

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

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



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur

Domaine : **Science de la Nature et de la Vie**

Filière : **Hydrobiologie Marine et Continentale**

Spécialité : **Biotechnologie Marine**

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

Réalisé par :

- **Maamri Sadia**
- **Mahour Saadia**

Soutenu le 24/06/2024, devant le jury suivant :

Mme GHALMI R.	Maitre Assistante A	Présidente
M. KADA M.	Maitre-Assistant A	Examineur
Mme CHAOU N.	Maitre Assistante A	Promotrice

Promotion 2023/2024

Remerciements

Au terme de ce travail, nous souhaitons exprimer nos remerciements : Tout d'abord, nous remercions Dieu, le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé le privilège, la chance et le courage d'étudier. Sa guidance nous a été précieuse tout au long de la réalisation de ce modeste travail. (Hamdoulah).

Ce travail rentre dans le cadre de la thèse de Doctorat de notre merveilleuse promotrice, Madame **CHAOU N.**, à qui nous adressons des mots empreints d'une profonde émotion. Votre acceptation de nous encadrer a été bien plus qu'un simple acte ; c'était un engagement profond envers notre réussite. Vos conseils avisés, vos suggestions éclairées et votre soutien indéfectible ont été comme des phares dans la nuit, nous guidant à travers les méandres de ce mémoire. Pour cela, nous vous sommes infiniment reconnaissants. Votre présence bienveillante a été la pierre angulaire de notre accomplissement, et pour cela, nous vous offrons nos plus sincères remerciements, empreints de toute notre affection. Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude envers les membres du jury, **Mme GHALMI** et **M. KADA** pour avoir pris le temps d'examiner attentivement ce modeste travail.

Nos remerciements vont à tout le personnel de laboratoire, ainsi qu'à tous les ingénieurs qui ont apporté leur contribution : **Madame Houda, Monsieur Nouredine, Monsieur Yacine, Monsieur Malik, Madame Amina, Madame Refes, Monsieur Matouk et Monsieur Ahmed.**

Enfin, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail. Leurs efforts ont été précieux et méritent notre plus profonde gratitude et notre respect sincère.

Dédicaces

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail : À mes merveilleux parents, Maman et Papa. Vous m'avez offert le plus beau cadeau : la vie. Vous avez été à mes côtés, m'aidant et me soutenant avec amour pour tracer ce chemin lumineux que je parcours aujourd'hui. Vos encouragements inlassables et votre présence constante ont été la clé de ma réussite. Aucun mot ne suffira jamais à exprimer l'amour immense que je vous porte et la place unique que vous occupez dans mon cœur. Si aujourd'hui je réalise mon rêve de devenir ingénieure en biotechnologie, c'est grâce à vous. Ce succès est le fruit de vos encouragements, de vos précieux conseils et de vos prières.

Je vous dédie ce travail avec toute ma gratitude. Mille mercis pour tout ce que vous avez fait pour moi. À mes chères grands-mères et à mon grand-père (Jeddi Mohand), que Dieu vous accueille dans Son vaste paradis. Je n'oublierai jamais vos précieux conseils. Sans oublier mon grand-père bien-aimé, Jeddi Mohammed. Que Dieu te protège. Merci pour ton aide, ton soutien indéfectible et tes encouragements, malgré la distance qui nous sépare.

À mes adorables sœurs, Hanat, Milia, Chahra, et à mon unique frère, Saada. Vous avez toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, malgré votre jeune âge par rapport à moi. Votre amour et votre présence ont été inestimables pour moi. Merci du fond du cœur.

À toute ma famille, et en particulier à mes tantes, surtout Nabila, et à mes oncles, Arabi et Nafa. Je vous remercie du fond du cœur pour avoir toujours été là pour moi, depuis ma naissance jusqu'à aujourd'hui. À toute la famille Lounes, Massi, Nadia, Lynda, Jugurtha et sa femme, ainsi qu'à leurs parents. Merci pour votre soutien inébranlable, votre patience infinie, et vos encouragements sans fin. Vous avez été une source constante de réconfort et d'inspiration pour moi.

À toutes mes adorables amies : Saadia (sans toi, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail), Meliha, Ania, Mira, Meriem, ainsi qu'à toute la promotion de Biotechnologie. Sans oublier tous mes enseignants, qui ont façonné mon parcours depuis l'école primaire jusqu'à l'université. Je vous adresse un immense merci pour tous vos efforts et vous rends un grand hommage.

Sadia

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible, et leurs encouragements constants tout au long de mon parcours académique. Leur sagesse et leur persévérance ont été une source d'inspiration et de motivation pour moi. Ils ont sacrifié tant de choses pour me permettre de poursuivre mes rêves et ont toujours cru en mes capacités, même lorsque je doutais de moi-même. Leur foi inébranlable en moi m'a donné la force de surmonter les obstacles et de persévérer dans les moments les plus difficiles. Leur amour et leur soutien sont le fondement de tous mes succès.

A Mes chères sœurs Dalila, Siham (sans oublier ta princesse) et Farida, qui ont toujours été à mes côtés, ne m'ont jamais abandonné, et m'ont constamment donné de l'espoir. Votre amour, votre soutien indéfectible et votre présence constante ont été des sources inépuisables de force et de motivation pour moi. Vous avez su me reconforter dans les moments de doute, m'encourager lorsque j'en avais le plus besoin, et célébrer chaque petite victoire avec moi. Vos paroles reconfortantes et vos gestes bienveillants ont illuminé mon chemin et rendu ce parcours bien plus supportable. Sans vous, je n'aurais pas pu accomplir ce projet avec autant de détermination et de succès. Je vous en suis infiniment reconnaissante.

A Mes chers frères, Yacine, Djamal, Amar, Karim, et mon petit Yanis. Je n'oublierai jamais votre soutien indéfectible et votre présence constante tout au long de mon parcours. Vous avez été des piliers de force et d'encouragement, toujours là pour me relever et me pousser à aller de l'avant. Chacun de vous, à sa manière, a contribué à ma réussite en m'offrant non seulement votre aide, mais aussi votre amour fraternel. Vos encouragements et votre foi en mes capacités m'ont permis de surmonter les défis et de persévérer. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir été des compagnons inestimables dans cette aventure.

Je vous suis profondément reconnaissante Sans oublier mon cher tonton Youcef, qui m'a offert tant de choses et m'a aidé de nombreuses façons, et ma tante Ourida, pour sa gentillesse et son soutien interminable

A tous mes amis, pour leur aide précieuse et leur présence constante.

À Sadia, ma binôme, avec qui j'ai partagé chaque moment de cette aventure.

À Thanina, Hana et Nihad, Sonia , Cylia , Abdou ,pour votre amitié sincère et vos encouragements constants,

Et à toutes les personnes qui ont croisé ma route, que ce soit brièvement ou sur la durée, durant tout mon parcours, ainsi que les amies de la promo, vous avez tous contribué à rendre mon chemin plus riche et significatif. Merci pour vos sourires, vos encouragements et votre soutien tout au long de cette aventure.

Saadia

Résumé :

Cette étude vise à évaluer et à caractériser la résistance des entérocoques aux antibiotiques, isolés à partir de six plages du littoral algérois. La qualité de ces plages a été évaluée par le dénombrement des entérocoques, révélant une mauvaise qualité pour toutes les plages, sauf celle de Ain Taya. Un total de 43 souches d'entérocoques collectées en février a été soumis à une étude de la résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton. Le taux de résistance le plus élevé a été observé pour l'Acide Nalidixique et la Céfalexine, suivi du Triméthoprim-Sulfaméthoxazole, de la Doxycycline, de la Ceftazidime et de la Clindamycine. Un taux de résistance moyen a été constaté pour la Ciprofloxacine, l'Amikacine et la Gentamicine, tandis que la résistance à la Vancomycine était très faible. L'identification de 16 isolats a permis de déterminer 14 souches appartenant à l'espèce *Enterococcus faecium* et 2 souches appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis*. Ces résultats illustrent clairement le risque sanitaire associé à la contamination de ces plages. Il est donc impératif de mettre en place des mesures pour résoudre cette problématique. La majorité de nos souches étant faiblement productrices de biofilm, cela pourrait atténuer leur virulence globale mais ne diminue pas le risque sanitaire qu'elles représentent.

Mots clés : Résistance aux antibiotiques, Entérocoques, Qualité de l'eau, Contamination, virulence.

Abstract:

This study aims to evaluate and characterize the antibiotic resistance of enterococci isolated from six beaches along the Algiers coastline. The quality of these beaches was assessed by counting enterococci, revealing poor quality for all beaches except Ain Taya. A total of 43 enterococcal strains collected in February were subjected to a study of their antibiotic resistance using the disk diffusion method on Muller-Hinton agar. The highest resistance rate was observed for Nalidixic Acid and Cephalexin, followed by Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Doxycycline, Ceftazidime, and Clindamycin. A medium resistance rate was found for Ciprofloxacin, Amikacin, and Gentamicin, while resistance to Vancomycin was very low. The identification of 16 isolates revealed 14 strains belonging to the species *Enterococcus faecium* and 2 strains belonging to the species *Enterococcus faecalis*. These results clearly illustrate the health risk associated with the contamination of these beaches. It is therefore imperative to implement measures to address this issue. Since the majority of our strains are weak biofilm producers, this could mitigate their overall virulence but does not reduce the health risk they pose.

Key words : Antibiotic resistance, Water quality, Contamination, enterococci, virulence.

ملخص:

هذه الدراسة تهدف إلى تقييم وتوصيف مقاومة المضادات الحيوية للإنثيروكوك المعزولة من ست شواطئ على ساحل الجزائر. تم تقييم جودة هذه الشواطئ من خلال عد الإنثيروكوك، مما كشف عن جودة ضعيفة لجميع الشواطئ باستثناء عين الطاية. وتمت معالجة مجموعة كاملة من السلالات الإنثيروكوك المجمعة في فبراير لدراسة مقاومتها للمضادات الحيوية باستخدام طريقة انتشار القرص على مولر هنتون. وكان أعلى معدل مقاومة يلاحظ لحامض الناليديكسيك والسيفالكسين، تليهما تريميثوبريم - سلفاميثوكسازول، والدوكسيسيكلين، والسيفتازيديم، والكليندامايسين. وكان معدل مقاومة متوسط للسبيروفلوكساسين والأميكاسين والجنتاميسين، بينما كانت المقاومة للفانكوماميسين منخفضة جدًا. وقد أظهر تحديد 16 عزلة وجود 14 سلالة تنتمي إلى نوع *إنثيروكوكس فايسسيوم* وسلالتين تنتميان إلى نوع *إنثيروكوكس فايساليس*. هذه النتائج توضح بوضوح المخاطر الصحية المرتبطة بتلوث هذه الشواطئ. لذلك فمن الضروري تنفيذ تدابير لمعالجة هذه المشكلة. بما أن غالبية سلالاتنا ضعيفة في إنتاج الغشاء البكتيري، يمكن أن يخفف ذلك من قوتها الفيروسية العامة ولكن لا يقلل من المخاطر الصحية التي تشكلها

كلمات مفتاحية : المكورات المعوية- تلوث - المقاومة للمضادات حيوية - نوعية الماء .

