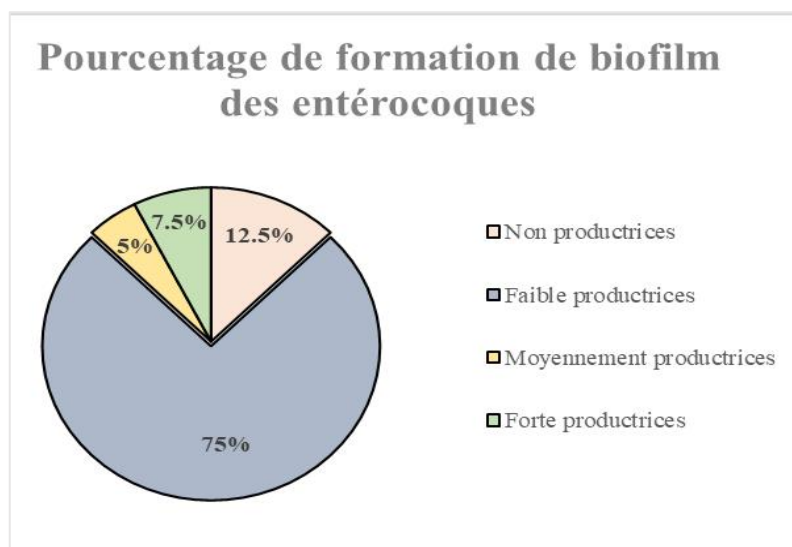


Figure 32: Pourcentage du test de biofilm des souches étudiées

Selon l'étude de (HANNAOUI 2021), où ils ont analysée 113 souches d'entérocoques collectées de selles, la totalité (100%) des bactéries étaient capables de produire du biofilm avec une intensité peu variable : la majorité des souches (55% *E. faecium* et 45% *E. faecalis*) étaient faibles à modérées en termes de production de biofilm avec une densité optique variable selon la souche, tandis que les fortes productrices étaient rares. Cette étude a révélé également que les souches résistantes à la vancomycine présentaient une capacité de formation de biofilm significativement plus élevée que les souches sensibles.

III.2.3 Test de production de bactériocines

Dans cette étude, on a analysé notre collection d'entérocoques marins pour voir si elles sont capables de produire des bactériocines. Pour cela, nous avons employé deux souches pathogènes : l'une issue du milieu marin, *Pseudomonas aeruginosa*, et l'autre, d'origine clinique.

Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de zone d'inhibition autour de la souche clinique, mais une zone d'inhibition claire a été notée pour la souche marine voir figure (33, 34).

Sur les 122 souches d'entérocoques marins étudiées, nous avons observé que 21 souches uniquement, soit 17,2 %, présentaient une activité antibactérienne mesurable contre la souche marine de *Pseudomonas aeruginosa*. À l'inverse, aucune inhibition n'a été détectée autour de la souche clinique, ce qui suggère que les bactériocines produites sont spécifiques et agissent préférentiellement sur des micro-organismes partageant le même écosystème.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ces résultats sont comparables à ceux de (Maameri et al., 2024), qui ont testé 43 souches d'entérocoques contre une souche pathogène d'*E. coli*. Leurs résultats ont montré que 9 % des souches produisaient des entérocoques. La proximité des pourcentages (17,2 % vs. 9 %) obtenus dans les deux études renforce l'idée que la production de bactériocines est un phénomène relativement rare mais non négligeable, limité à certaines souches du genre *Enterococcus*.

Selon l'étude de (Maameri et al., 2024), les souches productrices ont été identifiées appartenant à l'espèce *Enterococcus faecium*, ces souches produisent principalement des entérocoques de classe II, également appelées pédocines, connues pour leur activité ciblée contre certaines bactéries pathogènes, notamment *Listeria monocytogenes* et *E. coli*.



III. **Figure 34:**Résultat de la production de bactériocine sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* marine.



Figure 33:Résultat de la production de bactériocine sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* clinique (la même bactérie).

Nous avons constaté un éclaircissement du milieu après 24h à 48h d'incubation, chez certaines souches. Cela signifie que le résultat est positif et qu'il y a eu hémolyse du sang par lesdites souches.

Les résultats des souches testées sont triés par type d'hémolyse.

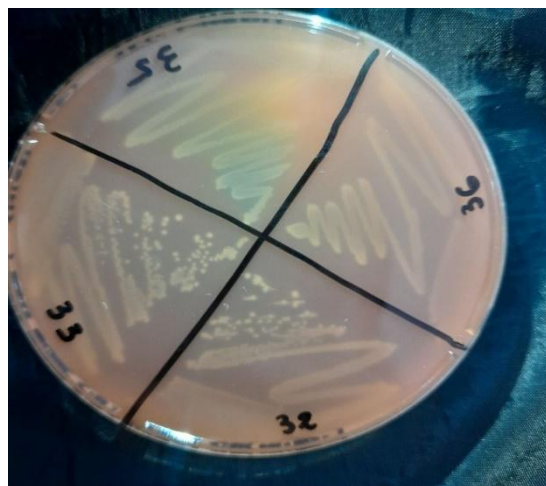


Figure 35:Résultat d'hémolyse partiel dans la souche 35 et l'absence d'hémolyse dans la souche 36.



Figure 36: Résultat d'hémolyse complète de la souche 49.

D'après la figure ci-dessous, la proportion la plus élevée est la non-hémolytique (71%), ce qui indique que la majorité des entérocoques isolés possèdent un potentiel pathogène limité car elles ne produisent pas d'hémolysines qui endommagent directement les globules rouges. Ces souches ne présentent pas de menace immédiate en termes d'infections graves.

25% des souches sont bêta hémolytiques. Ces bactéries sont plus préoccupantes sur le plan pathogène, étant donné que ce phénotype est souvent associé à la production de diverses toxines et enzymes, telles que les hémolysines, qui peuvent contribuer à la lyse des cellules hôtes et à l'établissement d'infections.

Les 4% restants sont des souches alpha -hémolytiques, qui, bien que moins virulentes que les souches bêta-hémolytiques, peuvent également jouer un rôle dans la pathogenèse en contribuant à la lyse partielle des érythrocytes.

Dans l'étude de **(Bohatic, et al. 2019)** menée sur des entérocoques isolés de fruits de mer prêts à être consommés, où 35,6 % des isolats présentaient une activité β -hémolytique. Cette différence, bien que modérée, suggère que les souches issues de la chaîne alimentaire peuvent exprimer un pouvoir pathogène légèrement plus élevé que celles d'origine environnementale directe. Cela pourrait s'expliquer par une sélection de souches plus virulentes au cours du traitement, du stockage ou du transport des produits de la mer. Toutefois, nos résultats

indiquent que même dans un environnement naturel comme les zones côtières, des entérocoques à potentiel pathogène élevé peuvent être présents, soulignant l'importance d'une surveillance microbiologique continue dans les écosystèmes marins.

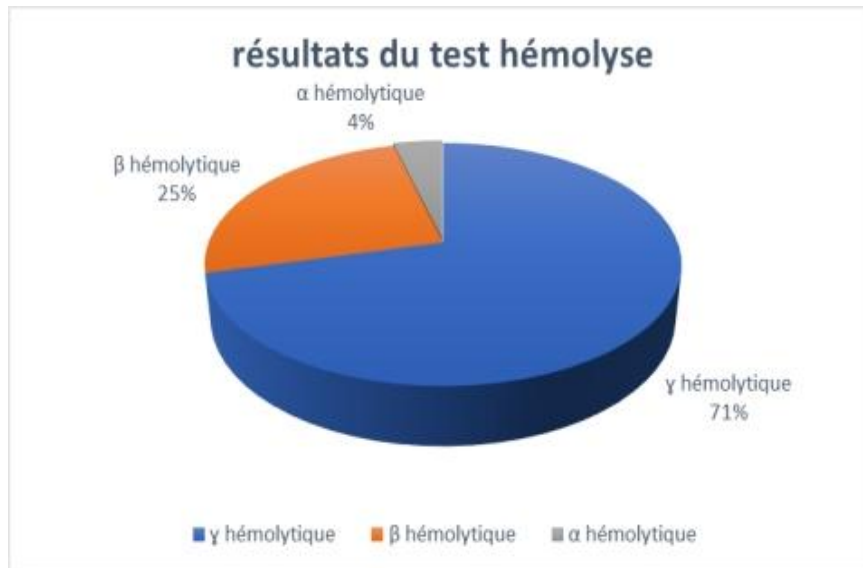


Figure 37: Pourcentage du test d'hémolyse

Le test d'hémolyse identifie clairement les souches d'entérocoques susceptibles d'être pathogènes, le groupe bêta-hémolytique est la source majeure de préoccupation pour la santé publique en raison de sa capacité à détruire complètement les globules rouges, ce qui en fait un facteur hautement virulent.

III.3 Résistance aux antibiotiques

III.3.1 L'antibiogramme

Une collection de 122 entérocoques isolés de l'eau de mer a été analysée pour l'évaluation de la résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosée :

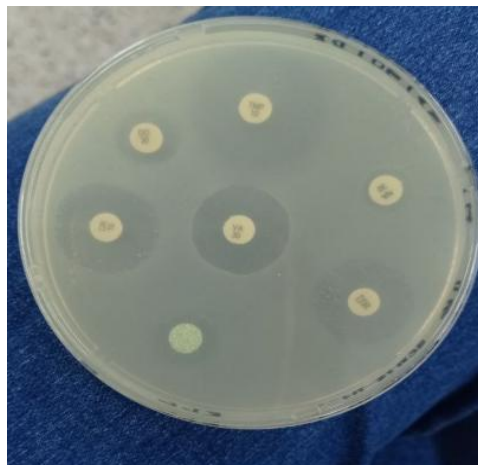


Figure 38: Profil de la résistance aux antibiotiques des souches

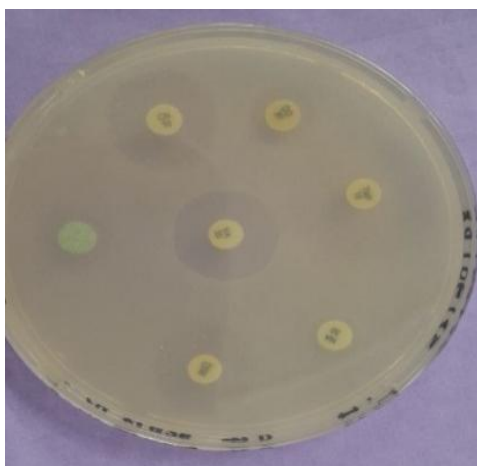
D'après nos résultats, la résistance aux antibiotiques est répartie comme suit :

La **vancomycine** demeure l'antibiotique le plus efficace avec 93,9% de souches sensibles, retrouvées au niveau des plages : Ain Taya, Bateau Cassé, Sidi Fredj et Kheloufi.

Les 6,1% restantes sont des souches résistantes ont été prélevées essentiellement dans la plage de Colonel Abbes, au niveau de l'embouchure de l'oued Mazafran.

La **gentamicine** présente également une excellente efficacité avec 71,2% de souches sensibles, 28% intermédiaires et 0,8% résistantes, confirmant son intérêt thérapeutique contre les entérocoques. Généralement en milieu hospitalier la gentamicine est administrée en association avec la vancomycine pour lutter contre des infections à entérocoques.

Les
Pour
25% à



Deux

études, une menée par (HANNAOUI, 2021) portant sur 100 souches d'entérocoques d'origine clinique et l'autre par (AGRANE et al. 2023) sur la chair de Poulet et de dinde. Elles ont révélé des taux de résistance à la

vancomycine et à la **gentamycine** de 21% de résistance à la vancomycine (contre 6,1% dans notre étude) et 2% de résistance à la gentamycine pour les souches cliniques (contre 28,85% dans notre recherche) ces résultats relèvent que la vancomycine est plus efficace que la gentamycine dans le traitement des infections à entérocoques bien que ces deux antibiotiques soient souvent associés en milieu clinique.

Pour l'**Amoxicilline (AX)**, l'**Amikacine (AK)** et la **Chloramphénicol (C)** la résistance est de 23,78%, 36,2% et 31,92% respectivement.

Pour l'**amoxicilline** et l'**amikacine** la résistance la plus forte a été retrouvée à Ain Taya (50% et 100% respectivement) et la plus faible a été observée au niveau de Sidi Fredj où toutes les souches étaient sensibles.

Le taux de résistance le plus fort au **chloramphénicol** a été enregistré au niveau de Bateau Casée avec un taux de 73%. Cependant, toutes les souches isolées de Ain Taya sont sensibles. (0% de résistance).

Concernant les plages Sirène 2 et Bateau Casée, un taux de résistance de 43% a été retrouvé pour l'**amikacine** et 34% et 30% respectivement pour l'**amoxicilline**.

Concernant la plage Kheloufi, nous remarquons l'absence totale de résistance à l'**amikacine** (0%) et un taux moyen pour l'**amoxicilline** et le **chloramphénicol** (42% et 44%) respectivement.

Même la plage Colonel Abbes présentait une faible résistance avec 89% de souches sensibles à l'**amikacine**, et 66% et 63.3% sensibles à l'**amoxicilline** et le **chloramphénicol** respectivement.

Les souches qui montrent une résistance à la famille des bêta-lactamines (Pénicilline, Amoxicilline + Acide Clavulanique, Céfotaxime, Céfalexine, Amoxicilline) présentent une résistance extrinsèque. Cette résistance est due à la protéine liant la pénicilline (PLP) de bas poids moléculaire ayant une faible affinité pour les bêta-lactamines.

Pour l'association **amoxicilline + acide clavulanique**, 100% des souches de Ain taya sont résistantes. Pour sidi Fredj, Sirene2, Kheloufi, Colonel Abbes et Bateaux Casée, la résistance est modérée à moyenne avec des taux de 60%, 67,57%, 54% et 40% respectivement. Donc cette différence suggère l'absence de synergie entre les deux molécules (amoxicilline et l'acide clavulanique).

La **ciprofloxacine** présente une faible résistance dans les deux plages de Colonel Abbes et Kheloufi (15,31% et 7,51% respectivement). En revanche, **l'acide nalidixique** affiche une forte résistance (97,5%) dans toutes les plages. Ceci peut être expliqué par le fait que la ciprofloxacine (quinolone de 2ème génération) est beaucoup plus efficace que l'Acide Nalidixique (quinolone de 1ère génération).

Pour la **Tétracycline**, colonel Abbes représente la plus grande résistance (48,5%) suivi par Bateau Cassé avec 25% de résistance. Ain Taya et Sidi Fredj ont montré une résistance de 20% chacune et enfin Kheloufi et Sirène 2 ont présentait une faible résistance avec des valeurs inférieurs à 10% (9,9% et 9,5% respectivement).

Concernant la **Doxycycline**, toutes les souches isolées du Colonel Abbes et Ain Taya sont résistantes à 100%. 90% pour Sirène 2, suivit par Kheloufi et Bateau Cassé et Sidi Fredj avec une résistance de 68%, 43% et 40% respectivement.

Les souches bactériennes résistantes à la **Doxycycline** peuvent présenter des mutations dans le gène « TétM », qui code pour une protéine qui se lie au ribosome et modifie sa conformation, empêchant ainsi sa fixation.

Pour Triméthoprime (TMP) seulement 13,5% des souches sont résistantes. Pour la **Triméthoprime Sulfamethoxazole (SXT)**, une forte résistance est remarquée (77,5%), toutes les souches de Kheloufi et Ain Taya sont résistantes à 100%. 88% de résistance au niveau de la Sirène 2, et 83% au niveau de Bateau Cassé et 60% à sidi Fredj. En revanche, seulement 11,1% des souches sont résistantes à Colonel Abbes. Les souches qui présentent une résistance à cet antibiotique ont souvent des mutations dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide folique.

Pour la clindamycine 90% de souches de Colonel Abbes et de Kheloufi sont résistantes, suivi par Bateau Cassé, Ain Taya, Sirène 2 et Sidi Fredj avec 86% ,78%, 70% et 60% respectivement.

Pour les céphalosporines **Céfazoline (CZ)**, **Céfotaxime (CTX)**, **Ceftazidime (CAZ)**, la résistance est respectivement comme suit : 95,1%, 85% et 91,2%. Toutes les souches de Colonel Abbes et de Sidi Fredj sont résistantes, 90% à Kheloufi, 81% à bateau cassé et enfin 50% à Ain Taya.

RESULTATS ET DISCUSSION

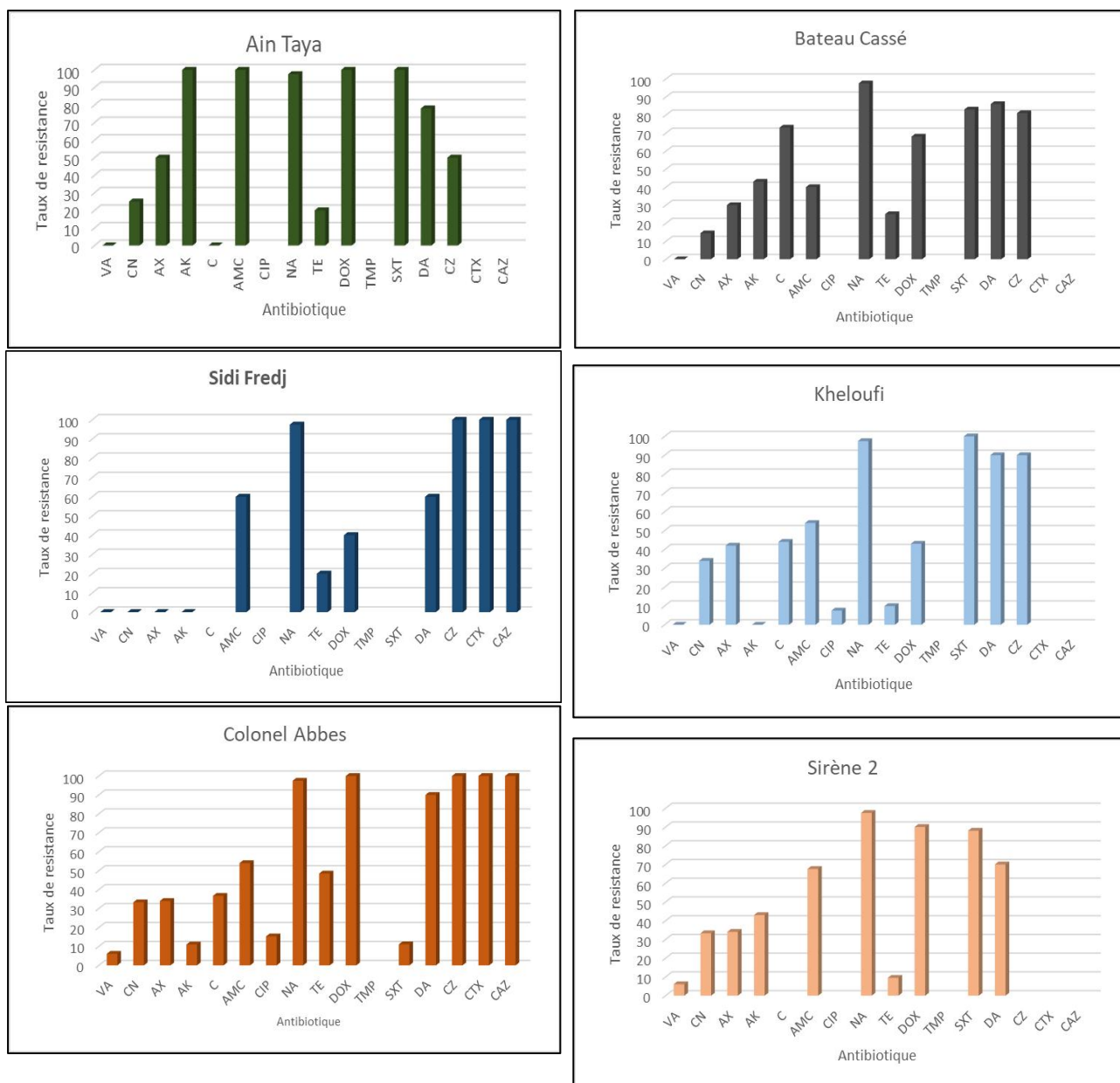


Figure 39: Résultats de l'antibiorésistance par site.

Selon la figure (39) et en comparant nos résultats à ceux de l'étude de (Maameri et al., 2024), nous avons remarquées une similitude au niveau de la résistance à l'Acide nalidixique et à la Céfotazidime qui avoisine les 100% car les entérocoques sont naturellement résistants à ces deux antibiotiques (résistance intrinsèque) et cette résistance est attribuable à l'expression de protéines de liaison à la pénicilline (PBP) de faible affinité. (Davis, et al., 2022).

Pour les Céphalosporines (CZ, CTX, CAZ), le taux de résistance est très élevé (>85 %), en comparant avec les résultats de (Maameri et al., 2024), nos résultats sont légèrement plus

élevés. Ces antibiotiques présentent une résistance naturelle chez toutes les espèces d'entérocoques, qu'elles soient d'origine clinique ou environnementale. (Bourdon 2011)

Contrairement à notre étude, (AGRANE, et al., 2023) ont trouvé une résistance très faible (14.28%) à la **Triméthoprim Sulfaméthoxazole** par rapport à nos résultats (77,5%).

L'association **Amoxicilline + Acide clavulanique** dans plusieurs plages (Ain Taya en tête) suggère que l'ajout d'acide clavulanique n'améliore pas la sensibilité de l'amoxicilline.

Au sein de la famille des quinolones, la **ciprofloxacine** présente une efficacité nettement supérieure à l'**Acide Nalidixique** avec respectivement 48,59% et 2,5% de sensibilité. Cette différence significative illustre l'évolution pharmacologique entre les générations de quinolones.

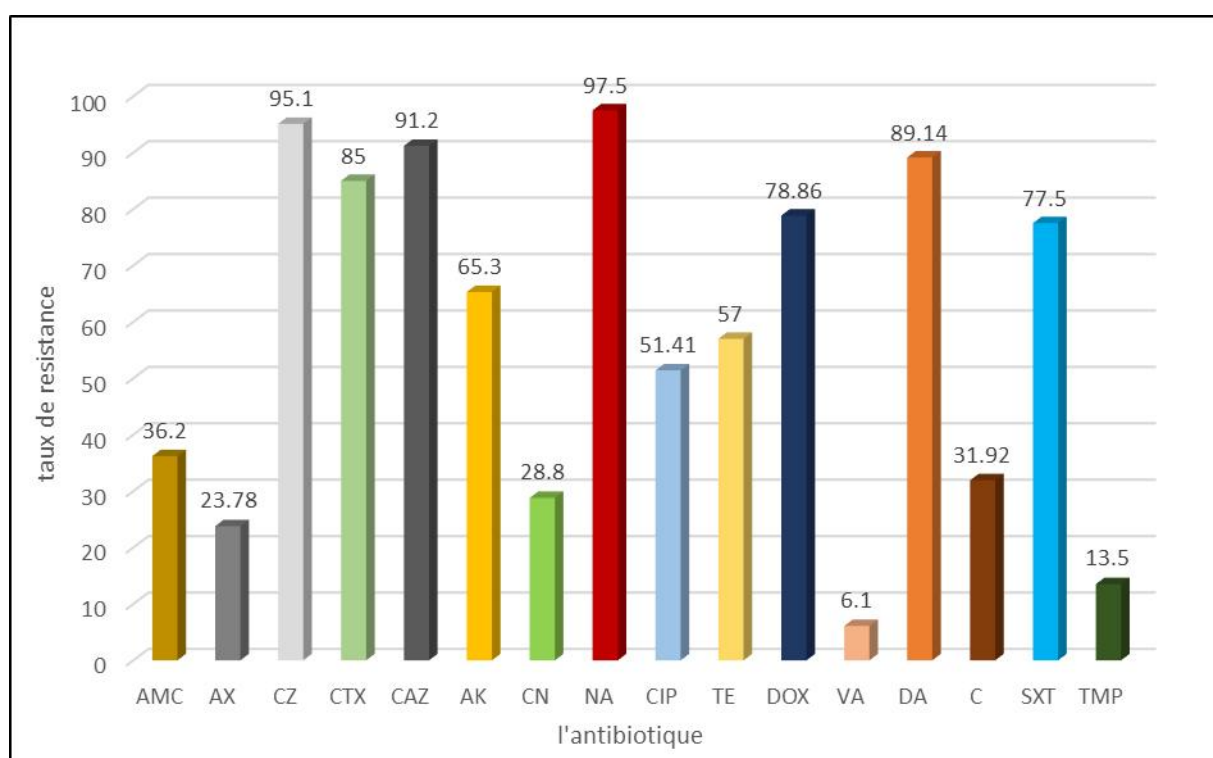


Figure 40: Résultat de l'antibiorésistance des souches isolées

III.4 Discussion générale

Bien que principalement associés au microbiote intestinal, les entérocoques sont régulièrement détectés dans l'eau de mer et les sédiments marins, témoignant de leur capacité à persister dans les milieux aquatiques. Leur présence constitue un indicateur essentiel de la

qualité microbiologique de l'eau et soulève des enjeux majeurs en matière de contamination fécale et de santé environnementale (Clausen et al., 1977 ; Edberg et al., 1997 ; OMS, 2000).

Dans les écosystèmes marins, leur détection met en évidence non seulement des risques sanitaires liés aux activités récréatives, mais aussi la possibilité de diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques dans les environnements aquatiques (Furlaneto-Maia et al., 2013).

L'ensemble des tests réalisés sur les 122 souches d'entérocoques marins ont mis en évidence une diversité phénotypique traduisant un potentiel adaptatif et une variabilité du pouvoir pathogène. L'analyse intégrée de ces résultats permet de mieux appréhender la capacité de ces souches à survivre, interagir ou persister dans les environnements côtiers.

Le test de coagulase a confirmé l'absence totale d'activité chez toutes les souches testées, en conformité avec la taxonomie du genre *Enterococcus*, connu pour être coagulase négatif (Joffin, et al., 1999). Cette caractéristique renforce l'identification bactérienne préliminaire et écarte toute confusion avec des staphylocoques pathogènes coagulase positifs.

En ce qui concerne la capacité à former des biofilms, 87,5 % des isolats se sont révélés positifs, bien que majoritairement de faible intensité (75 %). Cette capacité, bien que modérée, soulève des préoccupations sanitaires, car la formation de biofilm est reconnue pour accroître la résistance bactérienne aux antimicrobiens et favoriser la colonisation des surfaces (Richards) Richards et al., 2007).

Nos résultats sont quasiment similaires à ceux de Maameri et al. (2024), qui ont trouvé une prédominance des souches faiblement productrices (83 %).

Des résultats similaires sont rapportés également dans la thèse de Hannaoui (2021), où l'ensemble des 113 souches d'origine fécale testées formaient des biofilms, mais avec une intensité généralement faible à modérée.

Des recherches antérieures ont mis en évidence les effets bénéfiques des entérocoques dans les produits alimentaires, en particulier leur aptitude à produire des bactériocines, contribuant ainsi à prolonger la durée de conservation des aliments et à inhiber la croissance de bactéries indésirables (Rohaiem et al., 2016).

Concernant la production de bactériocines, seuls 9,83 % des isolats ont montré une activité inhibitrice contre *Pseudomonas aeruginosa* marine, et aucune n'a présenté d'effet sur une

souche clinique. Ce résultat suggère une spécificité écologique de l'activité antibactérienne, probablement limitée aux bactéries partageant le même environnement.

Bien que ce phénomène demeure relativement rare, il concorde avec d'autres études montrant que la production de bactériocines — notamment les entérocoques de classe IIa — est généralement limitée à certaines souches, en particulier *Enterococcus faecium*, avec une activité ciblée contre *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*.

Ces observations rejoignent celles de nombreux auteurs ayant mis en évidence la capacité de souches d'*Enterococcus*, notamment *E. faecium*, à produire des entérocoques actifs contre une large variété de microorganismes pathogènes. À titre d'exemple, Rivas et al. (2012) ont montré que des souches d'*E. faecium* isolées du lait de brebis exerçaient un effet antagoniste sur *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

De nombreuses autres études corroborent également l'activité antagoniste des souches d'*Enterococcus*, en particulier *E. faecalis* et *E. faecium*, contre divers pathogènes. (**Ben Belkacem et al., 2010 ; Garcia-Cano et al., 2014 ; Huang et al., 2016 ; Rehaiem et al., 2016 ; Aspri et al., 2017 ; Hwanhlem et al., 2017 ; Perumal et Venkatesan, 2017**)

Sur le plan de l'hémolyse, 71 % des souches se sont révélées non hémolytiques, traduisant un pouvoir pathogène a priori limité. Toutefois, la présence de 25 % de souches β -hémolytiques est préoccupante, car ce phénotype est associé à la production de toxines et d'enzymes favorisant la lyse cellulaire. La présence de 4 % de souches α -hémolytiques, bien que moins alarmante, confirme que certaines souches d'entérocoques peuvent exprimer des facteurs cytotoxiques subtils, à ne pas négliger dans un contexte de surveillance.

La résistance aux antibiotiques constitue un enjeu majeur de santé publique, notamment dans le traitement des infections à entérocoques chez les patients immunodéprimés (**Kayser, 2003**). Parmi ces résistances, celle aux glycopeptides — et en particulier à la vancomycine — suscite une préoccupation croissante en microbiologie clinique. Dans notre étude, nous avons constaté un taux relativement faible de résistance à la vancomycine, s'élevant à 6,1 %.

Plusieurs études ont toutefois signalé l'émergence de souches entérocoques résistantes à la vancomycine dans différents types d'aliments (**Robredo et al., 2000 ; Valenzuela et al., 2008 ; Koluman et al., 2009 ; Lopez et al., 2009 ; Yilmaz et al., 2016**). Cette apparition est souvent liée à l'usage intensif de l'avoparcine — un promoteur de croissance utilisé en élevage — qui favoriserait la sélection de souches résistantes, ensuite transmises à l'humain par le biais de la chaîne alimentaire (**Koluman et al., 2009**).