Sommaire

REMERCIEMENTS	
DEDICACES	
SOMMAIRE.....	
LISTE DES FIGURES :	9
LISTE DES TABLEAUX :	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : GENERALITES	3
1. Historiques	4
2. Définition et taxonomie	4
3. Habitat.....	5
4. Caractéristiques.....	6
a) Caractère morphologique	6
b) Caractères culturels :	6
c) Caractères biochimiques.....	7
5. Isolement.....	8
6. Épidémiologie des Entérocoques	9
7. Pathogénicité des entérocoques.....	9
8. Résistance aux antibiotiques	10
a) Historique.....	10
b) Définition	11
c) Émergence	11
d) Critères de classification des antibiotiques	12
e) Les classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action.....	13
f) Antibiorésistance chez les entérocoques :	19
g) Support génétique de la résistance chez les entérocoques	20
h) Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques aux antibiotiques.....	21
9. Virulence des entérocoques	27

b) Les Facteurs de virulence des entérocoques	27
➤ Facteurs de virulence secrétés	27
➤ Facteurs de virulence liés à la membrane	29
10 . Applications des entérocoques	31
a) Indicateurs de contamination fécale	31
b) Utilisation des entérocoques comme probiotiques.....	31
c) Applications des entérocoques dans les aliments	32
11. Les Bactériocines	33
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	37
II-1-Présentation des zones d'études.....	38
II-2- Collecte des échantillons	43
II-3-Analyse Microbiologique des Échantillons	43
II-3-1 Dénombrement des coliformes fécaux et totaux dans l'eau de mer par la méthode de filtration	43
II-3-2-Dénombrement des entérocoques	44
➤ Eau de mer.....	44
➤ Sédiment.....	46
II-4 Prévalence de la résistance aux antibiotiques des Entérocoques	47
➤ Dans l'eau.....	47
II-5- Isolement :	48
II-6- Identification	49
II-6- 1- L'identification microscopique des entérocoques	49
a) Coloration de Gram	49
II-6- 2 Les tests Biochimiques pour l'identification des entérocoques	50
a) Test de la catalase	50
b) Test de l'oxydase	51
c) Type fermentaire	52
d) Test de la résistance à la salinité	52
e) Test de thermorésistance	53
f) Test de la résistance au tellurite de potassium	53
g) Test de fermentation des sucres	53
h) Identification par la galerie API 20 streptocoques	55
III- Antibiorésistance des souches isolées (Antibiogramme)	58
IV- Tests de virulence des entérocoques	61
a) Formation du biofilm	61
b) Test d'hémolyse.....	62
c) La recherche de la Gélatinase.....	62
V- Mise en évidence de la production de Bactériocines par antagonisme	63
VI- Conservation des souches	64

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	65
III-1- Résultats des paramètres physicochimiques	66
III-2- Résultats des analyses microbiologiques	66
III-2-1 Dénombrement des coliformes totaux	66
➤ Eau de mer.....	66
III-2-2 Le dénombrement des entérocoques	68
➤ Eau de mer.....	68
➤ Résultats de la méthode NPP pour la recherche des entérocoques dans les sédiments	71
III-3 Prévalence de la résistance des Entérocoques aux antibiotiques	72
III-4-Isolement.....	74
III-5 Identification.....	75
III-5-1 Identification microscopiques des souches.....	76
a) Coloration de Gram	76
III-5- 2 Identification biochimiques des souches	76
a) Test de la catalase	76
b) Test de l'oxydase	76
c) Type fermentaire	77
d) Test de thermorésistante	78
e) Test de la réduction du tellurite de potassium.....	79
f) Test de fermentation des sucres	79
g) Identification par la galerie API 20 streptocoques	82
III- 6 Résultats de l'antibiogramme	84
III 7- Résultats des tests de virulence :	92
a) Test de biofilm	92
b) Les Résultats de l'hémolyse.....	94
c) Test de la Gélatinase.....	96
III-6 Production de bactériocine par antagonisme	97
III-7 Discussion générale.....	99
CONCLUSION.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	
ANNEXES	

Liste des figures :

Figure 1 : Les entérocoques observés sous un microscope électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite) (Porteneret al, 2003)	6
Figure 2 : Photographie de la plaque de culture originale du champignon <i>Penicillium notatum</i> faite par Sir Alexander Fleming (Guilfoile, 2007)	10
Figure 3 : Chronologie de la découverte des principaux antibiotiques (Muller, 2017).....	12
Figure 4 : Représentation schématique du mode d'action des AGA dans les ribosomes bactériens. (Mathilde G., 2017).....	13
Figure 5 : Mécanisme d'action des quinolones (Adapté de Kohanski ma et al. Nature Reviews Microbiology, 2010).....	14
Figure 6 : Mécanisme d'action des Glycopeptide (Bidat, 2018)	17
Figure 7 : Mécanismes d'action des macrolides (Microbiologie clinique Powered By : MWL 2022)	18
Figure 8 : Mode d'action des tétracyclines (National Information Program on Antibiotics, 2023) ..	19
Figure 9 : Mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques (Arias et Murray, 2012).....	21
Figure 10 : Structure de la paroi bactérienne (Emilie Cardot Martin et al., 2019)	22
Figure 11 : Production de la toxine Cytolysine à partir d'une souche bactérienne (Skals et al, 2013).....	27
Figure 12 : Souches bactériennes productrices de la Gélatinase en microscope photonique (Roselyn, 1973).....	28
Figure 13 : Structure chimique de facteur de virulence bactérien l'hyaluronidase (Ruhal et Kataria, 2021).....	28
Figure 14 : Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide (Douarche et al., 2018)	30
Figure 15 : Production de biofilm par une souche <i>d'E. faecalis</i> dans un tissu valvulaire. Image obtenue par comptage sur plaque en microscopie électronique à balayage à haute résolution (FESEM) (Chuang-Smith et al., 2010)	31
Figure 16 : Historique de la découverte des bactériocines (Kamar, 2019)	34
Figure 17 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram+ (Fernandez,2014)	36
Figure 18 : Situation géographique des sites de prélèvement élaboration personnelle (Arc GIS)	39
Figure 19 : Plage d'Ain Taya (Flots bleus)	39
Figure 20 : Plage Bateau Cassé.....	40
Figure 21 : Station de dessalement de l'eau de mer à proximité de la plage Bateau cassé (Elwatan.dz.2023)	40
Figure 22 : La plage la Sirène II.....	41
Figure 23 : Plage Kheloufi I	41
Figure 24 : Confluence de l'oued Mazafran à la plage Colonel Abbes	42
Figure 25 : Plage de Colonel Abbes	42
Figure 26 : Plage Sidi Fredj.....	42
Figure 27 : Schéma représentatif de la méthode de filtration (Microbiologie-clinique. Constituants. Physiologie bactérienne : Nutrition et Croissance, 2023)	44
Figure 28 : La Stérilisation.....	45
Figure 29 : Dépôt du filtre	45
Figure 30 : Placer la membrane sur la surface du milieu solide Slanetz et Bartley.....	45
Figure 31 : Filtration de l'échantillon	45
Figure 32 : Dépôt de la membrane sur le milieu BEA	46
Figure 33 : Schéma représentatif de la méthode NPP (Microbiologie-clinique. Analyses Bactériologiques des eaux. 2023).....	47

Figure 34 : Schéma représentatif de la coloration de Gram (Microbiologie-clinique. Coloration-Gram.2023)	50
Figure 35 : Les étapes du test Catalase (Microbiology Laboratory Turkey, 2018)	51
Figure 36 : Dépôt du disque oxydase	52
Figure 37 : Humidifier le disque.....	52
Figure 38 : Dépôt de la colonie sur le disque.	52
Figure 39 : Le système de la galerie Api 20 Strept.....	56
Figure 40 : L'ajout des réactifs	57
Figure 41 : L'antibiogramme	59
Figure 42 : Emplacement des antibiotiques utilisés dans la boîte de pétrie.....	60
Figure 43 : Le test de Biofilm.....	61
Figure 44 : Recherche de la Gélatinase	63
Figure 45 : Schéma de la méthode de diffusion en puits : production de bactériocines.....	64
Figure 46 : Aspect des coliformes sur le milieu TTC	67
Figure 47 : Résultats du dénombrement des coliformes totaux de l'eau de mer dans les (exprimé en UFC/100ml)	68
Figure 48 : Recherche d' <i>E. coli</i>	68
Figure 49 : Les colonies d'entérocoques sur milieu Slanetz et Bartley	69
Figure 50 : Aspect des entérocoques sur le milieu BEA	69
Figure 51 : Résultats du dénombrement des entérocoques.....	70
Figure 52 : Résultats de recherche des entérocoques dans les sédiments par la méthode NPP (la présence d'un trouble.).....	71
Figure 53 : Confirmation de la présence des entérocoques	71
Figure 54 : Résultats de la recherche des entérocoques dans les sédiments par la méthode NPP.....	72
Figure 55 : Prévalence de la résistance des entérocoques aux différents antibiotiques.....	74
Figure 56 : Résultats de l'isolement sur le milieu Slanetz.....	75
Figure 57 : Répartition des entérocoques dans les six stations.....	75
Figure 58 : Aspect microscopique des souches d'entérocoques isolées dans l'eau de mer après coloration de Gram, observées sous un grossissement de *100	76
Figure 59 : Résultat négatif du test catalase d'une souche isolée	76
Figure 60 : Résultat du test oxydase d'une souche isolée	77
Figure 61 : Résultat obtenu pour le type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé.....	77
Figure 62 : Résultat du test de thermorésistance des souches.	78
Figure 63 : Résultat de la croissance sur bouillon hyper salé.....	78
Figure 64 : Résultat du test de la réduction du tellurite de potassium.....	79
Figure 65 : Résultats du test de fermentation des trois sucres.	80
Figure 66 : Résultats du test de fermentation du sorbitol	80
Figure 67 : Galerie api® 20 Strept après 24 heures d'incubation après l'ajout des réactifs	82
Figure 68 : Profil fermentaire des souches identifiées	83
Figure 69 : Espèces d'entérocoques identifiées par la galerie Api 20 Strept	83
Figure 70 : le profil de résistance des souches identifiées.....	92
Figure 71 : Profil de résistance des souches isolées	84
Figure 72 : Résultats de l'antibiogramme par site.....	87
Figure 73 : Résultat de l'antibiogramme des souches isolées	90
Figure 74 : Résultat de la production de Biofilm	94
Figure 75 : Résultats du test d'hémolyse (milieu Columbia + sang).	95
Figure 76 : Résultats du test d'hémolyse	95

Liste des Tableaux :

Tableau 1 : Caractères principaux des entérocoques (Delarras, 2007).....	8
Tableau 2 : Association d'un inhibiteur de bêta-lactamase avec un antibiotique bêta-lactame (Neche , 2021).....	16
Tableau 3 : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques (Tremblay, 2012)	21
Tableau 4 : Différents phénotypes de résistance des entérocoques (Bryskier, 1999).....	24
Tableau 5 : La résistance de l'espèce <i>E. faecium</i> aux principales familles d'antibiotiques. (Alili, 2020)	26
Tableau 6 : Principales sources d' <i>Enterococcus</i> spp. dans les aliments (Aguilar- Galvez et al., 2012).	32
Tableau 7 : Liste des antibiotiques en disque utilisés.....	60
Tableau 8 : Résultats des paramètres physicochimiques	66
Tableau 9 : Récapitulatif des résultats d'Identification des souches d'entérocoque isolées :	81
Tableau 10 : Profil de virulence des souches identifiées :.....	97

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNr 16S : Acide Ribonucléique
Ribosomique 16S