En somme, les résultats obtenus révèlent que même dans un environnement marin naturel, les entérocoques peuvent présenter un profil virulent complexe, combinant parfois plusieurs facteurs (biofilm, hémolyse, bactériocines). Cela souligne l'importance d'une surveillance continue de ces bactéries dans les écosystèmes côtiers, en particulier à des fins de biosécurité et de gestion des risques liés à la contamination de la chaîne alimentaire marine. Des investigations complémentaires, notamment moléculaires, s'avèrent nécessaires pour évaluer la présence de gènes de virulence et de résistance afin de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs mis en jeu.

Dans notre étude portant sur 122 souches d'entérocoques isolées des plages algériennes, révèle une situation préoccupante avec l'identification de souches hypervirulentes présentant simultanément une multirésistance aux antibiotiques, une production de biofilm (faible, moyenne et forte) et une activité hémolytique (α et β). L'analyse détaillée de 33 souches représentatives montre que trois isolats (S95, S62, GENTA 10-1) présentent une triple virulence critique, avec notamment la souche S95 qui manifeste une résistance totale aux 8 antibiotiques testés (Acide nalidixique ; Cefazoline ; Doxycycline ; Ceftazidime ; Clindamycine ; AMC ; Cefotaxime ; Triméthoprim Sulfaméthoxazole) associée à une production maximale de biofilm (+++) et une β -hémolyse. Au total, 21% des souches caractérisées (7/33) combinent ces trois facteurs de pathogénicité, suggérant la présence d'environ 11 à 25 souches hypervirulentes dans la population totale étudiée. Cette prévalence élevée de souches à triple virulence, avec une résistance universelle observée pour l'amoxicilline/acide clavulanique et la céfazoline, et une prédominance de l'activité β -hémolytique par rapport à l' α -hémolytique, souligne l'émergence d'entérocoques marins constituant de véritables défis thérapeutiques et représentant un risque potentiel pour la santé publique en cas de dissémination dans l'environnement côtier.

CONCLUSION

Conclusion

Cette recherche visait principalement à mesurer la virulence des entérocoques marins prélevés de différentes régions côtières d'Algérie, exposées à divers degrés d'impact humain.

Les analyses microbiologiques ont permis de caractériser plusieurs facteurs de virulence chez un total de 122 souches d'Enterococcus. Les résultats obtenus ont montré que seules 5,93 % des souches étaient capables d'exprimer une hémolyse β , traduisant un pouvoir pathogène élevé. La plupart des souches ont montré une hémolyse α ou γ , signalant une virulence de faible à modérée.

La production de coagulase était rare, ce qui suggère une faible implication de ce facteur dans la pathogénicité des souches marines étudiées. Par ailleurs, une proportion modérée de souches a montré une capacité à former des biofilms, un facteur important dans la colonisation des surfaces et la persistance environnementale.

L'étude de l'activité bactériocinogène a mis en évidence la capacité de certaines souches à inhiber des microorganismes pathogènes, suggérant un potentiel intérêt biotechnologique de ces entérocoques en tant qu'agents antimicrobiens naturels.

Concernant l'antibiorésistance, les résultats ont révélé une résistance particulièrement élevée à l'acide nalidixique, suivie de taux variables pour d'autres antibiotiques, soulignant la nécessité d'une surveillance continue des souches environnementales.

Au terme de ce travail, les entérocoques marins ont pu être classés en souches faiblement à partiellement virulentes. Certaines de ces souches pourraient présenter un intérêt potentiel dans des applications industrielles ou alimentaires, notamment grâce à leur activité bactériocinogène.

En perspective, des analyses plus approfondies par des techniques moléculaires s'avèrent nécessaires pour confirmer les gènes de virulence et de résistance, et explorer leur éventuelle activité antagoniste contre d'autres pathogènes d'origine marine ou humaine.

En conclusion, cette étude met en évidence l'importance d'une surveillance microbiologique ciblée des entérocoques dans les milieux marins, en particulier dans les zones côtières exposées aux pollutions humaines. Cela permettrait de mieux anticiper les risques pour la santé publique et de mettre en place des stratégies de gestion visant à limiter la dissémination des souches virulentes ou résistantes dans l'environnement marin.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abele-Horn, M., Vogel, U., Klare, I., Konstabel, C., Trabold, R., Kurihara, R., Witte, W., Kreth, W., & Schlegel, P.-G. (2006).** Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci: comparison of PFGE, MLST and MLVA typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 4009–4013.
- **Acharya, T. (2021).** *Nisseria gonorrhoeae* (Gonococcus). *Bacteriology*, 20, p. 223. Agrane, Chanez, Akhemoum and Nadia, Akhmoum. (2023). Prévalence et caractérisation phénotypique (facteurs de. Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi -Ouzou.
- **Aguilar-Galvez, A. (2012).** Enterococcus: General aspects. *In Encyclopedia of food safety*,.
- **Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonne, F. (2002).** In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Research in Microbiology*, 153, pp. 75-80.
- **Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012).** The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), pp. 266–278.
- **Bambeke, Van and P., Tulkens. (2008).** *Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse : Antibiotiques et Antifongiques*. Bruxelles: s.n..
 - **Barefoot, S.F and Klaenhammer, T.R. (1983).** Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- **Ben Omar, N., & Abriouel, H. (2004).** Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of health-promoting compounds. *In Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 96, pp. 365S-377S.
- **Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., Hammerschmidt, S. (2004).** Characterization of plasmid oge binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian Journal Medicine Residency Supply*, 119, pp. 29-32.
- **Bohatic, M., Butorac, A., Đermanić, A., Zgomba Maksimović, M., & Bošnjak, I. (2019).** Prevalence and virulence traits of *Enterococcus* spp. isolated from ready-to-eat seafood. *Frontiers in Microbiology*, 10, 728. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00728>.
- **Boufafa, M., Kadri, S., Redder, P., & Bensouilah, M. (2021).** Occurrence and distribution of fecal indicators and pathogenic bacteria in seawater and *Perna perna* mussels in the Gulf of Annaba (Southern Mediterranean). *Environmental Science and Pollution Re*.
- **Bourdon, N. (2011).** Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques en France. Caen: Elsevier Masson SAS, Paris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Boussouar, N. (2017).** Technologique sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle. Thèse de doctorat, en microbiologie, université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen. Tlemcen: s.n., p. 18.
- **Boyce, J. M., Opal, S. M., PotterBynoe, G., LaForge, R. G., Zervos, M. J., Furtado, G., Victor, G., & Medeiros, A. A. (1992).** Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(5), pp. 1032–10.
- **Braiek, O. B., Smaoui, S. (2019).** Entérocoques : entre pathogènes émergents. 2019.
- **Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012).** Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), pp. 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>.
- **Carip, C., Salavert, H., Tandeau, A. (2015).** Microbiologie, hygiène et droit alimentaire, manuel, 2ème édition. Lavoisier, pp. 107-109.
- **Casadevall, A., Pirofski, L. (2001).** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *Journal Infection Disease*, 184, pp. 337-344.
- **Chajeka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Łaniewsk, A., Trokenheim, L. (2017).** Virulence factors of Enterococcus spp. Presented in food. *LWT Food Science and Technology*, 75, pp. 670-676.
- **Champagne, C., Mollgaard, H. (2018).** Production of probiotic cultures and addition in fermented foods. *Fermented functional foods, 2nd edition*, pp. 71-88.
- **Chandler, J.R., Hirt, H., Dunny, G.M. (2005).** A Paracrine Peptide Sex Pheromone Also Acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 43.
- **Chuang-Smith, O. N., Wells, C. L., Henry-Stanley, M. J., Dunny, G. M., et al. (2010).** Acceleration of Enterococcus faecalis Biofilm Formation by Aggregation Substance Expression in an Ex Vivo Model of Cardiac Valve Colonization. *Public Library of Science one*.
- **CLSI. (2023).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed.
- **Cynthia M and Khan B.A. (2008).** *Le manuel du vétérinaire Merck*. France: s.n..
- **Davis, Benjamin C., et al. (2022).** Towards the standardization of Enterococcus culture methods for waterborne antibiotic resistance monitoring: A critical review of trends across studies.
- **De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks, L.M. (2005).** Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by Enterococcus mundtii ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 105(3), pp. 433-44.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Del Papa, M., Hancock, L., Thomas, V., Perego, M. (2007).** Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal Bacteriology*, 189 (24), pp. 8835-8843.
- **Dortu, C., Huch, M., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2009).** Enterococci. In *Probiotic*.
- **Douarche, C., Bailleux, V., Even, C., Allain, J., Regeard, C., Raspaud, E. (2018).** La mécanique des biofilms à la surface de liquides. *Reflets de la Physique*, 77, pp. 114-115.
- **Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Bierne, H. (2005).** Sorting Sortases: A nomenclature proposal for the various sortases of Gram positive bacteria. *Research in Microbiology*, 156, pp. 289-297.
- **Fiore, E., Van Tyne, D., Gilmore, M. S. (2019).** Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology Spectrum*, 7, 4.
- **Foulqui Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006).** The role and application Enterococci in food and health. *International of Food Microbiology*, 106, pp. 1-24.
- **Garvie, E. I., Farrow, J. A., Phillips, B. A., & Collins, M. D. (1981).** The genus.
- **Giri, D. (2018).** Coagulase Test : Types, principle, procedure, interpretation and examples.
- **Guiraud, J. P and Rosec, J. P. (2004).** *Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire (2e éd.)*. Paris, France: s.n..
- **Haas, F, L. (1999).** Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry. [Online] 1999. <https://doi.org/10.1136/jnnp.67.5.578>.
- **Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A.K., Wullt, B., Svanborg, C. (2008).** Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, pp. 217–240.
- **Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. (2018).** The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1791.
- **Hannaoui, imane. (2021).** Étude des mécanismes de résistance et de virulence chez les entérocoques résistants aux glycopéptides. Thèse de doctorat, l'Institut Pasteur du Maroc (IPM).
- **Harrison, F., Roberts, A. E. L., Gabriliska, R., Rumbaugh, K. P., Lee, C., & Diggle, S. P. (2015).** A 1,000-Year-Old Antimicrobial Remedy with Antistaphylococcal Activity. *mBio*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.01129-15>.
- **Higashide, T. et al. (2005).** Endophthalmitis caused by *enterococcus mundtii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), pp. 1475–1476.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Huycke, F, Sahm D. and S, Gilmore M. (1998).** The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), pp. 1128-1132.
- **Jahan, M., Holley, R. A. (2014).** Incidence des facteurs de virulence chez les entérocoques de la viande crue et fermentée et capacité de formation de biofilm à 25°C et 37°C. *Tourillon International de Microbiologie Alimentaire*, 170, pp. 65-69.
- **Jett, B., Huycke, M., Gilmore, M. (1994).** Virulence of enterococci. *Clinic Microbiology Review*, 7 (4), pp. 462-478.
- **Joffin, N and Joffin, P. (1999).** *Microbiologie alimentaire : notions générales, microorganismes d'intérêt*. Paris, France: s.n. *Microbiologie générale (3e éd.)*. Paris: Dunod.
- **Kayaoglu, G., Qrstavik, D. (2004).** Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews Oral Biology Medicine*, 15, (5), pp. 308-320.
- **Kayser, F. H. (2003).** Safety aspects of Enterococci from the medical point of view
- **Koneman, E. W., et al. (1997).** *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. s.l. : Lippincott-Raven Publishers. Vol. 5.
- **Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. (2017).** Ciblage microbien biofilms: Stratégies thérapeutiques actuelles et prospectives. *Nature Review Microbiology*, 15 (12), pp. 740-755.
- **Kühn, S. (2000).** Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. *Int J Antimicrob Agents*.
- **Landecker, H. (2021).** La résistance aux antibiotiques et la biologie de l'Histoire. *Revue*.
- **LeBlanc, D. J. (2006).** Enterococci in foods: A conundrum for food safety. *International*.
- **Leclercq, R. and Vincent Cattoir. (2005).** *Les entérocoques résistants aux glycopéptides : situation en France en 2005*. Caen: s.n..
- **Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009).** Taxonomic outline of the phylum.
- **Lukasova, J. and Sustackov, A. A. (2003).** Enterococci and antibiotic resistance.
- **Maameri et al. (2024).** Caractérisation et évaluation de la virulence et de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques isolés dans le milieu marin.
- **MacFaddin. (2000).** *Biochemical tests for identification of medical bacteria (3rd ed.)*. Lippincott Williams & Wilkins.
- **Manero A. & Blanch A. (1999).** Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10), pp. 4425-4430.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Marcinek H. (1998).** Enterococcus faecalis gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants.
- **Martin, E. C. (2019).** La résistance aux antibiotiques. *Planet-Vie*.
- **Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M. (2000).** Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 13(4), pp. 513-22.
- **Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016).** *Medical Microbiology (8th ed.)*. Elsevier Health Sciences.
- **Muylaert A., Mainil J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 156, 110.
- **Nallapareddy S.R., Singh K.V., Murray B.E. (2006).** Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding acm gene of poorly transformable clinical Enterococcus faecium strains. *Appl Environ Microbiol*, pp. 334-45.
- **Patel, R., Piper, K. E., Rouse, M. S., Steckelberg, J. M., & Kohner, P. (1998).** Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile Enterococcus gallinarum isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3399–3407.
- **Petts, D. N. (1984).** Colistin oxolinic acid blood agar: A new selective medium for streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(1), pp. 4–7.
<https://doi.org/10.1128/JCM.19.1.47.1984>.
- **Philippe Bouvet, et al. (2022).** La résistance aux antibiotiques. *HAL. science*.
- **Plesiat, P. (2012).** CHAPITRE 02 : biochimie de la résistance. In Courvalin, R. et Leclercq, R., Antibiogramme. 3ème Édition
- **Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., & Carter, G. R. (2002).** *Clinical veterinary microbiology (1st ed.)*. Mosby Elsevier Science.
- **Rahimi, N., Poursina, F., Ghaziasgar, F.S., Sepehrpor, S., Hassanzadeh, A. (2018).** Présence de gènes de facteurs de virulence (gelE et esp) et formation de biofilms chez Enterococcus faecalis et Enterococcus faecium cliniques isolées d'une infection des voies urinaires à Ispahan, Iran. *Rapports génétiques*, pp. 72-75.
- **Rice, L. B., Carias, L., Rudin, S., Vael, C., Goossens, H., Konstabel, C. (2003).** A potential virulence gene, hylefm, predominates in Enterococcus Faecium of Clinical Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 187 (3), pp. 508–512.
- **Richards, J. J., Melander, C., & Cavanagh, J. (2007).** Small molecule inhibitors of bacterial biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), pp. 269–276.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ruhal, R., Kataria, R. (2021).** Modèles de biofilm chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. *Recherche Microbiologique*, 251, pp. 126-829.
- **Sava, I. G., Heikens, E., Huebner, J. (2010).** Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, pp. 533-540.
- **Schleifer, K., Kilpper-Bälz, R. (1984).** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
- **Semedo, T., Santos, M. A., Lopes, M. F., Marque, J. J. F., Crespo, M. T., Tenreiro, R. (2003).** Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus *Systematic and applied Microbiology*, 26, pp. 13-22.
- **Skals, M., Praetorius, H. A. (2013).** Mechanisms of cytolysin induced cell damage a role for auto and paracrine signalling. *Acta Physiologica*, 209 (2), pp. 95-113.
- **Slanetz, L. W and Bartley, C. H. (1957).** Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology*, 74(5), pp. 591–595.
- **Strateva, T., Atanasova, D., Savov, E., Petrova, G., Mitov, I. (2016).** Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 20(2), pp. 127–133.
- **Stucki, K., Harbarth, S., Nendaz, M. (2014).** Infections à entérocoques: du plus simple au plus complexe. *Revue Médicale Suisse*, 10, pp. 1918-1923.
- **Thiercelin, T. (1899).** Sur les entérocoques. *Annales de l'Institut Pasteur*, 13, pp. 113-122.
- **Ullah, Md Ashek, et al. (2023).** Resistance Profiles and Virulence Determinants in Biofilm-Forming *Enterococcus faecium* Isolated from Raw Seafood in Bangladesh.
- **Upadhayaya, P. M. G., Ravikumar, K., Umapathy, B. L. (2009).** Revue des facteurs de virulence des entérocoques : un pathogène nosocomial émergent. *Journal Indien de Microbiologie Médicale*, 27(4), pp. 301-305.
- **Van den Berghe, E., De Winter, T., & De Vuyst, L. (2006).** Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion.
- **Woźniak-Biel, A., Bugła-Płoskońska, G., Burdzy, J., Korzekwa, K., Ploch, S., & Wieliczko, A. (2019).** Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Humans and Turkeys in Poland. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Yamashita, H., Tomita H, Inoue T, Ike Y. (2002).** Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), pp. 4352-60.
- **Yamashita, H., Tomita H, Inoue T, Ike Y. (2011).** Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), pp. 4352-60.

ANNEXES

tableau 1 : profil de virulence des souches

Souche	Bio film	Hémolyse	Bactériocine	Coagulase
S4SM	+	β	+	-
TETRA 10-2	+++	γ	-	-
GENTA 10-1	+++	α	-	-
GENTA 10-2	++	α	-	-
S5	+++	γ	-	-
S6	+	β	-	-
S7	+	ν	+	-
S8	+++	γ	-	-
S9	+	α	+	-
S10	+	ν	-	-
S11	+	α	-	-
S12	+	ν	+	-
S13	+	β	-	-
S14	+	γ	-	-
S15	-	γ	-	-
S16	+	γ	-	-
S17	+	γ	-	-
S18	+	γ	-	-
S19	+	γ	+	-
S20	++	α	-	-
S21	+	ν	-	-
S22	+	β	-	-
S23	+	ν	-	-
S24	+	γ	+	-
S25	-	γ	-	-
S26	+	γ	-	-
S27	+	γ	-	-
S28	+	γ	+	-
S29	+	γ	-	-
S30	+	β	-	-
S31	+	ν	-	-
S32	+	γ	-	-
S33	+	γ	-	-
S34	+	β	-	-
S35	+	α	-	-
S36	+	γ	-	-
S37	+	β	-	-
S38	+	ν	-	-
S39	+	ν	-	-
S40	+	β	-	-
S41	+	γ	-	-
S42	-	ν	+	-
S43	+	β	-	-
S44	+	γ	+	-
S45	+	γ	-	-
S46	+	γ	-	-
S47	+	γ	+	-
S48	+	γ	-	-
S49	-	β	+	-
S50	+	γ	-	-
S51	-	ν	-	-
S52	+	β	-	-
S53	+	γ	-	-
S54	-	ν	-	-
S55	+	β	-	-
S56	+	ν	-	-
S57	+++	ν	-	-

Souche	Bio film	Hémolyse	Bactériocine	Coagulase
S58	++	β	-	-
S59	+	γ	-	-
S60	+	β	+	-
S61	+	β	-	-
S62	+++	β	+	-
S63	+	γ	-	-
S64	+	γ	-	-
S65	+	γ	-	-
S66	+	β	-	-
S67	+	γ	-	-
S68	+	γ	+	-
S69	+	γ	-	-
S70	+	γ	-	-
S71	+	γ	-	-
S72	+	γ	-	-
S73	+	γ	-	-
S74	+	β	-	-
S75	++	β	-	-
S76	+	γ	-	-
S77	+	γ	-	-
S78	+	γ	-	-
S79	+	γ	-	-
S80	-	γ	-	-
S81	+	γ	-	-
S82	+	γ	-	-
S83	+	γ	+	-
S84	+	γ	-	-
S85	-	γ	-	-
S86	+	γ	+	-
S87	+	β	-	-
S88	+	β	-	-
S89	+	γ	-	-
S90	+	β	-	-
S91	-	γ	-	-
S92	+++	γ	-	-
S93	+	β	-	-
S94	+	γ	+	-
S95	+++	β	-	-
S96	+	β	+	-
S97	++	γ	-	-
S98	-	β	-	-
S99	-	β	-	-
S100	+	β	-	-
S101	+	β	+	-
S102	+	γ	-	-
S103	+	γ	-	-
S104	+	γ	-	-
S105	+	β	-	-
S106	+	γ	-	-
S107	+	γ	-	-
S108	-	γ	+	-
S109	+	γ	+	-
S110	+	β	-	-
S111	+	γ	-	-
S112	+	γ	+	-
S113	+++	γ	-	-
S114	-	γ	-	-
S115	-	γ	-	-
S116	+	γ	-	-
S117	++	γ	-	-
S118	+	γ	-	-
S119	+	γ	-	-
S120	+	γ	-	-
S121	+	γ	-	-
S122	-	γ	-	-

Tableau 2 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibitions. (CLSI-2027/2020 et CASFM 2023)

Antibiotiques	Diamètre critique (mm)		
	S	I	R
Amoxiclave	≥ 10	8--9	< 8
Amoxycilline	≥ 10	8--9	< 8
Cefazoline	≥ 23	20-22	≤ 19
Cefotaxime	≥ 26	23-25	≤ 22
Ceftazidime	≥ 18	15-17	≤ 14
Amikacine	≥ 18	/	≤ 16
Gentamicine	≥ 15	13-14	≤ 12
Acide nalidixique	≥ 19	14-18	≤ 13
Ciprofloxacine	≥ 21	16-20	≤ 15
Tetracycline	≥ 19	15-18	≤ 14
Doxycycline	≥ 19	15-18	≤ 14
Vancomycine	≥ 17	15-16	≤ 14
Clindamycine	≥ 21	15-20	≤ 14
Chloramphénicol	≥ 18	13-17	≤ 12
Triméthoprim Sulfamethoxazole	≥ 23	/	< 23
Triméthoprim	16	11_15	10

Les milieux de culture utilisées :

Bouillon BHIB
Milieu Slanetz et Bartley
Milieu BEA
Bouillon Rothe
Bouillon Eva Litsky
Milieu MRS
Milieu Muller-Hinton
Milieu Columbia

Les produits utilisés :

Violet de gentiane
Lugol
Alcool
Fuchsine
L'eau oxygénée
Réactif oxydase
PBS
Ethanol
Plasma de lapin
NaOH
Huile de vaseline stérile
Eau physiologique
Huile de paraffine
Réactif de Kovacs

Matériel utilisé :

Anse de platine
Microscope
Lame et lamelle
Microplaque
Micropipette
Spectrophotomètre
Tubes à essais
Boîtes de pétri
Ecouvillon
L'eau distillée
Pipette pasteur
Filtres
Spatule
Verrerie

Tableau 3 : profile de virulence des entérocoques dans les plages

Plage	Nombre de souches	Biofilm+ (%)	Hémolyse+ (%)	Bactériocine+ (%)	Coagulase+ (%)
Colonel Abbès	20	85	10	40	0
Kheloufi	22	77	5	36	0
Sirène	25	92	20	52	0
Sidi Fredj	18	78	0	28	0
Bateau Cassé	21	81	14	43	0
Aïn Taya	16	75	6	31	0

Tableau4: l'antibioresistances des 122 souches

Souche	Acide nalidixique		Ciprofloxacine		Tetracycline		Doxycycline	
	Diametre	Interpretation	Diametre	Interpretation	Diametre	Interpretation	Diametre	Interpretation
S45M	0.4	R	2.8	S	2	S	1	R
TETRA 10-2	0.6	R	1.5	R	1.9	S	0.9	R
GENTA 10-1	0.9	R	2.6	S	2.2	S	2.1	S
GENTA 10-2	0.5	R	2.8	S	1.4	R	1.1	R
S5	1	R	3	S	2	S	1.2	R
S6	1	R	2.9	S	2.1	S	1	R
S7	0.9	R	1.1	R	1.9	S	0.6	R
S8	0.8	R	1	R	2	S	0.9	R
S9	0.7	R	3	S	2	S	0.2	R
S10	0.3	R	2.7	S	1.9	S	1	R
S11	0.4	R	2.6	S	1.2	R	2.2	S
S12	9.7	R	2.7	S	2	S	0.9	R
S13	1	R	1.6	I	2.2	S	0.4	R
S14	1.9	S	2.3	S	2.5	S	1.2	R
S15	1.1	R	2.1	S	1.9	S	0.5	R
S16	0.4	R	2.7	S	2.1	S	0	R
S17	1.2	R	2.2	S	2.5	S	0.2	R
S18	0.4	R	2.4	S	2.4	S	0.4	R
S19	0.6	R	2.3	S	1	R	0.8	R
S20	0.9	R	2.2	S	1.4	R	1	R
S21	0.5	R	3	S	2.4	S	0.8	R
S22	1	R	3.2	R	2.4	S	0.3	R
S23	1	R	1	R	2	S	0.9	R
S24	0.9	R	0.9	R	1.9	S	0.2	R
S25	0.8	R	2.9	S	2.1	S	0.1	R
S26	0.7	R	3	S	1.3	R	0.4	R
S27	0.3	R	3.1	S	1	R	0.5	R
S28	0.4	R	0.9	R	1.2	R	0.3	R
S29	9.7	R	2.4	S	2	S	2.3	S
S30	1	R	2.6	S	1	R	1	R
S31	1	R	2.5	S	1.9	S	2.2	R
S32	0.6	R	2.6	S	2	S	0.9	R
S33	0.9	R	2.1	S	2.2	S	2.3	S
S34	0.8	R	1.2	S	1	R	1.2	R
S35	0.7	R	2.3	S	2	S	0.5	R
S36	0.6	R	2.5	S	1.1	R	0	R
S37	0.5	R	2.7	S	2	S	2	S
S38	1.2	R	2.8	S	1.2	R	0.4	R
S39	1	R	2.9	S	1.9	S	0.8	R
S40	0.9	R	2.8	S	2	S	1	R
S41	0.8	R	2.7	S	1	R	2.2	S
S42	0.4	R	2.8	S	2.2	S	0.3	R
S43	0.2	R	2.3	I	2.3	R	0.9	R
S44	0	R	2.9	S	2	S	0.2	R
S45	0.2	R	2.4	I	2.1	S	1	R
S46	1	R	3	S	2.4	S	0.4	R
S47	0.2	R	3.4	S	2	S	0.5	R
S48	0.4	R	2.8	S	2	S	0.3	R
S49	1	R	3	S	0.9	R	2.2	S
S50	1	R	3	S	1.9	S	1	R
S51	0.6	R	2.8	S	2	S	2.2	R
S52	0.9	R	2.9	S	2.2	S	0.9	R
S53	0.8	R	2.8	S	2.6	S	2.3	R
S54	0.7	R	2.7	S	2.3	S	1.2	R
S55	0.6	R	2.8	S	0.8	R	0.5	R
S56	0.5	R	3	S	1	R	0	R
S57	1.2	R	2.9	S	2	S	1.2	R
S58	1	R	3.4	S	2.2	S	0.5	R
S59	0.9	R	2.5	I	2.5	S	0	R
S60	0.8	R	3	S	1.9	S	0.2	R
S61	0.4	S	3	S	2.1	S	0.4	R
S62	0.2	R	2.8	S	2.5	S	0.8	R
S63	0	R	2.9	S	2.4	S	1	R
S64	0.2	R	2.8	S	2	S	0.8	R
S65	1	R	2.7	S	2.2	S	0.3	R
S66	0.2	R	2.8	S	2.6	S	0.9	R
S67	0.4	R	2.8	S	2.3	S	0.2	R
S68	1.1	R	2.9	S	2	S	1	R
S69	0.4	R	2.8	S	0.9	R	0.4	R
S70	1.2	R	2.7	S	2.1	S	0.5	R
S71	0.4	R	2.8	S	2.5	S	0.3	R
S72	0.6	R	2.9	S	2.4	R	1.1	R
S73	0.9	R	2.6	S	1.4	R	1.2	R
S74	0.5	R	2.8	S	2.2	S	1	R
S75	1	R	3	S	0.9	R	2.2	S
S76	1	R	2.9	S	0.8	R	0.9	R
S77	0.9	R	3	S	2	S	0.2	R
S78	0.8	R	3.2	S	0.9	R	1	R
S79	0.7	R	1.8	S	1.9	S	0.9	R
S80	0.3	R	1.7	S	0.7	R	2.3	S
S81	0.4	R	2	R	2	S	1	R
S82	9.7	R	3	S	0.9	R	0.9	R
S83	1	R	3.2	S	2.1	S	0.4	R
S84	1	R	3.3	S	2.4	S	0.3	R
S85	0.6	S	1.9	S	2	S	0.9	R
S86	0.9	R	2.3	I	0.4	R	0.2	R
S87	0.8	R	1	R	2	S	1	R
S88	0.7	R	2.2	I	1.9	S	0.4	R
S89	0.6	R	2.9	S	1	R	2.2	S
S90	0.4	R	2.7	S	1.1	R	0.3	R
S91	0.6	R	2.8	S	1.8	S	1.1	S
S92	0.9	R	2.6	S	1.9	S	1.2	R
S93	0.5	R	3	S	2	S	1	R
S94	1	R	3.4	S	1	R	1.1	R
S95	1	R	2.8	S	2	S	1.2	R
S96	0.9	R	3	S	1.2	R	1	R
S97	0.8	R	3	S	2.1	S	0.6	R
S98	0.7	R	2.8	S	2.2	S	0.9	R
S99	0.3	R	2.9	S	2	S	0.2	R
S100	0.4	R	2.8	S	2.4	S	1	R
S101	9.7	R	2.7	S	0.9	R	0.4	R
S102	1	R	2.8	S	2	S	0.8	R
S103	1	R	2.2	S	2	S	1	R
S104	1.1	R	2.3	S	1.1	R	0.8	R
S105	0.4	R	2.4	S	1	R	0.3	R
S106	1.2	R	2.8	S	0.9	R	0.9	R
S107	0.4	R	2.7	S	1.9	S	0.2	R
S108	0.6	R	2.8	S	2	S	1	R
S109	0.9	R	2.5	S	0.6	R	0.4	R
S110	0.9	R	2.6	S	2	S	0.5	R
S111	0.8	R	2.8	S	2.1	S	0.3	R
S112	0.7	R	2.3	S	0.3	R	1.1	R
S113	0.3	R	2.1	S	2	S	1.2	R
S114	0.4	R	2.2	S	2.1	S	1	R
S115	9.7	R	2.3	S	0.9	R	0.8	R
S116	1	R	2	I	2	S	1	R
S117	1	S	2.8	S	2.4	S	0.8	R
S118	0.6	R	2.7	S	2.2	S	0.3	R
S119	0.9	R	2	I	2.1	S	0.9	R
S120	0.8	R	2.2	S	2.5	S	0.2	R
S121	0.7	R	2.9	S	1	R	0.5	R
S122	0.6	R	1	R	0.8	R	0.4	R