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

BEA : Bile Esculine Azide

TTC : Chlorure de 2, 3,5
triphényltétrazolium

BH : Hyaluronidase Bactérienne

BHIB : Bouillon cœur-cervelle

ATB : Antibiotique

CASFM : Comité français de
microbiologie

ESP : Protéines de Surface Extracellulaire

KDa : Kilo Dalton

MEC : Matrice Extracellulaire

MH : Muller-Hinton

OMS : Organisation Mondiale de la Sante

pb : Paire de Base

UFC : Unité formant colonie

PLP /PBP5) : Protéines liant la pénicilline

SA : Substance d'agrégation

NaCl : Chlorure de sodium

pH : potentiel d'hydrogène

E : *Enterococcus*

NPP : Nombre le Plus Probable

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon
phosphate salin)

ERV : Entérocoques résistants à la
Vancomycine

AGA : antibiotique aminosides

DBO : diazobicyclooctane ponté

FDA : Food and Drug Administration

SARM : Staphylococcus aureus
Résistante à la Méthicilline

GRAS : Generally Regarder As Safe

PK : phosphoketolases

CMI : concentration minimal d'inhibition

Introduction générale

Le monde microbien est un monde microscopique d'une incroyable diversité, abritant une multitude de micro-organismes jouant un rôle essentiel dans les écosystèmes terrestres et marins. Parmi ces micro-organismes, les entérocoques qui sont des bactéries omniprésentes, se retrouvent tant chez l'homme que dans l'environnement. Malheureusement, ils sont également connus pour leur capacité à développer rapidement des résistances aux antibiotiques, mettant ainsi en péril notre arsenal thérapeutique. **(Duckett S. 1999).**

La résistance aux antibiotiques constitue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé publique, posant des défis significatifs à la lutte contre les infections bactériennes et peut être à l'origine de menaces épidémiques et d'une mortalité élevée **(Pazda et al., 2019)**. Alors que l'origine et la propagation de la résistance aux antibiotiques ont été largement étudiées dans des environnements cliniques, il est de plus en plus reconnu que les écosystèmes naturels, tels que les milieux marins, jouent un rôle crucial dans le développement et la dissémination de cette résistance. **(Pesavento et al, 2014).**

Le milieu marin, en tant que réservoir diversifié de microorganismes, offre un habitat propice à l'émergence et à la persistance de la résistance aux antibiotiques. Les activités humaines, telles que le rejet d'effluents hospitaliers et pharmaceutiques, ainsi que l'utilisation intensive d'antibiotiques dans l'agriculture, peuvent contribuer à l'introduction de souches résistantes dans les écosystèmes marins. **(Maurin Max, 2018).**

En Algérie, très peu d'études se sont intéressées à l'état de la résistance aux antibiotiques dans les environnements aquatiques. Alors que les données sur la résistance en milieu clinique dénotent de l'ampleur de ce phénomène. **(Belhadi et al, 2020).**

Dans ce contexte, ce travail s'articule autour de trois principaux axes : dans un premier temps isoler et identifier des bactéries appartenant au genre *Enterococcus*, puis dans un deuxième temps l'exploration et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques de ces bactéries isolées du milieu marin. Nous examinerons les profils de sensibilité aux antibiotiques et les facteurs environnementaux qui pourraient favoriser l'émergence et la dissémination de la résistance. Cette étude contribuera à éclairer les aspects encore peu compris de la dynamique de la résistance aux antibiotiques dans les écosystèmes marins, avec des implications potentielles sur la santé publique et la préservation de la biodiversité marine.

Introduction générale

Enfin, le dernier volet porte sur l'étude de certains facteurs de virulence des souches d'entérocoques isolées.



Chapitre I : Généralités

I. Généralités sur les entérocoques

1. Historiques

Le nom « Entérocoque » a été, pour la première fois, utilisé en 1899 par Thiercelinet Jouhaud. Ce nom a été proposé pour préciser l'origine intestinale d'un nouveau diplocoque à Gram positif. À cette époque, en raison de leurs similitudes morphologiques et biochimiques, ces bactéries ont été initialement classées comme des streptocoques fécaux en 1906 (*Streptococcus faecalis*). Il a fallu attendre 1984 et des expériences d'hybridation ADN-ADN ainsi que l'analyse des séquences de l'ARNr 16S pour montrer que les espèces *S. faecium* et *S. faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier la création du genre *Enterococcus*. (Schleifer et al., 1984 ; Ludwig et al., 1985; Schleifer et Kilpper-Balz, 1987). Ces bactéries ont été reclassé comme *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*. (Destain et al., 2010).

Cette reclassification a été motivée par la détection de l'antigène de paroi D, commun aux entérocoques et à certaines bactéries du genre *Streptococcus*, telles que *Streptococcus gallolyticus* et *Streptococcus infantarius*. (Francois-Ngo & Mainardi, 1998 ; Cetinkaya et al., 2000). La croissance des entérocoques en milieu "hypersalé", contenant 6,5 g/l de NaCl (propriété halophile) permet avant tout de les distinguer des streptocoques. (A. Bouvet et G. Cowry 1994).

Le terme "entérocoque" trouve son origine dans la combinaison des mots "entérique" et "coque" (Schleifer et al., 1984). Cette dénomination souligne leur prévalence dans le tractus digestif, notamment dans l'intestin humain, où ces bactéries sont des commensaux courants. L'utilisation du terme "entérocoque" reflète donc leur association étroite avec l'environnement intestinal et met en lumière leur importance dans la microbiologie, en particulier dans le contexte de la flore intestinale.

2. Définition et taxonomie

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulées, appartenant au groupe sérologique D de la classification de Lancefield. Ils se présentent sous forme de coques isolées ou arrangées en paires, parfois en courtes chaînettes, et sont majoritairement immobiles. Bien que catalase négative, ils portent le gène codant cette enzyme dans leur génome (Devriese et al., 1993; Frankenberg et al., 2002). Sur le plan morphologique, les entérocoques sont souvent en diplocoques, avec des cellules sphériques ou ovoïdes dont la taille varie de 0,6 à 2µm.

Ils sont difficilement différenciables des autres streptocoques à l'examen direct (**Hoen et al., 2002**). Leur génome présente un faible pourcentage en G+C, variant de 37,5 à 44 % (**Flahaut et al., 1997**).

Selon le Bergey's, manuel de la bactériologie systématique (**2009**), le genre *Enterococcus* est classé comme suit :

- **Domaine** : Bacteria ou Eubacteria
- **Phylum** : Firmicutes
- **Classe** : Bacilli
- **Ordre** : Lactobacillales
- **Famille** : Enterococcaceae
- **Genre** : *Enterococcus*
- **Espèce** : *E. faecalis* / *E. faecium* / *E. avium* / *E. durans* / *E. gallinarum*

Le genre *Enterococcus* comptait 37 espèces en 2011, 48 espèces en 2013 et 55 espèces en 2017 (**Boussouar, 2017**)

3. Habitat

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes (**Delarras, 2007**), leur habitat naturel prédominant est le tractus intestinal des mammifères, y compris celui de l'homme (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) mais on les trouve également plus rarement au niveau du vagin ou de la cavité buccale (**Beargie et al., 1975 ; Godreuil et al, 2007 ; Schloissnig et al., 2013**). Ils sont présents chez d'autres espèces animales, tels que les reptiles, les oiseaux et les insectes. (**Mundt et al., 1962 ; Deibel et al., 1963 ; Flahaut et al., 1997 ; Gilmore et al., 2013**)

Les entérocoques sont des bactéries présentes dans différentes niches écologiques, notamment dans les eaux douces (*Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus moraviensis*) et marines (*Enterococcus aquimarinus*). Ils peuvent également coloniser les végétaux, tels qu'*Enterococcus sulfureus*. Certains entérocoques ont même été trouvés chez des espèces animales préhistoriques, montrant leur capacité à s'adapter aux habitudes de vie au fil du temps. En plus de cela, les entérocoques sont également présents dans différentes eaux (usées, douces et de mer). (**Manero et al., 1999**).

La variation de la flore entérocoque chez les différents hôtes, qu'ils soient humains ou animaux, constitue un aspect crucial de la compréhension de la dynamique microbienne intestinale. Dès les premiers jours de vie, les entérocoques dominent souvent l'intestin, mais cette prédominance

diminue progressivement au fil des semaines. (Clausen *et al.*, 1977 ; Gleeson et Gray, 1997). L'association des entérocoques avec les plantes et les invertébrés soulève des questions sur leur rôle dans les écosystèmes terrestres, suggérant une capacité d'adaptation et une diversification écologique importantes. Cette diversité et cette plasticité dans la distribution et l'abondance des entérocoques soulignent l'importance de considérer une approche holistique dans l'étude de la microbiologie intestinale et de ses interactions avec les hôtes et leur environnement. (Pieniz et al., 2015).

4. Caractéristiques

a) Caractère morphologique

Les entérocoques sont des cocci à Gram positifs. Les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées, par paire ou encore sous forme de chaînette (Figure 01), (Schleifer et al., 1984). Généralement, les entérocoques produisent des colonies de couleur blanche. Toutefois, quelques-unes sont de couleur jaune comme *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* (Higashide et al., 2005), non sporulantes, généralement immobiles (sauf pour *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) et sans capsule (Kalina, 1970).

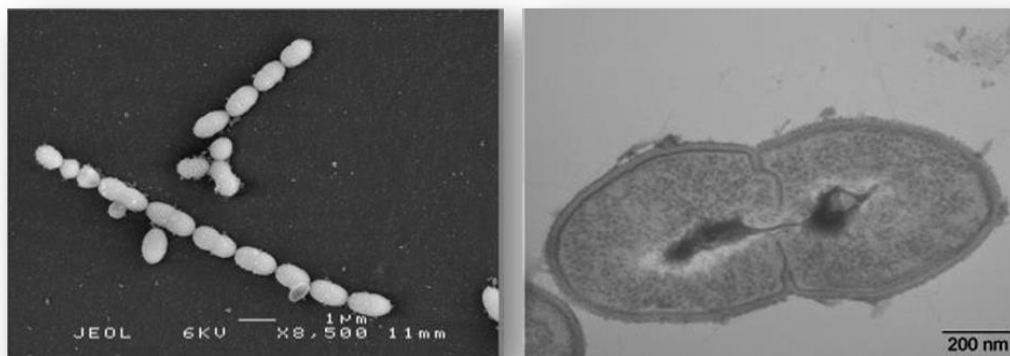


Figure 1 : Les entérocoques observés sous un microscope électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite) (Porteneret al, 2003)

b) Caractères cultureux :

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

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

c) Caractères biochimiques

Les entérocoques sont des micro-organismes aérobies facultatifs à Gram positif qui font partie de la flore intestinale normale, avec des concentrations variant de 10^5 à 10^8 UFC/g de contenu intestinal (**Le Blanc, 2006**). De nombreux caractères biochimiques des entérocoques ont été décrits pour le diagnostic des entérocoques. Ces bactéries sont :

- Chimio-organotrophes.
- Aéro-anaérobies facultatives.
- Catalase négative (mais certaines espèces présentent une activité pseudo-catalase)
- Réaction positive à VOGES-PROSKAUER. (**Schleifer et al., 1984 ; Le Blanc, 2006**).
- Oxydase négative. (**Schleifer et al., 1984**)
- Facteurs de croissance obligatoires pour leur développement.
- Pas de production d'indole et de sulfure d'hydrogène.
- Organismes homofermentaire : production en grande partie de l'acide lactique, ainsi que de faibles quantités d'acétate et d'éthanol. En absence d'oxygène, l'acide lactique est le principal résultat de la fermentation des glucides. Tandis qu'en présence d'oxygène, les produits métaboliques sont l'acétate et le dioxyde de carbone. (**Schleifer et al., 1984 ; Le Blanc, 2006**)

Tableau 1 : Caractères principaux des entérocoques (Delarras, 2007).