Souche	Clindamycine		Chloramphénicol		Triméthoprime Sulfaméthoxazole		Triméthoprime	
	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation
S4SM	0.2	R	2	S	0.6	R	1.1	S
TETRA 10-2	0.1	R	1	R	0.5	R	1.3	S
GENTA 10-1	0	R	1.9	S	0.7	R	2	S
GENTA 10-2	0.5	R	1.8	S	1.9	S	S	S
S5	0.3	R	1.1	R	0.4	R	1.3	S
S6	1.2	S	1.9	S	1	R	1.4	R
S7	0.4	R	2	S	1.6	S	0	R
S8	0.3	R	1	R	0.9	R	1.1	S
S9	0.1	R	2.1	S	0.4	R	1.5	S
S10	0.2	R	2.4	S	2	S	1.8	S
S11	0	R	2	S	0.7	R	0	R
S12	0.3	R	2.5	S	0.4	R	1.3	S
S13	0.4	R	0.9	R	0.2	R	1	S
S14	0.2	R	0.5	R	0.8	R	1.2	S
S15	1.2	S	2.2	S	0.6	R	1.8	S
S16	0.2	R	0.9	R	1.9	S	1.4	S
S17	0.3	R	2	S	0.3	R	0.2	R
S18	0.3	R	2	S	0.4	R	0	R
S19	0.4	R	2.3	S	0.7	R	1.5	S
S20	0.1	R	1.1	R	1.6	R	S	S
S21	0	R	1.8	S	1.9	S	1.7	S
S22	0.4	R	2	S	0.2	R	0	R
S23	0.2	R	2.8	S	0.5	R	1.3	S
S24	0.4	R	1	R	0	R	1	S
S25	0	R	2.9	S	0.7	R	1.2	S
S26	0.4	R	2	S	0.9	R	1.8	S
S27	0.2	R	1	R	0.8	R	1.4	S
S28	0	R	1.9	S	0.4	R	0	R
S29	0.4	R	1.8	S	0.2	R	0	R
S30	0	R	2	S	1.9	S	0	R
S31	0.1	R	2.6	S	0.4	R	1	S
S32	0.3	R	2.3	S	0.5	R	1.2	S
S33	0.4	R	1	R	0.7	R	1.8	S
S34	0.4	R	2	S	0.8	R	1.4	S
S35	0.2	R	0.9	R	1.8	S	1.1	S
S36	0.1	R	0.8	R	0.6	R	1.3	S
S37	0	R	1.9	S	0.8	R	2	S
S38	0.2	R	1.8	S	0.9	R	2	S
S39	0	R	0.4	R	0.4	R	1.3	S
S40	0.3	R	2	S	2	S	1.4	S
S41	0.4	R	0.9	R	2.1	S	1.8	S
S42	0	R	0.5	R	2	S	1.4	S
S43	0.1	R	1.9	S	1.9	S	1.1	S
S44	0.2	R	1.8	S	1.8	S	1.3	S
S45	0	R	2	S	0.5	R	2	S
S46	0	R	2.6	S	2	S	2	S
S47	0.3	R	2.3	S	1.9	S	1.3	S
S48	0.1	R	2	S	1	R	1.4	S
S49	0	R	1	R	0.7	R	1.8	S
S50	0	R	1.1	R	0.4	R	1.4	S
S51	0.3	R	0.5	R	0.9	R	1.5	S
S52	0	R	2	S	0.4	R	1.6	S
S53	0.1	R	2.3	S	0.6	R	1.7	S
S54	0.1	R	2.2	S	0.2	R	1.4	S
S55	0.3	R	2.5	S	0.5	R	1.8	S
S56	0	R	0.5	R	0.9	R	1.4	S
S57	0.4	R	2	S	0.5	R	1.1	S
S58	0.3	R	2.4	S	0.7	R	1.3	S
S59	1.1	S	0.9	R	2	S	2	S
S60	0	R	2.6	S	0.9	R	2	S
S61	0.2	R	3	S	0.4	R	1.3	S
S62	0.1	R	2	S	1.9	S	1.4	S
S63	0.4	R	2.3	S	0.4	R	1.8	S
S64	0.2	R	0.4	R	0.6	R	1.2	S
S65	0.2	R	2	S	0.8	R	0	R
S66	0.1	R	0.5	R	0.3	R	1.7	S
S67	0	R	0.7	R	0.5	R	1.4	S
S68	0.2	R	1	R	2	S	0	R
S69	0.1	R	2.2	S	0.7	R	1.4	S
S70	0.3	R	2.1	S	0.4	R	1.1	S
S71	0.1	R	0.9	R	2.7	S	1.3	S
S72	0	R	2	S	0.7	R	1.4	S
S73	0.2	R	1.9	S	0.9	R	1.8	S
S74	0.1	R	0.8	R	0.8	R	1.2	S
S75	0.4	R	2	S	0.4	R	0	R
S76	0.2	R	0.7	R	0.2	R	1.4	S
S77	0.1	R	0.9	R	1.9	R	1.8	S
S78	0	R	0.5	R	0.4	R	1.4	S
S79	0.3	R	2	S	0.5	R	1.5	S
S80	0.1	R	0.4	R	0.7	R	1.6	S
S81	0.3	R	2.5	S	1.9	S	1.7	S
S82	0.2	R	0.7	R	0.5	R	1.4	S
S83	0.4	R	0.8	R	0.4	R	1.8	S
S84	0	R	0.5	R	0.7	R	1.4	S
S85	0.1	R	2	S	2	S	1.1	S
S86	0.3	R	2.1	S	1	R	1.3	S
S87	0.1	R	2.4	S	0.2	R	2	S
S88	0.3	R	2.5	S	2	S	2	S
S89	0	R	2.6	S	1.8	S	1.3	S
S90	0.3	R	2.8	S	0.9	R	1.4	S
S91	0	R	2.1	S	0.4	R	1.8	S
S92	1	S	0.4	R	1.9	R	1.2	S
S93	0.2	R	0.5	R	0.4	R	1.3	S
S94	0.1	R	2	S	0.6	R	1.4	S
S95	0.4	R	0.6	R	0.8	R	1.8	S
S96	0.2	R	2.4	S	0.3	R	1.2	S
S97	0.1	R	2.6	S	0.5	R	0	R
S98	0	R	2.5	S	2	R	1.7	S
S99	0.3	R	0.5	R	0.7	R	1.6	S
S100	0.1	R	0.6	R	0.4	R	1.2	S
S101	0.3	R	0.8	R	2.7	R	0	R
S102	0.2	R	0.4	R	0.7	R	1.4	S
S103	0.4	R	1	R	0.9	S	0	R
S104	0	R	2	S	1.9	R	1.6	S
S105	0.1	R	2	S	0.4	R	0	R
S106	0.3	R	2	S	0.6	R	0	R
S107	0.1	R	0.9	R	0.8	R	1.5	S
S108	0.3	R	2.4	S	0.3	R	1.7	S
S109	0	R	2.6	S	0.5	R	0	R
S110	0.4	R	0.5	R	0.6	R	0	R
S111	0.2	R	2	S	0.4	R	0	R
S112	0	R	0.8	R	2	S	1.3	S
S113	0.4	R	2.6	S	2.4	S	1.4	S
S114	0	R	0.4	R	1.9	S	1.8	S
S115	0.1	R	0.6	R	1.9	S	1.2	S
S116	1	S	2.3	S	0.5	R	1.3	S
S117	0.4	R	0.8	R	0.8	R	1.4	S
S118	0.4	R	2.2	S	0.4	R	1.8	S
S119	0.2	R	2.3	S	2	S	1.2	S
S120	0.1	R	2	S	0.7	R	1.3	S
S121	0	R	0.9	R	1.9	S	1.4	S
S122	0.2	R	2	S	0.4	R	1.8	S

Souche	VA		CN		Amikacine		Amoxiclave	
	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation
S4SM	2.6	S	2.6	S	1.8	S	0	R
TETRA 10-2	1.9	S	2.2	S	1.9	S	0	R
GENTA 10-1	1.9	S	1.9	S	1.7	S	0	R
GENTA 10-2	2.5	S	2.6	S	2	S	0	R
S5	2	S	1.6	S	1.2	R	0	R
S6	1.2	R	1.7	S	1.3	R	0	R
S7	1.8	S	1.9	S	1.8	S	0	R
S8	1.7	S	1.8	S	1.9	S	0	R
S9	1.6	S	1.3	I	2.1	S	0	R

Souche	Amoxicilline		Cefotaxime		Ceftazidime		Cefazoline	
	Diametre	Interpretation	Diametre	Interpretation	Diametre	Interpretation	Diametre	Interpretation
S4SM	1.7	S	0.8	R	1.2	R	1.5	R
TETRA 10-2	1.8	R	1.2	R	1	R	1.4	R
GENTA 10-1	1	S	2.2	R	1.8	R	1.1	S
GENTA 10-2	1.9	S	2.7	S	1.1	R	0.9	R
S5	2	S	2.7	S	1.4	R	1.7	R
S6	2.1	S	1.3	R	1.9	S	1.2	R
S7	1.7	S	1.6	R	1.3	R	1	R
S8	2.2	S	1.4	R	1	R	0.8	R
S9	1.9	S	1.4	R	1.2	R	1.2	R
S10	1.3	R	1.8	R	0.9	R	1.2	R
S11	1	R	1.2	R	0.5	R	2.4	S
S12	1.9	S	1.5	R	1	R	1.7	R
S13	1.7	S	2.6	S	1.4	R	1.3	R
S14	0.8	R	1.3	R	1.1	R	1.6	R
S15	2	S	1.5	R	0.7	R	1.4	R
S16	0.9	R	1.4	R	0.9	R	1.4	R
S17	2.1	S	1.5	R	1.3	R	1.8	R
S18	1.9	S	2.8	S	1.1	R	1.2	R
S19	2.3	S	1.6	R	1	R	1.5	R
S20	0.5	R	2.9	S	0.4	R	1.1	R
S21	2	S	2.8	S	1.8	S	1.3	R
S22	2.6	S	1.4	R	0.9	R	1.5	R
S23	3	S	1.3	R	0.4	R	1.4	R
S24	2.1	S	1.6	R	0.8	R	1.5	R
S25	1.9	S	1.2	R	1.9	S	1.7	R
S26	1.8	S	1.1	R	1	R	1.6	R
S27	1.7	S	1	R	1.4	R	1.3	R
S28	0.5	R	2.6	S	2	S	0.5	R
S29	0.6	R	0.8	R	1	R	1.4	R
S30	2	S	1.2	R	2	S	1.3	R
S31	2.6	S	1.2	R	0.9	R	1.6	R
S32	3	S	2.8	S	0.5	R	1.2	R
S33	2.1	S	1.7	R	0.4	R	1.1	R
S34	1.9	S	1.3	R	0.6	R	1	R
S35	0.5	R	2.9	S	1	R	1.7	R
S36	0.2	R	1.4	R	1.3	R	0.6	R
S37	0	R	1.4	R	2	S	0.7	R
S38	2.1	S	1.8	R	1.3	R	0.5	R
S39	1.9	S	1.2	R	1	R	1.6	R
S40	2.3	S	1.5	R	1.2	R	1.4	R
S41	2.5	S	1.1	R	0.9	R	1.1	R
S42	2	S	1.3	R	0.5	R	2.3	S
S43	2.6	S	1.5	R	1	R	1.4	R
S44	1.9	S	1.4	R	1.4	R	1.3	R
S45	2.5	S	1.5	R	1.1	R	1.7	R
S46	2.1	S	1.7	R	0.7	R	1.7	R
S47	1.9	S	1.6	R	0.9	R	1.3	R
S48	0.7	R	1.3	R	1.3	R	1.6	R
S49	0.4	R	2.8	S	1.1	R	1.4	R
S50	1.7	S	1.4	R	1	R	1.4	R
S51	0.5	R	1.3	R	0.4	R	1.8	R
S52	0.7	R	1.6	R	0.4	R	1.2	R
S53	3	S	1.2	R	0.9	R	1.5	R
S54	2.9	S	1.1	R	1	R	1.1	R
S55	2.8	S	1	R	1.2	R	1.3	R
S56	2.9	S	2.8	S	2	S	1.5	R
S57	3	S	0.8	R	2.5	S	1.4	R
S58	2.9	S	1.2	R	1	R	1.5	R
S59	2.8	S	1.2	R	2.1	S	1.7	R
S60	2.9	S	2.4	R	1.3	R	1.6	R
S61	3	S	1.7	R	1	R	1.3	R
S62	0.2	R	1.3	R	1.2	R	0.5	R
S63	2.1	S	1.6	R	0.9	R	1.4	R
S64	1.9	S	2.8	S	0.5	R	1.3	R
S65	2.3	S	1.4	R	1	R	1.6	R
S66	2.5	S	2.9	S	1.4	R	1.2	R
S67	2	S	1.2	R	1.1	R	1.1	R
S68	2.6	S	2.8	S	0.7	R	1	R
S69	2.9	S	1.1	R	0.9	R	1.7	R
S70	2.5	S	1.3	R	1.3	R	0.6	R
S71	0	R	1.5	R	1.1	R	1.2	R
S72	2.9	S	1.4	R	1	R	1.6	R
S73	2.8	S	1.5	R	1.9	S	1.1	R
S74	3	S	1.7	R	2.4	R	1.5	R
S75	0.1	R	1.6	R	0.9	R	1.8	R
S76	3	S	1.3	R	1.3	R	1.3	R
S77	3.1	S	0.5	R	1	R	1.2	R
S78	2.9	S	1.4	R	0	R	0.9	R
S79	3	S	1.3	R	0.9	R	1.7	R
S80	0	R	1.6	R	0.5	R	1.4	R
S81	2.9	S	1.2	R	1	R	1.6	R
S82	0.3	R	1.1	R	1.4	R	1.8	R
S83	0.2	R	1	R	2.1	S	1.7	R
S84	1.8	S	1.7	R	0.7	R	1.4	R
S85	0.2	R	1.6	R	0.9	R	1.8	R
S86	2.6	S	1.1	R	1.3	R	1.4	R
S87	0	R	1.5	R	1.1	R	1.4	R
S88	2.9	S	1.8	R	2	S	1.8	R
S89	2.8	S	1.3	R	0.4	R	1.2	R
S90	2.9	S	1.2	R	1.2	R	1.5	R
S91	3	S	0.9	R	0.9	R	1.1	R
S92	3.1	S	1.7	R	0.5	R	1.3	R
S93	0.4	R	1.4	R	1	R	1.5	R
S94	3	S	1.6	R	1.4	R	1.4	R
S95	3.1	S	1.8	R	1.1	R	1.5	R
S96	2.9	S	1.7	R	0.7	R	1.7	R
S97	3	S	1.4	R	0.9	R	1.6	R
S98	3.1	S	1.8	R	1.3	R	1.3	R
S99	0	R	1.4	R	1.1	R	0.5	R
S100	2.9	S	1.4	R	1	R	1.4	R
S101	2.8	S	1.8	R	0.4	R	1.3	R
S102	2.9	S	1.2	R	0.4	R	1.6	R
S103	3	S	2.6	S	2.2	S	1.2	R
S104	3.1	S	1.1	R	1	R	1.1	R
S105	2.9	S	1.3	R	1.2	R	1	R
S106	2.8	S	1.5	R	1.3	R	1.7	R
S107	0.1	R	1.4	R	1	R	0.6	R
S108	3	S	2.7	S	1.2	R	1.2	R
S109	3.2	S	1.7	R	0.9	R	1.6	R
S110	3.1	S	2.9	S	0.5	R	1.1	R
S111	0.1	R	1.3	S	1	R	2.5	S
S112	3.3	S	0.5	R	1.4	R	1.8	R
S113	0.2	R	3	S	1.1	R	1.3	R
S114	0	R	1.3	R	0.7	R	1.2	R
S115	0	R	1.6	R	0.9	R	0.9	R
S116	3	S	1.2	R	1.3	R	1.7	R
S117	3.1	S	2.8	S	1.1	R	1.4	R
S118	2.9	S	2.8	S	1	R	1.6	R
S119	3	S	1.7	R	1	R	1.8	R
S120	3.1	S	2.7	S	1.2	R	1.7	R
S121	0	R	1.2	R	0.9	R	1.4	R
S122	0.1	R	1.6	R	0.5	R	1.8	R

Tableau 5 : les souches les plus virulentes

Souche	Acide nalidixique		Cefazoline		Doxycycline		Ceftazidime		Clindamycine		Amoxiclavate		Cefotaxime		Triméthoprime Sulfaméthoxazole		Bio film	Hémolys
	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation	Diamètre	Interpretation		
S4SM	0.4	R	1.5	R	1	R	1.2	R	0.2	R	0	R	0.8	R	0.6	R	+	β
GENTA 10-1	0.9	R	1.1	R	2.1	S	1.8	S	0	R	0	R	2.2	R	0.7	R	+++	α
GENTA 10-2	0.5	R	0.9	R	1.1	R	1.1	R	0.5	R	0	R	2.7	S	1.9	S	++	α
S6	1	R	1.2	R	1	R	1.9	S	1.2	S	0	R	1.3	R	1	R	+	β
S9	0.7	R	1.2	R	0.2	R	1.2	R	0.1	R	0	R	1.4	R	0.4	R	+	α
S11	0.4	R	2.4	S	2.2	S	0.5	R	0	R	0	R	1.2	R	0.7	R	+	α
S13	1	R	1.3	R	0.4	R	1.4	R	0.4	R	0	R	2.6	S	0.2	R	+	β
S20	0.9	R	1.1	R	1	R	0.4	R	0.1	R	0	R	2.9	S	0.5	R	++	α
S22	1	R	1.5	R	0.3	R	0.9	R	0.4	R	0	R	1.4	R	0.2	R	+	β
S30	1	R	1.3	R	1	R	2	S	0	R	0	R	1.2	R	1.9	S	+	β
S34	0.8	R	1	R	1.2	R	0.6	R	0.4	R	0	R	1.3	R	0.8	R	+	β
S35	0.7	R	1.7	R	0.5	R	1	R	0.2	R	0	R	2.9	S	1.8	S	+	α
S37	0.5	R	0.7	R	2	S	2	S	0	R	0	R	1.4	R	0.8	R	+	β
S40	0.9	R	1.4	R	1	R	1.2	R	0.3	R	0	R	1.5	R	2	S	+	β
S43	0.2	R	1.4	R	0.9	R	1	R	0.1	R	0	R	1.5	R	1.9	S	+	β
S52	0.9	R	1.2	R	0.9	R	0.4	R	0	R	0	R	1.6	R	0.4	R	+	β
S55	0.6	R	1.3	R	0.5	R	1.2	R	0.3	R	0	S	1	R	0.5	R	+	β
S58	1	R	1.5	R	0.5	R	1	R	0.3	R	0	R	1.2	R	0.7	R	++	β
S60	0.8	R	1.6	R	0.2	R	1.3	R	0	R	0	S	2.4	R	0.9	R	+	β
S61	0.4	S	1.3	R	0.4	R	1	R	0.2	R	0	R	1.7	R	0.4	R	+	β
S62	0.2	R	0.5	R	0.8	R	1.2	R	0.1	R	0	R	1.3	R	1.9	S	+++	β
S66	0.2	R	1.2	R	0.9	R	1.4	R	0.1	R	0	S	2.9	S	0.3	R	+	β
S74	0.5	R	1.5	R	1	R	2.4	S	0.1	R	0	R	1.7	R	0.8	R	+	β
S75	1	R	1.8	R	2.2	S	0.9	R	0.4	R	0	R	1.6	R	0.4	R	++	β
S87	0.8	R	1.4	R	1	R	1.1	R	0.1	R	0	R	1.5	R	0.2	R	+	β
S88	0.7	R	1.8	R	0.4	R	2	S	0.3	R	0	R	1.8	R	2	S	+	β
S90	0.4	R	1.5	R	0.3	R	1.2	R	0.3	R	0	R	1.2	R	0.9	R	+	β
S93	0.5	R	1.5	R	1	R	1	R	0.2	R	0	R	1.4	R	0.4	R	+	β
S95	1	R	1.5	R	1.2	R	1.1	R	0.4	R	0	R	1.8	R	0.8	R	+++	β
S96	0.9	R	1.7	R	1	R	0.7	R	0.2	R	0	R	1.7	R	0.3	R	+	β
S100	0.4	R	1.4	R	1	R	1	R	0.1	R	0	R	1.4	R	0.4	R	+	β
S101	9.7	R	1.3	R	0.4	R	0.4	R	0.3	R	0	R	1.8	R	2.7	R	+	β
S105	0.4	R	1	R	0.3	R	1.2	R	0.1	R	0	R	1.3	R	0.4	R	+	β
S110	0.9	R	1.1	R	0.5	R	0.5	R	0.4	R	0	R	2.9	S	0.6	R	+	β

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

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



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

STARTUP

Production d'un biofertilisant à base d'algues marines
enrichies par *Enterococcus spp.*

Soutenu dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275

Présenté par :

- ABDLGHAFOUR Imene
- BENABDALLAH Habiba
- FALEK Nessrine
- HADDAR Imene

Soutenu le devant le jury suivant :

Mme OUAFI L.	MCA	Promotrice	ENSSMAL
Mme CHAOU N.	MAA	Promotrice	ENSSMAL
Mme MERRAD A.	MAA	Co-Promotrice	ENSSMAL
INCUBATEUR		Examineur	ENSSMAL

Table des matières

Introduction	1
Premier axe : Présentation du projet
1. L'idée du projet (la solution proposée)	2
2. Les valeurs suggérées :	3
3. L'équipe	3
4. Les objectifs du projet	4
5. Le planning de réalisation du projet	4
Deuxième axe : Aspects innovants
1. La nature des innovations	5
2. Les domaines d'innovation	5
Troisième axe : Analyse stratégique du marché
1. Le segment du marché	5
2. La mesure de l'intensité de la concurrence	5
2.1 Présentation des concurrents	Erreur ! Signet non défini.6
3. Analyse SWOT.....	8
4. Analyse PESTEL	9
5. La stratégie marketing	96
5.1 Présentation de la charte de notre entreprise	10
5.2 Les 4 P	10
Quatrième axe : Plan de production et organisation
2. L'approvisionnement	100
4. Les principaux partenaires	101
Cinquième axe : Plan financier	15
Sixième axe : Prototype expérimental	25
ANNEXES	Erreur ! Signet non défini.

Introduction

Dès l'Antiquité, les civilisations agricoles utilisaient des matières organiques pour enrichir leurs sols. Les Égyptiens utilisaient les alluvions du Nil, tandis que les Chinois effectuaient la fermentation de déchets organiques il y a plus de 2000 ans.

La première utilisation scientifiquement documentée des biofertilisants remonte à 1838 par le botaniste français Jean-Baptiste Boussingault qui a démontré le rôle des légumineuses dans la fixation de l'azote atmosphérique.

L'émergence des biofertilisants modernes remonte à la fin du XIXe siècle, lorsque Martinus Beijerinck, aux Pays-Bas, isola en 1888 les premières souches de *Rhizobium* (initialement nommées *Bacillus radicicola*).

Les années 1980 marquèrent un tournant avec l'introduction de biofertilisants à base d'algues, initialement développés en Norvège par la société Algea. Parallèlement, la découverte des propriétés des bactériocines dans les années 1990 par Tagg et McGiven ouvrit de nouvelles perspectives pour la protection biologique des cultures.

Aujourd'hui, le marché mondial des biofertilisants représente plus de 2,8 milliards de dollars et connaît une croissance annuelle de 12%, témoignant de l'urgence mondiale de transition vers une agriculture durable.

L'agriculture fait face à des défis majeurs liés à la dégradation des sols, à la salinisation et à l'usage intensif d'engrais chimiques. Dans ce contexte, le développement de solutions biotechnologiques innovantes devient une priorité nationale pour assurer une agriculture durable et productive.

Premier axe : Présentation du projet

1. L'idée de projet (la solution proposée)

Le projet vise à développer un biofertilisant innovant à base d'algues marines locales, enrichi en bactériocines produites par des souches spécifiques du genre *Enterococcus*. Cette solution combine des propriétés nutritives naturelles et une action antimicrobienne ciblée, permettant de fertiliser les sols tout en améliorant leur santé microbienne.

Dans un contexte où l'agriculture algérienne fait face à l'épuisement des sols et à la dépendance aux engrais chimiques importés, cette alternative écologique, biodégradable et compatible avec l'agriculture biologique répond à un double enjeu : productivité durable et protection de l'environnement.



Figure 1: Logo de l'entreprise

À partir du CNRC (Centre National du Registre du Commerce), le biofertilisant entre dans la catégorie d'activité codifiée sous le numéro 104108, correspondant à la fabrication d'engrais. Ce code inclut la production, le conditionnement et la commercialisation de fertilisants d'origine chimique ou biologique

The screenshot shows the website of the Centre National du Registre du Commerce (CNRC) in Algeria. The header includes the national emblem and the text: 'République Algérienne Démocratique et Populaire, Ministère du Commerce Intérieur et de la Régulation du Marché National, Centre National du Registre du Commerce'. There are navigation links for 'Se connecter', 'Contactez-nous', and 'français'. A red navigation bar contains: 'ACCUEIL', 'DEVENIR MEMBRE', 'SERVICES OFFERTS', 'ABONNEMENT', 'GUIDE DE FORMALITÉS', 'ACTUALITÉ', 'TARIFS', 'NOS PARTENAIRES', and 'A PROPOS'. On the left, a 'MENU DE RECHERCHE' sidebar lists: 'Trouver Une Entreprise', 'Recherche Commerçant Ambulant', and 'Nomenclature De Vos Activités'. The main content area, titled 'Résultat de la Recherche', contains a legend: 'Les activités réglementées sont représentées en couleur verte' and 'Les activités non autorisées à l'inscription au registre du commerce sont représentées en couleur rouge.' Below this is a table with one entry:

CODE ACTIVITÉ	LIBELLE	DÉTAIL
104108	FABRICATION DE DIVERS ENGRAIS	🔍

Figure 2 : Le code d'activité (CNRC)

2. Les valeurs suggérées

L'entreprise s'inscrit dans une démarche éthique et durable, guidée par des principes forts qui reflètent son engagement envers l'environnement, l'innovation et les acteurs du monde agricole. Ses valeurs fondamentales sont les suivantes : Respect de la nature et des cycles biologiques.

- **Respect de la nature** : adoption de pratiques responsables qui préservent les écosystèmes et les cycles biologiques.
- **Innovation biotechnologique** : développement de solutions naturelles, efficaces et adaptées aux défis agricoles actuels.
- **Proximité avec les acteurs du terrain** : collaboration étroite avec les agriculteurs et valorisation des savoir-faire locaux.
- **Qualité et transparence** : garantie de produits fiables, traçables et conformes aux normes environnementales.
- **Valorisation des ressources marines locales** : utilisation raisonnée des algues pour créer un impact écologique et socio-économique positif.

3. L'équipe

Le projet est porté par une équipe jeune, dynamique et entièrement formée en biotechnologie marine, apte à valoriser les ressources biologiques maritimes de manière innovante et responsable. Chaque membre occupe un poste stratégique :

- ❖ **ABDELGHAFOUR Imene** : Directrice Commerciale et Marketing
- ❖ **BENABDELLAH Habiba** : Directrice Financière
- ❖ **FALEK Nessrine** : Responsable de production
- ❖ **HADDAR Imene** : Responsable du R&D

Cette synergie entre compétences scientifiques, techniques et managériales constitue un levier majeur de réussite du projet.

4. Les objectifs du projet

Ce projet s'inscrit pleinement dans une logique de développement durable et vise à répondre aux enjeux environnementaux, économiques et sociaux actuels. Ses objectifs stratégiques sont les suivants :

- Offrir une solution écologique et performante en remplacement des engrais chimiques traditionnels.
- Valoriser les ressources naturelles locales, en particulier les algues marines disponibles sur le littoral algérien.
- Soutenir la transition vers une agriculture biologique, plus respectueuse de la santé humaine et de l'environnement.
- Sensibiliser et accompagner les agriculteurs dans l'adoption de pratiques agricoles durables et innovantes.

5. Le planning de réalisation du projet

Ci-dessous le planning de réalisation de notre projet à court terme :

		1	2	3	4	5	6	7
1	Études préalables : choix de l'implantation de l'unité de production, préparation des documents nécessaires.	✘						
2	Commande des équipements		✘					
3	Installation des équipements			✘				
4	Achat de matières premières				✘			

5	Réalisation du prototype					✘		
6	Distribution des produits							✘

Deuxième axe : Aspects innovants

1. La nature des innovations

Ce projet se distingue par le développement d'un biofertilisant de nouvelle génération, reposant sur une synergie inédite entre ressources marines et biotechnologie microbienne. Deux innovations principales le caractérisent :

- **L'utilisation d'algues marines** comme source naturelle de nutriments essentiels et de composés bioactifs bénéfiques à la croissance des plantes.
- **L'enrichissement en bactériocines issues du genre *Enterococcus***, offrant une protection biologique contre les pathogènes du sol, sans recours aux produits chimiques de synthèse.