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

5. Isolement

L'isolement des entérocoques à partir d'échantillons pathologiques est une étape cruciale dans le diagnostic des infections associées à ces bactéries. Pour ce faire, différents milieux de culture sont utilisés, notamment des géloses sanguines non sélectives et des géloses sanguines supplémentées en colistine (Polymyxine) et en Acide Nalidixique ou Oxolonic (Trovatelli et al., 1987; Knudtson and Hartman, 1992; Centeno et al., 1995), qui sont actifs principalement contre les bactéries Gram négatif. Ces ajouts sont essentiels pour inhiber la croissance des autres types de bactéries et favoriser ainsi la croissance des entérocoques.

Les colonies d'entérocoques peuvent être distinguées sur la gélose sanguine en fonction de leurs caractéristiques hémolytiques, avec des colonies d'*E. faecalis* souvent non hémolytiques ou β -hémolytiques, tandis que la plupart des souches du groupe *E. faecium* produisent des colonies α -hémolytiques (Mundy et al, 2000). Bien que plusieurs milieux sélectifs aient été développés, aucun n'a démontré une spécificité totale.

Parmi les milieux couramment utilisés, la gélose Slanetz et Bartley offre une bonne sélectivité pour les entérocoques, avec une capacité à favoriser la croissance des colonies d'*E. faecalis*, ce qui en fait un choix privilégié dans le processus d'isolement. Cependant, il est important de noter que toutes les espèces d'entérocoques ne poussent pas sur des milieux sélectifs, soulignant

ainsi les défis persistants dans l'isolement et l'identification précise de ces bactéries. (**Slanetz, L. W., and Bartley, Clara H, 1957**).

6. Épidémiologie des Entérocoques

L'épidémiologie des entérocoques a été étudiée à l'aide de diverses techniques moléculaires, avec des conclusions et résultats différents et souvent contradictoires, selon la méthode utilisée (**Devriese et al., 2006**). Ces études ont porté sur l'épidémiologie hospitalière et la propagation potentielle de souches résistantes de l'animal à l'homme (**Franz et al., 2003 ; Devriese et al., 2006**).

Traditionnellement, les infections à entérocoques étaient considérées comme endogènes, provenant de la propre flore du patient. Cependant, des preuves récentes indiquent que la transmission se propage d'un patient à l'autre (**Devriese et al., 2006 ; Rehman et al., 2018**). Il a été démontré aussi que certaines souches multi résistantes pourraient se propager au sein d'un hôpital et même entre les hôpitaux et provoquer un grand nombre d'infections nosocomiales (**Rehman et al., 2018**).

7. Pathogénicité des entérocoques

En tant que pathogènes opportunistes, ils peuvent provoquer des infections mortelles chez l'homme telles que les infections nosocomiales, qui sont difficiles à traiter, en raison des taux de survie élevés de ces bactéries dans le milieu hospitalier, de la résistance inhérente à de nombreux antimicrobiens et de leur étonnante capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques et de divers facteurs de virulence (**Strateva et al., 2016 ; Wozniak-Biel et al., 2019**).

A l'exception d'*E. faecium* et d'*E. faecalis*, les entérocoques sont peu identifiés comme des agents pathogènes chez les individus (**Aguilar-Galvez et al., 2012**). En effet, ils ne sont pas très virulents de nature par rapport aux autres bactéries telles que les staphylocoques, les pneumocoques et d'autres bactéries à Gram positif, leur dose létale est souvent très élevée. Pour qu'ils soient pathogènes, ils doivent manifester et exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion, la translocation et à la disparition de la réponse immunitaire. (**Aguilar-Galvez et al., 2012 ; Stucki et al., 2014**).

8. Résistance aux antibiotiques

a) Historique

Il a été rapportées depuis l'antiquité, que les « moisissures » avaient un effet curatif, et étaient ainsi utilisées pour traiter des infections bactériennes. Certaines études, notamment au XIXème siècle, montraient que la croissance bactérienne était inhibée lorsque la bactérie était co-cultivée avec une « moisissure » (**Sebald et Hauser, 1995**).

Mais c'est au XXème siècle que la majorité des antibiotiques ont été découverts, ce qui représente un tournant dans l'histoire des antibiotiques. Les découvertes se sont enchaînées, des années 20 aux années 70, période communément appelée « Golden Age », le premier antibiotique de cette nouvelle pharmacopée étant la pénicilline.

C'est à Alexander Fleming que l'on doit la découverte de la pénicilline, en 1928. Il avait remarqué que la croissance de ses cultures de staphylocoque était inhibée par la moisissure *Penicillium notatum*, provenant des cultures de son voisin de paillasse (figure 02). A l'aide d'un chimiste, il parvint à concentrer la pénicilline, mais pas à la stabiliser, ne permettant pas son utilisation comme traitement (**Duckett, 1999**).



Figure 2 : Photographie de la plaque de culture originale du champignon *Penicillium notatum* faite par Sir Alexander Fleming (**Guilfoile, 2007**)

C'est à la fin des années 30, qu'une équipe d'Oxford parvint à synthétiser et à stabiliser la pénicilline, en vue d'une utilisation curative.

Il a été rapporté que *Staphylococcus* avait déjà développé une résistance à la pénicilline avant son introduction sur le marché (**Hede, 2014**). Aussi inquiétant que cela puisse être, depuis les années 2000, très peu de nouveaux antibiotiques ont été découverts. Néanmoins il y a eu la découverte de la Teixobactine dont le spectre est étendu aux bactéries Gram positif (**Ling et al. 2015**), et la Darobactine qui vise quant à elle les bactéries à Gram négatif (**Imai et al. 2019**).

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus largement utilisés en médecine aujourd'hui, surtout en automédication et durant la période de la pandémie de Covid-19.

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

b) Définition

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, ou toute substance chimique produite par synthèse ou encore toute substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant une activité antibactérienne.

Chaque famille d'antibiotiques a des propriétés spécifiques : le spectre d'activité, le mécanisme d'action, et l'activité bactéricide ou bactériostatique (Veysièrè, 2020).

Selon l'OMS : la résistance aux antibiotiques se caractérise par le changement de réponse des bactéries suite à l'exposition à ces molécules.

Une souche bactérienne est considérée comme résistante lorsqu'elle peut supporter une concentration d'antibiotique significativement plus élevée que celle nécessaire pour inhiber la croissance de la plupart des autres souches de la même espèce. (Mac Govan et Wise, 2001).

c) Émergence

Considérés comme le « remède miracle » depuis la seconde guerre mondiale, les antibiotiques ont été utilisés à outrance depuis leur découverte, aussi bien pour soigner que pour protéger les humains, les animaux ou les végétaux. La surexposition des bactéries aux antibiotiques a contribué à l'apparition de phénotypes résistants à ces molécules. En effet, les bactéries ont deux avantages sur l'espèce humaine : elles se multiplient rapidement et peuvent s'échanger du matériel génétique. Ceci leur permet de répandre les phénotypes résistants. De ce fait, le phénomène de résistance est apparu presque aussi rapidement que les antibiotiques eux-mêmes, et semble s'accélérer au fil des ans. (Figure 03). (Andleeb et al, 2020).

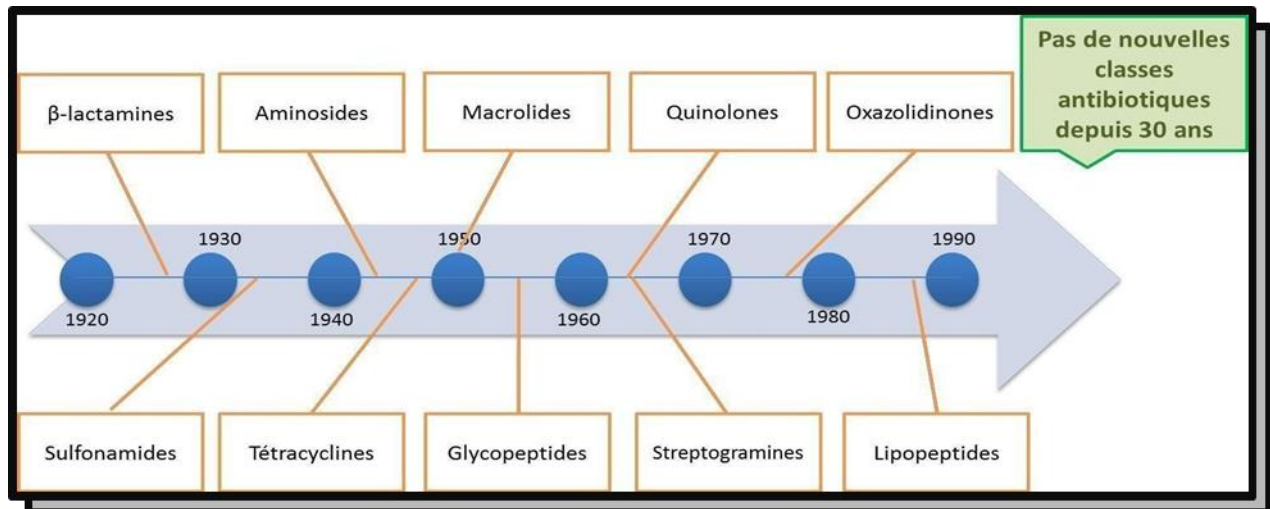


Figure 3 : Chronologie de la découverte des principaux antibiotiques (Muller, 2017)

d) Critères de classification des antibiotiques

❖ Origine

- **Naturel** : L'antibiotique est produit par des micro-organismes, soit par des champignons (*Penicillium*, *Cephalosporium*) ou bien par des bactéries. (Delarras C. 2007).
- **Synthétique** : Les antibiotiques sont obtenus par voie chimique (Sulfamides, Acide Nalidixique).
- **Semi-synthétique** : Les antibiotiques sont obtenus par un radical chimique greffé sur une fraction moléculaire naturelle (Méthicilline) (Gaudy et Buxeraud, 2005).

❖ Spectre d'activité

- **Les antibiotiques à large spectre** : actifs sur la majorité des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.
- **Les antibiotiques à spectre limité** : actifs sur les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif.
- **Les antibiotiques étroits** : actifs uniquement sur certaines bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Gaudy et Buxeraud, 2005).

❖ Mode d'action

Les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises. Certains inhibent la formation de leur paroi et désorganisent leur membrane, d'autres inhibent les différentes étapes de la synthèse protéique ou d'acide nucléique. Selon Gaudy et Buxeraud (2005), l'antibiotique exerce deux types d'action :

- **Bactériostatique** : inhibe la croissance bactérienne.
- **Bactéricide** : provoque la mort de la bactérie.

e) Les classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action

1. Les aminosides

Les aminosides ou antibiotiques aminosides (AGA) sont des métabolites secondaires de bactéries utilisées dans la guerre contre d'autres micro-organismes, puis ils ont été utilisés en médecine en tant qu'antibiotiques à large spectre chez les humains et les animaux. Cette classe d'antibiotiques a une activité contre les bactéries Gram- et Gram+ en ciblant l'ARN ribosomique (ARNr), conduisant à un mauvais repliement des protéines. **(Hanberger et al 2013)**. Malgré leur toxicité rénales potentielles et leur résistance bactérienne connue, diverses molécules de cette famille d'antibiotiques sont utilisées en pratique clinique depuis plusieurs décennies. **(Chandrika et Garneau-Tsodikova, 2018 ; Capelo- Martínez et Igrejas, 2020)**.