2. Les domaines d'innovation

Le projet s'inscrit dans une dynamique multidimensionnelle, couvrant plusieurs axes d'innovation complémentaires :

- **Technologique** : intégration des biotechnologies marines et microbiennes dans la conception d'intrants agricoles.
- **Écologique** : valorisation durable des algues et réduction significative de l'usage d'intrants chimiques.
- **Sociale** : soutien à une agriculture saine, locale et inclusive, en particulier au bénéfice des jeunes agriculteurs et des zones rurales.

- **Commerciale** : adoption d'un modèle de distribution innovant, fondé sur l'abonnement, la vente directe et un accompagnement personnalisé des utilisateurs.

Troisième axe : Analyse stratégique du marché

Cette enquête vise à évaluer l'intérêt pour un biofertilisant conçu à partir d'algues marines, auprès d'utilisateurs situés dans la région d'Alger.

Un questionnaire comportant 17 questions a été élaboré afin de mieux connaître les profils des répondants, leurs pratiques actuelles en matière de fertilisation, leurs besoins spécifiques et les obstacles éventuels à l'usage de solutions naturelles. Cette étude a également pour objectif d'identifier les formats privilégiés, les niveaux de prix acceptables, les bénéfices attendus, ainsi que les canaux de distribution les plus adaptés à ce type de produit.

1. Le segment du marché

Le biofertilisant s'adresse principalement aux acteurs suivants :

- Agriculteurs biologiques ou en conversion vers le bio.
- Coopératives agricoles cherchant des alternatives naturelles.
- Distributeurs d'intrants agricoles écologiques.
- ONG et projets de développement rural.

Ce segment est en pleine croissance, porté par une prise de conscience environnementale et un soutien accru aux pratiques durables.

2. La mesure de l'intensité de la concurrence

L'étude de l'offre analyse les produits déjà présents sur le marché et les concurrents. Elle aide à repérer les points forts et faibles des offres existantes afin de mieux positionner son propre produit.

2.1 Présentation des concurrents

Avec la montée des préoccupations environnementales et le développement de l'agriculture durable en Algérie, les pratiques agricoles commencent à évoluer. De plus en plus d'agriculteurs cherchent à réduire leur dépendance aux engrais chimiques au profit de solutions plus naturelles et respectueuses des sols.

Dans ce contexte, le marché des biofertilisants connaît une croissance progressive, encouragée par la disponibilité locale de matières premières organiques, comme les déchets végétaux ou marins. Plusieurs acteurs, locaux et importés, investissent ce segment avec des produits variés, parfois bien positionnés mais souvent peu adaptés aux réalités du terrain.

La concurrence reste modérée mais grandissante, avec l'entrée de petites entreprises locales, de coopératives, et de marques importées. Toutefois, l'absence de normes strictes et la variabilité de la qualité posent encore des défis.

Nos principaux concurrents identifiés sont :

- **Sorfert Algérie**
- **Asmidal / Fertial**
- **Metuin Biotuin**
- **Agrichem Algérie**
- **Safior (Azzrou Group)**
- **Fertiplant Algérie**
- **Agronutrition**

2.2 La gamme de produits offerts par les concurrents

Le tableau ci-dessous, liste les principaux produits retrouvés sur le marché algérien :

Entreprise	Type de produits	Conditionnement typique	Prix estimatif
Sorfert Algérie	Engrais NPK, azotés	Sacs 25 kg, big-bags	8 000–12 000 DA / sac
Asmidal / Fertial	Urée, DAP, NPK, micronutriments	Sacs 25 kg, granulés	7 000–14 000 DA / sac
Metuin – Biotuin	Biofertilisants (micro-organismes)	Flacons 1–5 L, sachets	1 500–4 000 DA / L
Agrichem Algérie	Engrais multiples, oligoéléments	Sacs 25 kg, bidons 20 L	9 000–15 000 DA / sac
Safior (Groupe Azzrou)	Fertilisants organo-minéraux	Sacs 25- 50 kg	6 000–10 000 DA / sac
Fertiplant Algérie	Biostimulants, produits foliaires	Bidons 5–20 L	2 000–6 000 DA / L
Agronutrition	Engrais liquides et granulés	Bidons 20 L, sacs 25 kg	8 000–13 000 DA / sac

1. Analyses SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats):

L'analyse SWOT est une méthode d'analyse stratégique permettant de diagnostiquer la situation d'un projet ou d'une entreprise. Elle repose sur l'identification des facteurs internes, tels que les forces et les faiblesses, ainsi que des facteurs externes, à savoir les opportunités et les menaces. Cette approche est utile pour orienter les choix de développement, détecter les risques et valoriser les forces.

FORCE

- Biodégradable, non toxique et écologique.
- Produit de qualité, fiable et performant.
- Compatible avec l'agriculture biologique.
- Polyvalent, adapté à diverses cultures et applications.
- Favorise l'activité microbiologique du sol.
- Effet bénéfique durable sur la santé du sol et des plantes.

Faiblesse

- Effets lents et visibles à moyen/long terme.
- Coût de production élevé.
- Faible notoriété auprès des agriculteurs conventionnels.
- Sensibilité à la dégradation pendant le stockage.

Opportunités

- Orientation nationale vers une agriculture plus durable et moins dépendante des intrants chimiques.
- Soutien croissant de la recherche scientifique en biotechnologie marine et fertilisation naturelle.
- Hausse de la demande en produits issus de l'agriculture biologique, sur les marchés locaux et internationaux.
- Possibilité d'intégrer le projet dans les stratégies de valorisation durable du littoral algérien.
- Accès potentiel à des financements verts et à des programmes de soutien internationaux.

Menace

- Concurrence importante des biointrants établis sur le marché agricole.
- Risques écologiques liés à une exploitation non régulée des algues marines.
- Instabilité des politiques agricoles nationales freinant l'innovation.
- Absence de cadre juridique spécifique pour les biofertilisants à base d'algues.

2. Analyse PESTEL

L'analyse PESTEL est un outil d'analyse stratégique utilisé pour évaluer les influences externes qui peuvent affecter un projet ou une entreprise. Elle examine les facteurs politiques, économiques, socioculturels, technologiques, écologiques et légaux, afin de mieux cerner les opportunités et les menaces présentes dans l'environnement macroéconomique. Cette analyse permet d'orienter les décisions stratégiques en tenant compte des dynamiques externes.

Facteur	Opportunités	Contraintes
Politique	<ul style="list-style-type: none"> - Soutien à l'agriculture durable. - Réduction des importations d'engrais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Instabilité des politiques. - Flou réglementaire sur les biofertilisants.
Économique	<ul style="list-style-type: none"> - Coût faible de la ressource (algues). - Marché local demandeur. 	<ul style="list-style-type: none"> - Accès limité au financement. - Pouvoir d'achat bas de

	- Coût élevé des engrais importés.	certains agriculteurs.
Socioculturel	- Intérêt des jeunes agriculteurs pour l'agriculture bio.	- Résistance au changement. - Méfiance envers les nouveaux produits.
Technologique	- Présence d'universités et de laboratoires en biotechnologie. - Possibilité de recherche locale.	- Faible R&D appliqués.
Environnemental	- Disponibilité des algues. - Valorisation des déchets marins.	- Collecte et conservation complexes. - Risque de mauvaise gestion des ressources.
Légal	- Réformes en cours pour l'économie verte. - Soutien aux produits biologiques.	- Pas de normes précises pour les biofertilisants. - Procédures administratives lourdes.

5. La stratégie marketing

5.1 Présentation de la charte de notre entreprise

Novaterra est une entreprise innovante orientée vers la fabrication et la mise en marché de biofertilisants issus des algues marines. Ce créneau écologique, encore peu exploité en Algérie, présente de nombreuses opportunités, notamment dans la région d'Alger, où l'on observe une présence limitée d'acteurs dans ce domaine.

Notre projet se distingue par l'exploitation durable des ressources maritimes locales pour développer des solutions fertilisantes naturelles, en phase avec les exigences d'une agriculture respectueuse de l'environnement.

Dans cette étude, nous exposerons les principales activités de **Novaterra**, les étapes clés du procédé de production, les équipements nécessaires pour la mise en œuvre du projet, ainsi que les besoins en ressources humaines pour assurer son bon fonctionnement.

5.2 Les 4 P

Le modèle des 4 P du marketing, également connu sous le nom de marketing mix, est un outil essentiel pour la mise en place d'une stratégie commerciale efficace. Il repose sur quatre axes le produit, le prix, la distribution et la communication. Ce cadre permet d'adapter l'offre aux attentes du marché, d'optimiser la visibilité du produit et de maximiser sa valeur perçue auprès des consommateurs.

1. Produit

Le produit développé par **Novaterra** est un biofertilisant innovant, combinant les propriétés naturelles des algues marines avec les effets antimicrobiens des bactériocines produites par des souches sélectionnées du genre *Enterococcus*. Ce fertilisant est conçu pour enrichir le sol en éléments nutritifs essentiels tout en améliorant la santé microbienne du sol grâce à une action biologique ciblée contre certains agents pathogènes.

2. Disposition (place)

Le biofertilisant sera positionné comme une solution naturelle haut de gamme, et vendu dans les canaux suivants :

- Magasins spécialisés
 - Magasins d'intrants agricoles (semences, engrais, matériel)
 - Coopératives agricoles régionales
 - Boutiques bio ou écoresponsables (en zone urbaine)

- Vente directe sur le terrain
 - Démonstrations et foires agricoles (ex : SIPSA-Filaha)
 - Points relais temporaires dans des wilayas agricoles (ex : Sétif, Biskra, Mascara, Ghardaïa)
 - Vente directe par des agents techniques ou agronomes

- Vente en ligne
 - Site web marchand officiel de l'entreprise (avec paiement et livraison intégrée)

- Partenariat possible avec des plateformes e-commerce agricoles locales

3. Promotion

La stratégie promotionnelle repose sur une communication ciblée valorisant les atouts écologiques, économiques et agronomiques du biofertilisant. Elle s'articule autour des actions suivantes :

- **Démonstrations sur le terrain** : essais en conditions réelles auprès d'agriculteurs partenaires pour prouver l'efficacité du produit.
- **Supports de communication** : affiches techniques, fiches explicatives, vidéos pédagogiques et contenu digital adapté.
- **Présence sur les réseaux sociaux et événements** : diffusion sur les plateformes professionnelles et participation à des salons agricoles pour accroître la visibilité.
- **Partenariats stratégiques** : collaboration avec des agriculteurs pilotes, des instituts de recherche et des organismes de vulgarisation pour renforcer la crédibilité scientifique et technique.

4. Prix

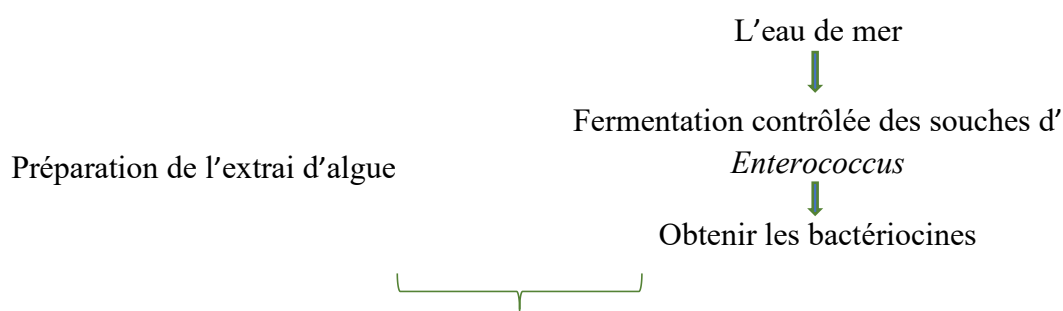
Format	Prix indicatif (DA)	Conditionnement	Public ciblé
1L	600DA	Flacon plastique	Jardiniers, petits exploitants
5L	3 000 DA	Bidon standard	Exploitants agricoles moyens
20L	10 000 DA	Jerrycan renforcé	Coopératives, grandes exploitations

Quatrième axe : Plan de production et organisation

1. Achat de matières premières

L'achat des matières premières (poudre d'algue) s'effectue en ligne auprès de plusieurs fournisseurs sélectionnés.

2. Le Processus de production



Formulation et stabilisation du produit final

3. L'approvisionnement

L'approvisionnement désigne l'ensemble des opérations visant à assurer la disponibilité continue des ressources nécessaires à la production. Dans le cadre de ce projet, il comprend l'acquisition des algues marines comme matière première principale, ainsi que l'achat de matériel technique, d'intrants biologiques et de solutions d'emballage, auprès de fournisseurs spécialisés.

Principaux fournisseurs

- Fournisseurs de matière première « algue ».
- Fournisseurs de matériel et intrants techniques.
- Fournisseurs d'emballage et de conditionnement.

4. La main d'œuvre

Notre projet crée 12 postes d'emploi direct :

- 2 ingénieurs en microbiologie
- 1 ingénieur en contrôle qualité
- 2 manœuvres (ouvriers polyvalents)

- **2 agents de sécurité**
- **2 livreurs**
- **2 agents d'entretien**
- **1 responsable de projet**

5. Les principaux partenaires

Les partenaires identifiés sont :

- ENSSMAL Incubateur BlueStart
- Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
- Ministère de l'environnement et du développement durable
- Ministère du commerce
- Ministère des finances
- Ministère de l'industrie
- Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires
- Direction Générale des Douanes
- Agence Nationale de Développement de l'Investissement
- Centre National du Registre de commerce
- Banques : BADR...
- INAPI
- CNRC
- CNAS
- Fournisseurs : Stations marines d'Annaba ; Centre de recherche marine de Bou Ismaël ; AGRICHEM ALGÉRIE ; OTOLab,...
- Concurrents
- Distributeurs et importateurs : Yara ; Agrodis ; Agritech ; Plateformes e-commerce
- Media : tv, réseaux sociaux

Cinquième axe : Plan financier

Le plan financier est une Composante essentielle dans tout projet de création d'entreprise. Ce document regroupe l'ensemble des prévisions budgétaires du projet, incluant les investissements initiaux, les charges d'exploitation, les recettes attendues, ainsi que les éventuels bénéfices ou pertes. Il permet d'évaluer la rentabilité et la viabilité économique du projet à court, moyen et long terme. Il aide également à anticiper les besoins en financement, à mieux gérer les ressources disponibles et à prendre des décisions éclairées. En outre, le plan financier constitue un élément clé pour convaincre les partenaires, investisseurs ou organismes de financement du sérieux et du potentiel du projet. Il reflète ainsi la capacité de l'entreprise à être autonome, rentable et durable dans le temps.