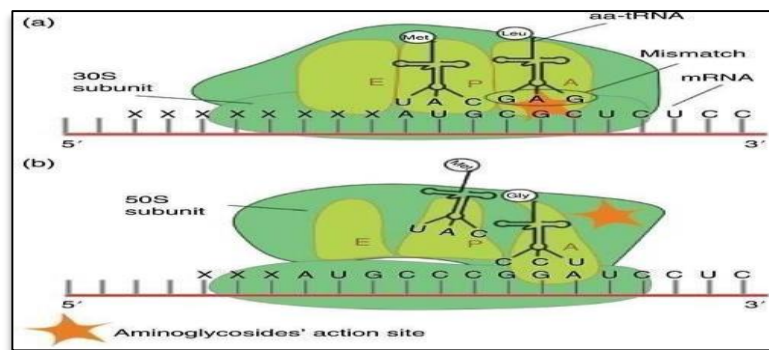


Figure 4 : Représentation schématique du mode d'action des AGA dans les ribosomes bactériens. **(Mathilde G., 2017)**

(a) Augmentation du taux d'erreur pendant le processus de décodage dans le site A.

(b) Induction des changements de conformation dans la sous-unité 50S, en inhibant la translocation des molécules d'ARNt (de l'A- et des sites P aux sites P et E).

2. Les quinolones

Dans cette famille, plusieurs sous divisions sont acceptées, ici nous les subdiviserons en quinolones urinaires avec les quinolones de 1ère génération (Acide Pipémidique, Fluméquine) dont l'arrêt de commercialisation date du début d'année 2019 et fluoroquinolones (Enoxacine, Loméfloxacine, Norfloxacine. Les Fluoroquinolones à visée systémique (Ciprofloxacine, Ofloxacine) et enfin les fluoroquinolones dites antipneumococciques qui vont agir essentiellement sur le pneumocoque (Lévofloxacine, Moxifloxacine). Cette famille d'antibiotiques est à utiliser avec précaution car elle présente de nombreuses résistances et doit être évité en première intention. **(Veysiere, 2020)**

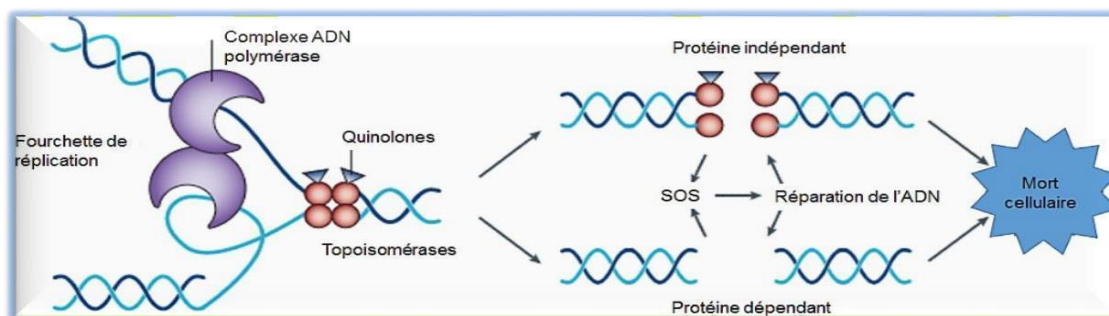


Figure 5 : Mécanisme d'action des quinolones (Adapté de Kohanski *et al.* *Nature Reviews Microbiology*, 2010).

3. Les bêta-lactamines

Les antibiotiques bêta-lactamines sont un grand groupe d'antibiotiques qui partagent en commun une structure de base appelée anneau bêta-lactame. Les diverses structures moléculaires de ces antibiotiques permettent de les classer en plusieurs sous-groupes avec des spécificités caractéristiques. Les antibiotiques bêta-lactamines sont les agents antibactériens les plus couramment utilisés pour traiter les infections bactériennes en raison de leur activité bactéricide et de leur faible toxicité, sauf pour les patients souffrant d'allergies. (Balsalobre *et al.*, 2019).

3.1 Pénicillines

Les pénicillines font partie du grand groupe des penams. En raison de la nature hautement réactive du cycle bêta-lactame, les pénicillines sont susceptibles de se dégrader dans certaines conditions telles que l'acidité. En effet, ils doivent être protégés du pH acide gastrique lorsqu'ils sont utilisés par voie orale. (Fernandes et Prudêncio 2013 ; Balsalobre *et al.*, 2019).

3.2 Céphalosporines

Les céphalosporines sont des dérivés des produits de fermentation du champignon *Acremonium chrysogenum*. (Balsalobre *et al.*, 2019).

Les céphalosporines sont plus résistantes à l'hydrolyse par les bêta-lactamases que les pénicillines ; par conséquent, ils ont montré un spectre d'activité plus large et ils sont classés en cinq générations selon leur activité antibactérienne (Fernandes *et al.*, 2013).

En général, les céphalosporines de première et deuxième générations ont une bonne activité contre les microorganismes à Gram positif, et les troisième et quatrième générations sont plus

actives contre les pathogènes à Gram négatif. Cependant, *Listeria*, *Pasteurella spp.* et les entérocoques et tous les staphylocoques résistent à la Méthicilline, ils sont donc résistants aux céphalosporines (à l'exception des céphalosporines de cinquième génération). (**Balsalobre et al., 2019**)

3.3 Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont les antibiotiques au spectre le plus large disponibles parmi les bêta-lactamines. Ils diffèrent des autres bêta-lactames car ils possèdent un atome de carbone au lieu d'un atome de soufre ou d'oxygène dans le noyau bicyclique et une chaîne latérale hydroxyéthyle en configuration trans en position 6. Le premier carbapénème connu était la Hiénamycine, produite par la bactérie à Gram positif *Streptomyces cattleya* (**Birnbaum et al., 1985**). L'imipénem a ensuite été obtenu par modification chimique. Au total, quatre carbapénèmes sont largement commercialisés (Doripénème, Ertapénème, Imipénème et Méropénème) et deux autres (Biapénème et Tébipénème) disponibles uniquement au Japon (**Bush et Bradford, 2016**). En général, leur spectre d'activité s'étend à la majorité des agents pathogènes Gram positifs et Gram négatifs, y compris les aérobies et les anaérobies, en raison de leur pénétration bactérienne efficace, de leur stabilité contre l'hydrolyse par la plupart des bêta-lactamases et de leur affinité élevée pour plusieurs PBP. Cependant, cette classe de bêta-lactamines montre une inactivité intrinsèque contre les staphylocoques et *Enterococcus faecium* résistants à la Méthicilline. (**Papp- Wallace et al., 2011**).

3.4 Bêta-lactamines associé aux inhibiteurs de la bêta-lactamase :

Les inhibiteurs des bêta-lactamases en médecine clinique sont introduits en 1970 et constituent une bonne approche pour lutter contre la résistance aux bêta-lactamines. Ils sont utilisés en association avec une bêta-lactamine et sont capables de restaurer l'activité de la bêta-lactamine. (**Lebrun, 2016**). Ils peuvent être classés en deux groupes (tableau 2) :

- Inhibiteurs des bêta-lactamines :

L'Acide Clavulanique, le Tazobactam et le Sulbactam sont structurellement des bêta-lactamines et agissent comme des inactivateurs ou des « inhibiteurs suicides » des bêta-lactamases de classe A. (**Balsalobre et al., 2019**)

- Inhibiteurs non bêta-lactamines :

L'Avibactam est un inhibiteur non bêta-lactamine. Sa structure contient un diazabicyclooctaneponté (DBO) et est un inhibiteur réversible covalent à liaison étroite pour la plupart des enzymes. Il est utilisé en association avec des céphalosporines à spectre étendu

(Céftazidime) et il est en cours de développement pour une utilisation avec la Céftaroline et l'Aztréonam. (Balsalobre et al., 2019)

Tableau 2 : Association d'un inhibiteur de bêta-lactamase avec un antibiotique bêta-lactame (Nèche , 2021)

Type d'inhibiteur	Inhibiteur de la β -Lactamase	Antibiotique β -lactamine
Bêta-lactamines	Acide Clavulanique	<u>Amoxicilline</u>
		Ticarcilline
	Sulbactam	Ampicilline
	Tazobactam	Piperacilline
Ceftolozane		
Non bêta-lactamines	Avibactam	Ceftazidime

4. Les glycopeptidiques :

Les antibiotiques glycopeptidiques sont une classe importante d'antibiotiques, Ils agissent principalement sur la synthèse de la paroi par la formation d'un complexe avec le dipeptide terminal (D-alanyl-D-alanine) du peptidoglycane (figure 6). La Vancomycine a été le premier membre de cette classe d'antibiotiques à être découvert par Eli Lilly et approuvé pour une utilisation clinique par la Food and Drug Administration (FDA) en 1958. (Sarkar et Haldar, 2019).

La découverte de la Vancomycine est survenue à un moment où la résistance aux antibiotiques les plus largement utilisés (les β -lactamines) était apparue. Il est toujours vital pour le traitement des infections bactériennes à Gram positif causées par *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile*, résistants à la Méthicilline. (SARM)

Plus tard en 1988, la Teicoplanine qui a été découverte au Centre de recherche Lepetit (Milan, Italie), a été approuvée pour une utilisation en Europe pour le traitement d'infections à Gram positif similaires (Butler et al., 2014)

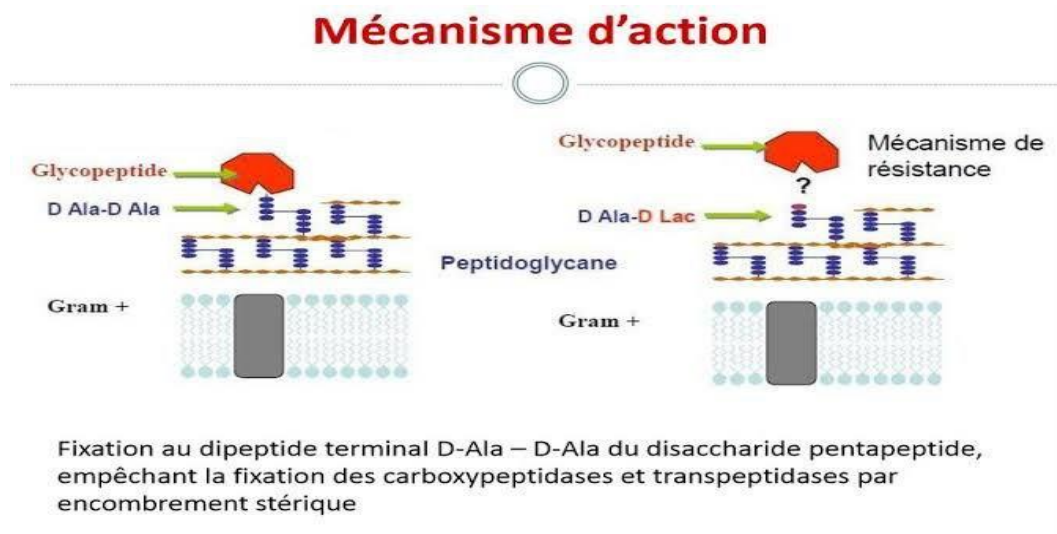


Figure 6: Mécanisme d'action des Glycopeptide (Bidat, 2018)

5. Les macrolides et les chloramphénicols

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

5.1- Macrolides

Le macrolide est une molécule composée d'un grand anneau lactone substitué par un ou plusieurs sucres ou sucres aminés, efficaces contre les bactéries Gram positives. Ils sont habituellement bactériostatiques. (Liang et Han, 2013)

5.2- Chloramphénicol.

Originellement élaboré par *Streptomyces venezuelae*, le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique, à large spectre, mais son emploi reste limité, à cause de sa toxicité. Cette petite molécule inhibe la peptidyl transférase (Il inhibe la synthèse des protéines en se liant de façon réversible aux ribosomes 70S et en particulier aux sous-unités 50S). (Veysièrre, 2020).

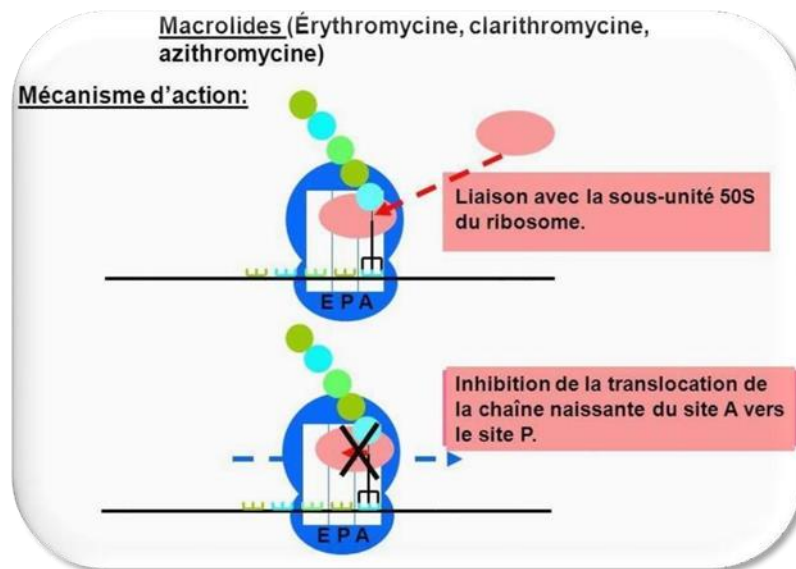


Figure 7: Mécanismes d'action des macrolides (**Microbiologie clinique Powered By : MWL 2022**)

6. Les cyclines

Appelés également tétracyclines à cause de leurs quatre cycles accolés. Dans cette famille on retrouve la Doxycycline, la Lymécycline, la Minocycline et la Tigécycline (disponible seulement dans les hôpitaux).

Les tétracyclines sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité. (Veysièrè, 2020).

On distingue les cyclines naturelles telles que Chlortétracycline (Auréomycine®) et les cyclines semi synthétiques telles que Doxycycline (Vibramycine®).

La Doxycycline a une meilleure activité in vitro et est active sur les souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles. Elle a, de plus, une meilleure absorption digestive et une plus longue durée d'action. (Yala et al., 2001).

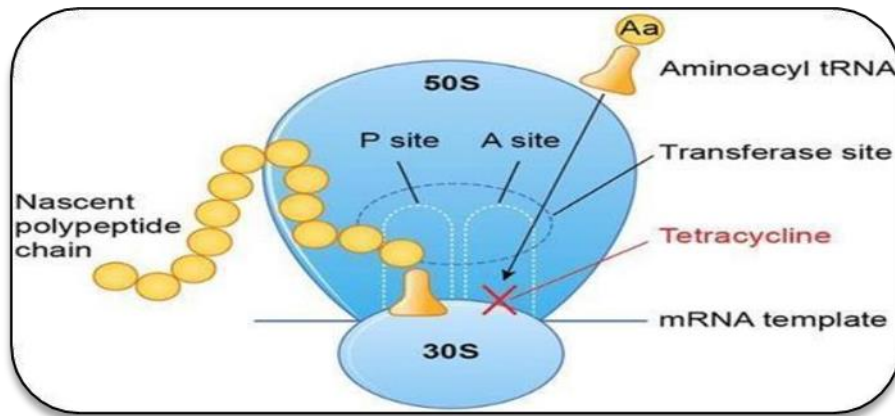


Figure 8: Mode d'action des tétracyclines (National Information Program on Antibiotics, 2023)

7. Association Triméthoprime et Sulfaméthoxazole

Le Triméthoprime est disponible en agent unique ou en association avec le Sulfaméthoxazole (un antibiotique sulfamide). Ces médicaments agissent en synergie pour bloquer les étapes séquentielles du métabolisme de l'acide folique bactérien, Il appartient à la famille des diaminopyrimidines qui sont des antiactériens et des antiparasitaires. (Werth, 2020).

8. Les Rifamycines

Les rifamycines sont constituées d'une macro cycle et d'un cycle aromatique. On distingue trois antibiotiques : La Rifamycine S, la Rifamide et la Rifampicine. Ils agissent en bloquant la transcription par inhibition de l'ARN polymérase (Werth, 2020). La Rifamycine SV et la Rifampicine sont bactéricides ; elles ont une excellente activité sur les germes à Gram positif (*staphylococcus* et *entérocoques*).

9. Les Amino -glycosides

Ces antibiotiques à large spectre, typiquement bactéricides, incluent l'Amikacine, la Gentamicine, la Kanamycine, la Néomycine et la Streptomycine. Ils sont actifs contre les bactéries Gram positives aussi bien que Gram négatives.

Leur effet principal vient de leur fixation à la sous-unité 30S du ribosome, où ils interfèrent avec la synthèse des protéines (Singleton, 2005).

f) Antibiorésistance chez les entérocoques :

Les entérocoques sont responsables d'infection graves communautaires et hospitalières. Parmi une vingtaine d'espèces d'*Enterococcus*, *E. faecalis* et *E. faecium* représentent plus de 95% des isolats cliniques. *E. faecalis* était l'espèce nettement prédominante avec plus de 80% des

souches isolées. L'émergence des entérocoques, en particulier en situation nosocomiale, est volontiers attribuée à l'existence chez ces bactéries de résistances naturelles multiples aux antibiotiques dont les aminosides (à bas niveau), les céphalosporines (à haute niveau), les lincosamides et la Clindamycine (pour *E. faecalis*). A côté de cette résistance naturelle, l'apparition de résistance acquise aux trois grandes classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections à entérocoques qui sont les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides (utilisés en association avec les pénicillines et les glycopeptides) pose de réels problèmes en thérapeutique et à la recherche d'alternatives thérapeutiques (**Courvalin et Leclercq, 2012**). *Enterococcus faecalis* est capable de transférer des plasmides contenant des caractères de résistance aux antibiotiques à d'autres entérocoques et à *Listeria monocytogenes* dans les usines de traitement de l'eau (**Marcinek et al., 1998**).

g) Support génétique de la résistance chez les entérocoques

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

- Résistance naturelle (intrinsèque)

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

- Résistance acquise

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

Tableau 3 : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques (Tremblay, 2012)

Antimicrobiens	Mécanismes de résistance intrinsèque
Bêta-lactamines	Surproduction de PLP de faible affinité et/ou diminution d'affinité pour la liaison des bêta-lactamines.
Aminoglycosides	Membrane cellulaire imperméable, faible entrée, et manque d'une chaîne de transport d'électrons.
Clindamycine et Lincomycine (<i>E. faecalis</i>)	Faible entrée et faible perméabilité.
Quinolones	Faible perméabilité, entrée réduite et environnement anaérobie.
Triméthoprime- Sulfaméthoxazole	Résistance in vivo par l'utilisation de folates exogènes.
Streptogramines A (<i>E. faecalis</i>)	Entrée réduite par transporteur ABC.
Glycopeptides (<i>E.gallinarum</i> et <i>E. casseliflavus</i>)	Présence d'une ligase D-Ala-D-Ser (phénotype Van C).

h) Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques aux antibiotiques

La recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, les bactéries ont montré qu'elles pouvaient devenir résistantes aux antibiotiques. Cette capacité est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie (Berche et al., 1988).

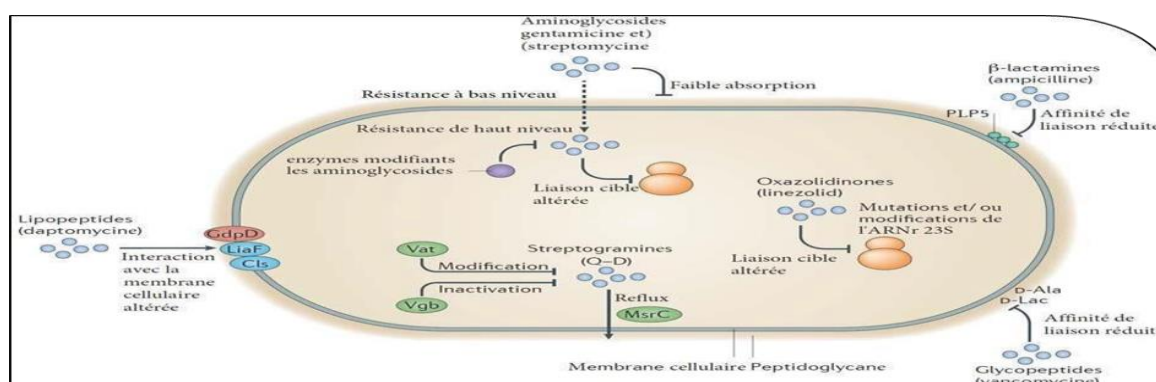


Figure 9 : Mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques (Arias et Murray, 2012).

1. Résistance des entérocoques vis à vis des β -lactamines

Les entérocoques sont beaucoup plus résistants de façon intrinsèque, envers les antimicrobiens que d'autres bactéries à Gram-positif cliniquement importantes. Bien que la raison de cette observation soit encore mal connue, mais cela est probablement dû à leur besoin de survie, et de persistance dans des écosystèmes hautement compétitifs et potentiellement défavorable, tels que le tractus gastro-intestinal (Tannock et Cook, 2002).

- **Résistance naturelle « intrinsèque »**

Les entérocoques présentent une résistance intrinsèque aux céphalosporines, et une sensibilité étendue (Fontana *et al*, 1994). En revanche, la résistance à la pénicilline est principalement liée à des mutations ou à la surproduction de la pbp5, qui est une protéine liant la pénicilline (Arias et Murray, 2012).

- **Résistance acquise « extrinsèque »**

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines inhibent la croissance des bactéries, en servant de substrat de suicide pour la D-transpeptidase (également connu sous le nom de protéine de liaison à la pénicilline ou PLP), qui catalysent la réticulation des chaînes peptidiques latérales du peptidoglycane au cours de la synthèse de ce dernier. Une fois modifiés par un antibiotique de type bêta-lactame, les PLPs sont inactivées, ce qui empêche la synthèse continue de la paroi cellulaire (Shepard et Gilmore, 2002).

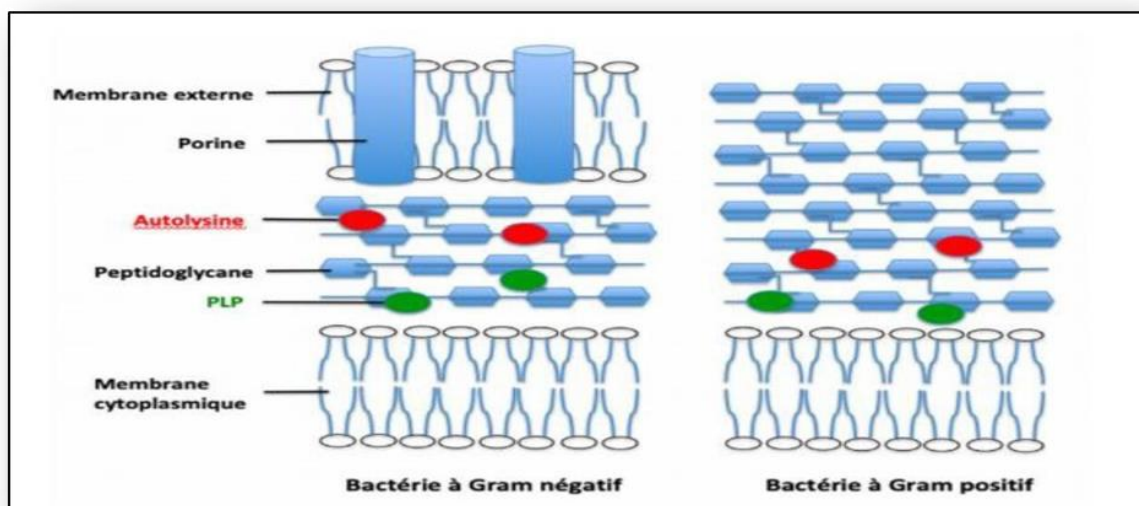


Figure 10 : Structure de la paroi bactérienne (Emilie Cardot Martin *et al.*, 2019)

1.1- Résistance naturelle aux Pénicillines

Les entérocoques sont moins sensibles aux Pénicillines G et A que les streptocoques (leurs CMI habituelles sont comprises entre 1 mg/l et plus de 8 mg/l, contre 0.1 mg/l pour la plupart des Streptocoques du groupe D). Ceci est dû au fait que les entérocoques expriment des PLP de bas poids moléculaires de plus faible affinité pour les bêta-lactamines. Dans les infections graves à entérocoques, il faudra donc utiliser ces antibiotiques en association avec un antibiotique d'une autre famille. La Pipéracilline, l'imipenème, l'association Amoxicilline-Acide Clavulanique n'apportent pas de gain d'activité sur les entérocoques par rapport aux pénicillines A. Enfin, les entérocoques sont naturellement résistants aux pénicillines M (**Frency et al. 1994 ; Jehl et al. 2000, Facklam et al. 2003 ; Kauffman, 2003**).

1.2- Résistances naturelle aux céphalosporines

Les entérocoques sont naturellement résistants aux céphalosporines. L'utilisation massive de cette famille d'antibiotique est probablement un des mécanismes expliquant l'émergence actuelle des entérocoques comme pathogènes hospitaliers.

2. Résistance des entérocoques vis-à-vis des glycopeptides

L'utilisation intensive de la Vancomycine, des céphalosporines de troisième génération et des lactames similaires, présentent le facteur de risque le plus important pour l'apparition de l'ERV « Entérocoques Résistants à la Vancomycine » (**Edmond et al, 1995**). A présent, il existe neuf groupes de gènes conférant une résistance aux glycopeptides (*Van A, Van B, Van C, Van D, Van E, Van F, Van G, Van L, Van M, Van N*), ils ont été décrits chez la plupart des espèces des entérocoques (**Werner, 2012**). Huit résultent d'une résistance acquise (*VanA, B, D, E, G, L, M et N*) et un résulte d'une résistance intrinsèque chez *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (*Van C*) (**Courvalin et Leclercq, 2012**).

Le type prédominant de la résistance est « Van A », il est hautement transférable à d'autres pathogènes, il fait partie du dérivé de transposon « Tn3 » qui a été trouvé dans des plasmides conjugatif de différentes familles (**Frietas et al , 2013**).

Tableau 4 : Différents phénotypes de résistance des entérocoques (**Bryskier, 1999**).

Génotype	<i>Van A</i>	<i>Van B</i>	<i>Van C-1</i>	<i>Van C-2</i>
Phénotype	<i>Van A</i>	<i>Van B</i>	<i>Van C</i>	<i>Van C</i>
CMI (mg/l) Vancomycine	64 >1000	4-1000	2-32	2-32
CMI (mg/l) Téicoplanine	16-512	0.5-1	0.5-1	0.5-1
Support génétique	Plasmidique	Chromosomique	Chromosomique	Chromosomique
Expression	Inductible	Inductible	Constitutive	Constitutive
Transférabilité	+	+	-	-
Espèces	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>

3. Résistance des entérocoques vis-à-vis des tétracyclines :

La résistance à la Tétracycline chez les entérocoques peut être conférée par divers gènes, et divers mécanismes d'efflux actif qui sont codés par les deux gènes «tet (K) » et «tet (L)».

Le mécanisme de la protection ribosomale codé essentiellement par les gènes «tet (M)», «tet (O) » et «tet (S) » ainsi qu'un autre mécanisme qui reste pour l'instant inconnu et codé par le gène «tet (U) ». (**Chopra et Roberts, 2001**). Ces transposons sont très abondants chez les entérocoques d'origine alimentaires, c'est pourquoi la résistance aux tétracyclines chez les entérocoques est fréquemment liée à la présence du gène «tet (M)», qui confère une grande protection ribosomale (**Haack et Andrwes, 2000**). D'autres gènes apparentés offrent une protection ribosomale, ont également été décrits, certains d'eux codent pour des protéines qui se lient au ribosome et modifie la conformation de ce dernier, et empêche la fixation de la tétracycline. (**Leclercq .1997**).

4. Résistance des entérocoques vis-à-vis de la Daptomycine

Le mécanisme de résistance décrit chez l'espèce *E. faecalis*, consiste en une modification du site de fixation de la Daptomycine. Contrairement aux souches sensibles, la Daptomycine est incapable de se fixer au niveau du septum (site de fixation préférentiel), sur les souches résistantes. La fixation se fait alors en périphérie de la bactérie, rendant la Daptomycine inefficace (Tran et al., 2013). Tandis que, la résistance à la Daptomycine chez *E. faecium*, entraîne un épaissement de la membrane bactérienne, une augmentation de la charge et une diminution de la dépolarisation de la membrane au contact de la Daptomycine (Reissier et al., 2016).

5. Résistance des entérocoques vis-à-vis des macrolides lincosamide-streptogramine

Les antibiotiques MLS constituent un traitement alternatif pour le traitement des infections entérococcique insidieuses (Portillo et al., 2000).

- **Mécanisme de modification**

C'est un mécanisme qui modifie une cible donnée, il se fait par une altération de l'ARNr 23S en conférant une large résistance croisée aux antibiotiques macrolides- lincosamide-streptogramine (MLS).

- **Mécanisme d'inactivation**

C'est un mécanisme qui confère une résistance spéciale aux antibiotiques (MLS) structurellement apparentées.

- **Mécanisme d'efflux actif**

Les lincosamides inhibent la synthèse protéique, en se fixant au ribosome bactérien. Certaines espèces de bactéries à Gram positif, présentent une résistance naturelle aux lincosamides, c'est le cas d'*Enterococcus faecalis*, cette résistance naturelle est associée au gène « Isa » qui code pour une protéine apparentée à une pompe d'efflux de type « ABC transporteur ». Ce type de résistance naturelle est également observé pour d'autres espèces d'entérocoques comme *E. avium*, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*. (Agrane, Akhmoum, 2023).

Tableau 5 : La résistance de l'espèce *E. faecium* aux principales familles d'antibiotiques.
(Alili, 2020)

Antibiotiques	Mécanismes d'action (par inhibition)	Résistance
β-lactamines	Synthèse de paroi bactérienne.	Naturelle (bas niveau)
		Acquise (haut niveau)
Glycopeptides	Synthèse de paroi bactérienne.	Acquise (haut niveau)
Fosfomycine	Synthèse de paroi bactérienne.	Naturelle (bas niveau)
Quinolones	Synthèse de l'acide nucléique.	Naturelle (bas niveau)
		Acquise (haut niveau)
Aminosides	Synthèse de l'acide nucléique	Naturelle (bas niveau)
		Acquise (haut niveau)
Rifampicine	Synthèse de l'acide nucléique.	Acquise
Sulfamides	Synthèse de l'acide nucléique.	Naturelle
MLS	Synthèse des protéines	Acquise
Linézolide	Synthèse des protéines	Acquise
Phénicolés	Synthèse des protéines	Acquise
Acide fusidique	Synthèse des protéines	Acquise
Tétracyclines	Synthèse des protéines	Acquise
Glycylcyclines	Synthèse des protéines	Acquise
Oxazolidinones	Synthèse des protéines	Acquise

9. Virulence des entérocoques

a) Définition d'un facteur de virulence

Un facteur de virulence est défini comme toute substance, protéine, glycoprotéine ou lipide, exprimée ou sécrétée par la bactérie, capable d'accroître la capacité à provoquer certaines pathologies données. Sa présence n'est pas toujours obligatoire car il n'est pas indispensable à la survie de la bactérie, mais il réduit le potentiel virulent lorsqu'il n'est pas présent (**Casadevall et Pirofski, 2001**). Les facteurs de virulences jouent un rôle essentiel dans la pathogénicité des souches d'entérocoques (**Braik et al., 2019**).

b) Les Facteurs de virulence des entérocoques

A présent, il est largement admis que la virulence d'un organisme est déterminée par les gènes qui le codent, situés dans des régions spécifiques du génome appelées « îlots de pathogénicité » (**Upadhayaya et al., 2009**).

Les entérocoques adhèrent aux cellules hôtes en raison d'un certain nombre de facteurs qui permettent la colonisation, l'invasion des tissus, et la modulation du système immunitaire causant des dommages et des lésions par des toxines entérocoquiques (**Fiore et al., 2018**).

Deux groupes majeurs de facteurs de virulence ont été isolés et caractérisés, le premier type est caractérisé essentiellement par des facteurs de virulence provoquant et favorisant la colonisation de la surface des cellules de l'hôte. Tandis que, le deuxième type comprend les agents sécrétés par les entérocoques qui endommagent les tissus cellulaires (**Sava et al., 2010; Boussouar, 2017**).

➤ Facteurs de virulence sécrétés

• Cytolysine

Les cytolysines ou β -hémolysines (bactériocines) sont des toxines bactériennes qui ont des propriétés β -hémolytiques chez l'homme et sont bactéricides contre d'autres bactéries à Gram positif (**Hallgren et al., 2008**). Cette toxine peptidique lyse les cellules animales en créant des pores dans la membrane cellulaire.

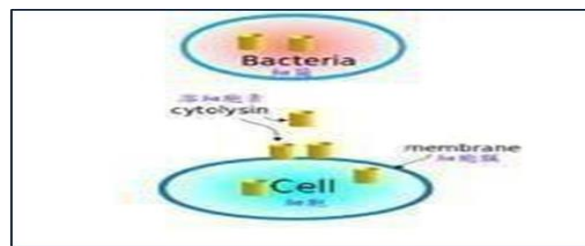


Figure 11 : Production de la toxine Cytolysine à partir d'une souche bactérienne (**Skals et al, 2013**)

- **Gélatinase**

La Gélatinase est l'un des facteurs de virulence largement étudiés chez *E. faecalis* (Del Papa et al., 2007). Il s'agit d'une métalloprotéase de zinc qui peut hydrolyser la β -insuline, la gélatine, le collagène, la caséine et l'hémoglobine (Jett et al., 1994 ; Fisher et al., 2009). En outre, la Gélatinase contribue au processus de formation de biofilm, ce qui peut accroître la capacité des entérocoques à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (Del Papa et al., 2007).

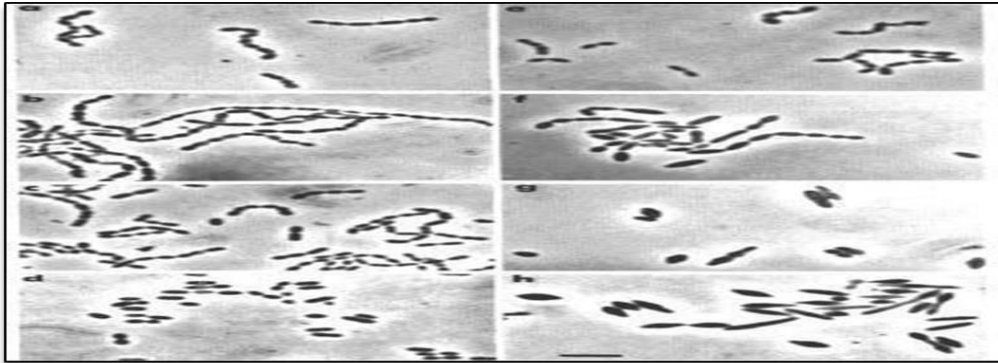


Figure 12: Souches bactériennes productrices de la Gélatinase en microscope photonique (Roselyn, 1973)

- **Hyaluronidase**

C'est une enzyme qui dégrade l'hyaluronane, un composant majeur de la matrice extracellulaire des cellules animales (Kayser, 2003). Cette enzyme dépolymérise la fraction mucopolysaccharides du tissu conjonctif, facilitant ainsi la propagation des entérocoques et de leurs toxines à travers les tissus de l'hôte.

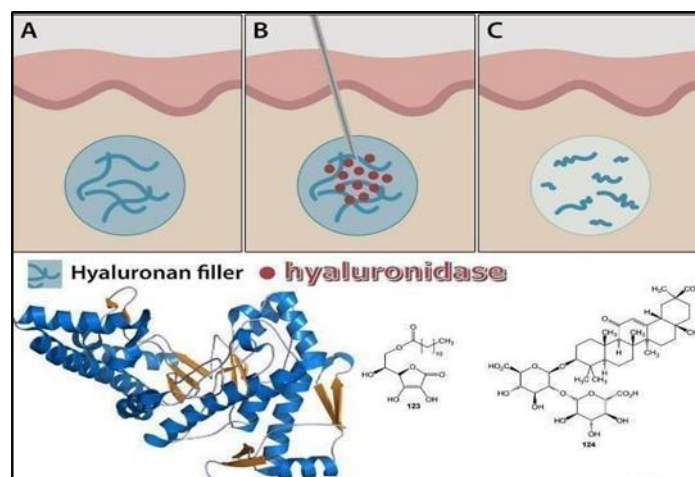


Figure 13 : Structure chimique de facteur de virulence bactérien l'hyaluronidase (Ruhel et Kataria, 2021)

- **Phéromones sexuelles**

Les phéromones sont de petits peptides de 7 à 8 acides aminés qui facilitent le transfert de plasmides entre les cellules. Les bactéries sécrètent de nombreuses phéromones différentes, spécifiques au donneur. Elles peuvent aussi être chimiquement attractives pour les neutrophiles humains et induire la production de superoxydes (substances mutagènes) et initier des conditions inflammatoires (**Bhardwaj, Malik, et Chauhan, 2008**).

➤ **Facteurs de virulence liés à la membrane**

- **Substances agrégatives (SA)**

Ce sont des adhésines glycoprotéiques ancrées dans la surface cellulaire et codées par des gènes portés sur des plasmides conjugatifs répondants aux phéromones. La formation d'agrégats au cours de la conjugaison, facilite le transfert des plasmides sur lesquelles les gènes des substances agrégatives sont localisés, ainsi que l'adhérence aux surfaces des cellules eucaryotes (**Koch et al., 2004**).

- **Protéines de surface extracellulaire**

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

- **Formation de biofilm**

Les biofilms sont un facteur important dans la pathogenèse des infections à entérocoques (**Creti et al., 2004**). *E. faecalis* a la faculté de former du biofilm (**Naber et al., 2000**), ce qui lui permet de survivre dans un environnement hostile, particulièrement en présence d'antibiotiques. (**Figure 14**).

Le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux ; véritables « canaux », ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation (**Lawrence et al., 1991**). Ainsi, le biofilm n'est

pas un milieu homogène, mais un environnement structuré qui présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales (**Stoodley, Debeer et Lewandowski, 1994 ; Sutherland, 2001**).

La formation du biofilm passe par (figure 14) :

-L'adhésion d'agrégats de bactéries sur ces surfaces.

-La formation de micro-colonies par les premières bactéries qui ont colonisé la surface et la sécrétion de matrice extracellulaire composée de polymères d'exopolysaccharides, d'ADN et de protéines.

-La maturation du biofilm par la croissance des micro-colonies.

-La dispersion des bactéries du biofilm mature pour coloniser d'autres surfaces et recommencer le cycle (**Veerachamy, Yarlagadda et al. 2014**)

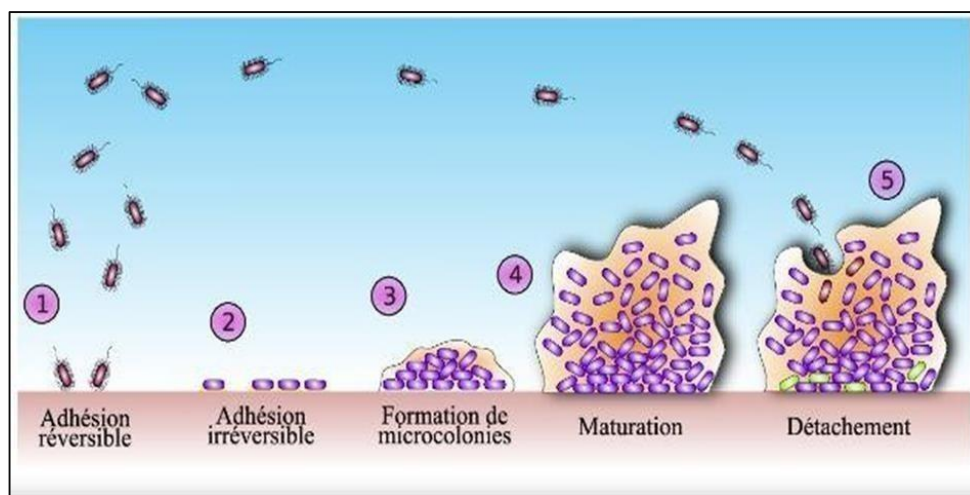


Figure 14 : Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide (**Douarche et al., 2018**)

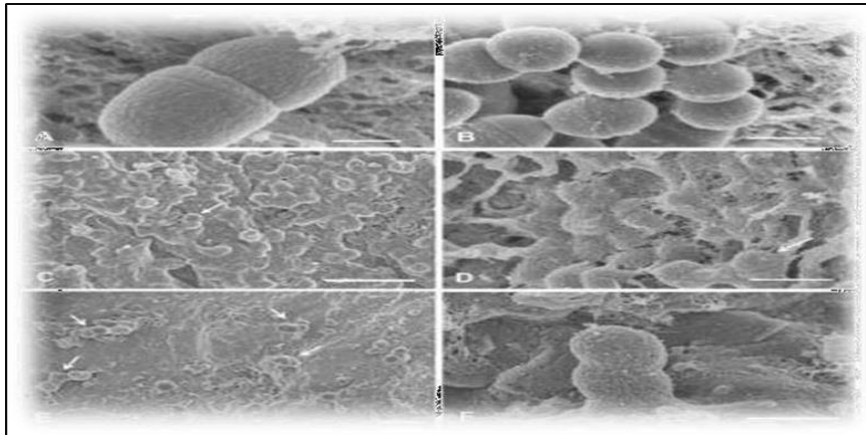


Figure 15 : Production de biofilm par une souche d'*E. faecalis* dans un tissu valvulaire. Image obtenue par comptage sur plaque en microscopie électronique à balayage à haute résolution (FESEM) (Chuang-Smith et al., 2010) .

10 . Applications des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries lactiques qui jouent plusieurs rôles dans différents domaines d'application (alimentaire, santé, environnement etc.) (Hanachi, 2018).

a) Indicateurs de contamination fécale

Leur recherche dans le milieu hydrique présente un intérêt certain, car leur comportement diffère nettement de celui des coliformes. Leur caractère de cocci Gram+ leur confère une capacité à survivre dans des conditions environnementales variées, notamment en présence de sel et de températures élevées. Leur présence dans l'eau peut donc être utilisée comme indicateur de la qualité de l'eau et de la santé de l'écosystème marin, ce qui permettrait la mise en évidence de pollution plus ancienne (Hade, 2003).

b) Utilisation des entérocoques comme probiotiques

Les probiotiques peuvent être définis comme étant « une préparation ou un produit contenant une culture simple ou mixte des microorganismes viables, en concentration définie et suffisante ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante et adéquate ». (De Vuyst et al., 2004 ; Braiek et al., 2019). Les probiotiques sont des additifs qui tirent bénéfice chez les animaux et les humains en améliorant l'équilibre de la fonction de barrière intestinale, la réduction des troubles gastro-intestinaux, la modulation de l'immunité, la perception de la douleur et l'amélioration de la valeur nutritionnelle. (Ziggers, 2001 ; Braiek et al., 2019).

Les bactéries lactiques sont les plus couramment employées en tant que probiotiques, ces derniers incluent les genres bactériens suivants : *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* ainsi

que des levures telles que *Saccharomyces*. Ces deux espèces *E. faecium* et *E. faecalis* sont utilisées dans les préparations probiotiques humaines. *E. faecalis* est également utilisé comme complément alimentaires (**Champagne et al., 2008**).

c) Applications des entérocoques dans les aliments

Les entérocoques peuvent avoir un effet bénéfique ou nuisible sur les aliments. Ils peuvent causer une détérioration ou participer au processus de maturation et d’aromatisation de certains aliments en contribuant à l’émergence de qualités organoleptiques telles que le goût et l’arôme. (**Semedo et al., 2003 ; Devriese et al., 2006 ; Braiek et al., 2019**).

De ce fait, selon **Aguilar et al, (2012)** il existe plusieurs objectifs à l’ajout de ces micro-organismes dans les aliments tels que :

- Prolongation de la durée de vie des aliments ;
- Diversité de produits par la modification de la matière première ;
- Inhibition des pathogènes permettant d’améliorer la sécurité alimentaire ;
- La contribution au développement de la saveur des aliments ;
- Impact bénéfique sur la microflore 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 6 :

Tableau 6 : Principales sources d’*Enterococcus* spp. dans les aliments (**Aguilar- Galvez et al., 2012**).

Groupe d’aliments	Produits alimentaires
Produits laitiers	Lait cru de vache, de chèvre et de brebis Fromages traditionnels à pâte mi-dure.
Viandes et poissons	Saucisses/Produits carnés traditionnels fermentés Poissons fermentés Poulets/Muscles de poisson Fruits de Mer

Produits végétaux	Olives vertes Ensilages d'herbes Légumes fermentés : sorgho, soja Chicorée fraîche Gaine de soja
--------------------------	---

11. Les Bactériocines

Le terme « Bactériocine » fut utilisé pour la première fois en 1964 par André