1. Les Coûts et charges

Matériel	Prix
Cuves d'extraction inox	150000 DA
Bain-marie industriel ou cuve chauffante	200000 DA
Agitateur mécanique motorisé	150000 DA
Thermomètre digital à sonde	10000 DA
Filtres textiles / sacs	20000 DA
Cuve formulation	60000 DA
Agitateur de formulation	50000 DA
Pompe de remplissage semi-auto	120000 DA
Capsuleuse	50000 DA
Étiqueteuse manuelle	30000 DA
Bidons PEHD	100000 DA
Hotte à flux laminaire	400000 DA

Autoclave	600000 DA
Incubateur (étuve)	400000 DA
Agitateur orbital	250000DA
Fermenteur de labo	1000000 DA
pH-mètre de paillasse	80000 DA
Balance de précision	50000 DA

Plaque chauffante + agitateur magnétique	100000 DA
Centrifugeuse	150000 DA
Boîtes de Pétri	6000 DA
Flacons Erlenmeyer	1500 DA
Tubes à essai + porte-tubes	10000 DA
Milieux de culture	30000 DA
Désinfectants	10000 DA
Matériels de bureau	300000 DA
Totale	4327500 DA
Matière première	700000 DA
Totale	5027500 DA

Détail des amortissements

	Année 1	Année 2	Année 3
Amortissements incorporels	50,00	50,00	50,00
<i>Frais d'établissement</i>	50,00	50,00	50,00
<i>Logiciels, formations</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Droits d'entrée</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Frais de dossier</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Frais de notaire ou d'avocat</i>	0,00	0,00	0,00
Amortissements corporels	1 265,60	1 265,60	1 265,60
<i>Enseigne et éléments de communication</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Achat immobilier</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Travaux et aménagements</i>	400,00	400,00	400,00
<i>Matériel</i>	805,60	805,60	805,60
<i>Matériel de bureau</i>	60,00	60,00	60,00
Total amortissements	1 315,60	1 315,60	1 315,60

Nombre	Employées	Salaire
2	Ingénieur on microbiologie	50000 DA
1	Ingénieur on biotechnologie	60000 DA
2	Manœuvre	35000 DA
2	Agent de sécurité	26000 DA
2	Livreur	45000 DA
2	Agent d'entretien	25000 DA
1	Responsable	80000 DA

Salaires et charges sociales

	Année 1	Année 2	Année 3
Rémunération du (des) dirigeants	3 200,00	3 200,00	3 200,00
<i>% augmentation</i>		<i>0%</i>	<i>0%</i>
Charges sociales du (des) dirigeant(s)	1 440,00	1 440,00	1 440,00
Salaires des employés	6 024,00	6 024,00	6 024,00
<i>% augmentation</i>		<i>0%</i>	<i>0%</i>
Charges sociales employés	4 337,28	4 337,28	4 337,28

2. Le Chiffre d'affaires

	Année 1	Année 2	Année 3
Produits d'exploitation	112 992,00	118 641,60	124 573,68
<i>Chiffre d'affaires HT</i>	<i>112 992,00</i>	<i>118 641,60</i>	<i>124 573,68</i>
<i>Chiffre d'affaires HT autres services</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
Charges d'exploitation	67 795,20	71 184,96	74 744,21
<i>Achats consommés</i>	<i>67 795,20</i>	<i>71 184,96</i>	<i>74 744,21</i>
Marge brute	45 196,80	47 456,64	49 829,47

• Chiffre d'affaires attendu (le scénario réaliste, pessimiste et le scénario optimiste) :

	scénario (réaliste)	scénario (pessimiste)	scénario (optimiste)
	N	N-1	N+1
Quantité du produit (litre)	28248	112960	28248
Prix (DA)	600	600	700
Ventes produit (litre)	18832	9416	28248
Chiffre d'affaire (DA)	11 299 200	5 649 600	19 773 600

3. Les Comptes de résultats escomptés

Compte de résultats prévisionnel sur 3

	Année 1	Année 2	Année 3
Produits d'exploitation	112 992,00	118 641,60	124 573,68
<i>Chiffre d'affaires HT</i>	<i>112 992,00</i>	<i>118 641,60</i>	<i>124 573,68</i>
<i>Chiffre d'affaires HT autres services</i>	-	-	-
Charges d'exploitation	67 795,20	71 184,96	74 744,21
<i>Achats consommés</i>	<i>67 795,20</i>	<i>71 184,96</i>	<i>74 744,21</i>
Marge brute	45 196,80	47 456,64	49 829,47
Charges externes	2 935,00	2 935,00	2 935,00
<i>Assurances</i>	<i>105,00</i>	<i>105,00</i>	<i>105,00</i>
<i>Téléphone, internet</i>	<i>40,00</i>	<i>40,00</i>	<i>40,00</i>
<i>Autres abonnements</i>	-	-	-
<i>Carburant, transports</i>	<i>500,00</i>	<i>500,00</i>	<i>500,00</i>
<i>Frais de déplacement et hébergement</i>	-	-	-
<i>Eau, électricité, gaz</i>	<i>200,00</i>	<i>200,00</i>	<i>200,00</i>
<i>Mutuelle</i>	-	-	-
<i>Fournitures diverses ex pp</i>	-	-	-
<i>Entretien matériel et vêtements</i>	-	-	-
<i>Nettoyage des locaux</i>	-	-	-
<i>Budget publicité et communication</i>	<i>500,00</i>	<i>500,00</i>	<i>500,00</i>
<i>Loyer et charges locatives</i>	<i>1 440,00</i>	<i>1 440,00</i>	<i>1 440,00</i>
<i>Expert-comptable, avocats</i>	<i>150,00</i>	<i>150,00</i>	<i>150,00</i>
	-	-	*
	-	-	*
Valeur ajoutée	42 261,80	44 521,64	46 894,47
Impôts et taxes	-	-	-
Salaires employés	6 024,00	6 024,00	6 024,00
<i>Charges sociales employés</i>	<i>4 337,28</i>	<i>4 337,28</i>	<i>4 337,28</i>
Prélèvement dirigeant(s)	3 200,00	3 200,00	3 200,00
<i>Charges sociales dirigeant(s)</i>	<i>1 440,00</i>	<i>1 440,00</i>	<i>1 440,00</i>
Excédent brut d'exploitation	27 260,52	29 520,36	31 893,19
Frais bancaires, charges financières	-	-	-
Dotations aux amortissements	1 315,60	1 315,60	1 315,60
Résultat avant impôts	25 944,92	28 204,76	30 577,59
Impôt sur les sociétés	3 891,74	4 230,71	4 586,64
Résultat net comptable (résultat de l'exercice)	22 053,18	23 974,05	25 990,95

Soldes intermédiaires de gestion

	Année 1	%	Année 2	%	Année 3	%
Chiffre d'affaires	112 992,00	100%	118 641,60	100%	124 573,68	100%
Ventes + autres services	112 992,00	100%	118 641,60	100%	124 573,68	100%
Achats consommés	67 795,20	60%	71 184,96	60%	74 744,21	60%
Marge globale	45 196,80	40%	47 456,64	40%	49 829,47	40%
Charges externes	2 935,00	3%	2 935,00	2%	2 935,00	2%
Valeur ajoutée	42 261,80	37%	44 521,64	38%	46 894,47	38%
Impôts et taxes	-	0%	-	0%	-	0%
Charges de personnel	15 001,28	13%	15 001,28	13%	15 001,28	12%
Excédent brut d'exploitation	27 260,52	24%	29 520,36	25%	31 893,19	26%
Dotation aux amortissements	1 315,60	1%	1 315,60	1%	1 315,60	1%
Résultat d'exploitation	25 944,92	23%	28 204,76	24%	30 577,59	25%
Charges financières	-	0%	-	0%	-	0%
Résultat financier	-	0%	-	0%	-	0%
Résultat courant	25 944,92	23%	28 204,76	24%	30 577,59	25%
Résultat de l'exercice	22 053,18	20%	23 974,05	20%	25 990,95	21%
Capacité d'autofinancement	23 368,78	21%	25 289,65	21%	27 306,55	22%

Seuil de rentabilité économique

	Année 1	Année 2	Année 3
Ventes + Autres services	112 992,00	118 641,60	124 573,68
Achats consommés	67 795,20	71 184,96	74 744,21
Total des coûts variables	67 795,20	71 184,96	74 744,21
Marge sur coûts variables	45 196,80	47 456,64	49 829,47
Taux de marge sur coûts variables	40%	40%	40%
Coûts fixes	19 251,88	19 251,88	19 251,88
Total des charges	87 047,08	90 436,84	93 996,09
Résultat courant avant impôts	25 944,92	28 204,76	30 577,59
Seuil de rentabilité (chiffre d'affaires)	48 129,70	48 129,70	48 129,70
Excédent / insuffisance	64 862,30	70 511,90	76 443,98
<i>Point mort en chiffre d'affaires par jour ouvré</i>	<i>192,52</i>	<i>192,52</i>	<i>192,52</i>

Besoin en fonds de roulement

		<i>délai jours</i>	Année 1	Année 2	Année 3
Besoins					
Volume crédit client HT	30		9 287,01	9 751,36	10 238,93
Ressources					
Volume dettes fournisseurs HT	60		11 144,42	11 701,64	12 286,72
Besoin en fonds de roulement			- 1 857,40	- 1 950,27	- 2 047,79

4. Le Plan de trésorerie

Plan de financement à trois ans

	Année 1	Année 2	Année 3
Immobilisations	6 578,00		
Acquisition des stocks	700,00		
Variation du Besoin en fonds de roulement	- 1 857,40	- 92,87	- 97,51
Remboursement d'emprunts	-	-	-
Total des besoins	5 420,60	- 92,87	- 97,51
Apport personnel	778,00		
Emprunts	-		
Subventions	8 000,00		
Autres financements			
Capacité d'autofinancement	23 368,78	25 289,65	27 306,55
Total des ressources	32 146,78	25 289,65	27 306,55
Variation de trésorerie	26 726,18	25 382,52	27 404,07
Excédent de trésorerie	26 726,18	52 108,70	79 512,77

Budget prévisionnel de trésorerie (premier années)

	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5
Apport personnel	778,00				
Emprunts	-				
Subventions	8 000,00				
Autres financements					
Ventes	-	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00
Ventes autres services	-	-	-	-	-
Chiffre d'affaires (total)	-	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00
Immobilisations incorporelles	250,00				
Immobilisations corporelles	6 328,00				
Immobilisations (total)	6 578,00				

ANNEXES

Acquisition stocks	700,00				
Échéances emprunt	-	-	-	-	-
Achats de marchandises	-	6 163,20	6 163,20	6 163,20	6 163,20
Charges externes	244,58	244,58	244,58	244,58	244,58
Impôts et taxes	-	-	-	-	-
Salaires employés	502,00	502,00	502,00	502,00	502,00
Charges sociales employés	361,44	361,44	361,44	361,44	361,44
Prélèvement dirigeant(s)	266,67	266,67	266,67	266,67	266,67
Charges sociales dirigeant(s)	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00
Total charges de personnel	1 250,11	1 250,11	1 250,11	1 250,11	1 250,11
Frais bancaires, charges financières	-	-	-	-	-
Total des décaissements	8 772,69	7 657,89	7 657,89	7 657,89	7 657,89
Total des encaissements	8 778,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00
Solde précédent	-	5,31	2 619,42	5 233,53	7 847,64
Solde du mois	5,31	2 614,11	2 614,11	2 614,11	2 614,11
Solde de trésorerie (cumul)	5,31	2 619,42	5 233,53	7 847,64	10 461,75

- La

Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	TOTAL
							778,00
							-
							8 000,00
							-
10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	112 992,00
-	-	-	-	-	-	-	-
10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	112 992,00
							250,00
							6 328,00
							6 578,00
							700,00
-	-	-	-	-	-	-	-

6 163,20	6 163,20	6 163,20	6 163,20	6 163,20	6 163,20	6 163,20	67 795,20
244,58	244,58	244,58	244,58	244,58	244,58	244,58	2 935,00
-	-	-	-	-	-	-	-
502,00	502,00	502,00	502,00	502,00	502,00	502,00	6 024,00
361,44	361,44	361,44	361,44	361,44	361,44	361,44	4 337,28
266,67	266,67	266,67	266,67	266,67	266,67	266,67	3 200,00
120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	1 440,00
1 250,11	1 250,11	1 250,11	1 250,11	1 250,11	1 250,11	1 250,11	15 001,28
-	-	-	-	-	-	-	-
7 657,89	7 657,89	7 657,89	7 657,89	7 657,89	7 657,89	7 657,89	93 009,48
10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	10 272,00	121 770,00
10 461,75	13 075,86	15 689,97	18 304,08	20 918,19	23 532,30	26 146,41	
2 614,11	2 614,11	2 614,11	2 614,11	2 614,11	2 614,11	2 614,11	
13 075,86	15 689,97	18 304,08	20 918,19	23 532,30	26 146,41	28 760,52	

Sixième axe : Prototype expérimental

Etape 01

Extraction aqueuse :

- Macération de la poudre d'algue dans l'eau distillée
- Filtration du mélange
- Récupération de l'extrait liquide filtré



Etape 02

Culture des bactériocine :

- Isolement et culture des souches bénéfiques à partir de l'eau de mer
- Préparation des extraits bactériens



Etape 03

Formulation de produit :

- Mélange des deux dilutions (extrait d'algue et culture bactérienne)
- Agitation douce pour homogénéisation



etape 04

Conditionnement :

- Mise en bouteille opaque
- Etiquetage et stockage

BUSINESS MODEL CANVAS



NOVATERA

Partenaires clés

- Fournisseurs de matières premières
- Partenaires scientifiques et techniques
- Organismes de normalisation et certification
- Canaux de distribution
- Institutions publiques de soutien à l'innovation verte
- Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
- Ministère de l'Environnement et des Energies Renouvelables
- Ministère de la Pêche et des Productions halieutiques
- CNRC, banque

Activités clés

- Traitement des algues
- Formulation du produit
- Contrôle qualité
- Production & conditionnement
- Recherche & développement
- Vente & distribution

La proposition de valeur

- Produit naturel et écologique
- Apport nutritif végétal
- Compatible agriculture bio
- Valorisation des ressources locales
- Alternative aux engrais chimiques

Relation avec la clientèle

- Produit de qualité garantie
- Conseil agronomique individualisé.
- Supports techniques.
- Programmes de fidélisation.
- Disponibilité du produit assurée

Segment de la clientèle :

- Agriculteurs bio
- Producteurs maraîchers
- Distributeurs d'intrants agricoles
- ONG agricoles

Ressources clés :

- Ressources humaines :**
 - Équipe spécialisée
 - Expertise technique avancée
- Ressources financières :**
 - Équipements de qualité
 - Partenariats financiers
- Ressources matérielles :**
 - Algues marines
 - Unité de transformation dédiée

Canaux de distribution :

- Réseaux spécialisés bio
- Coopératives agricoles
- Points de vente locaux
- Vente directe et e-commerce
- Salons et événements agricoles

Structure des coûts

- Coûts d'investissement: 8 778 000 DA
- Coûts fixes: 2 935 000 DA
- Masse salariales: 8 224 000 DA
- Totale: 19 937 000 DA

Revenus :

- Vente directe
- Formation et certification des agriculteurs
- Pricing : saisonnière ; abonnement annuel ; selon la récolte
- Chiffre d'affaire : 11 299 200 DA/ans
- Bénéfice : 22 053 180 DA

Activeit
Accédez

Représentation visuelle de produit

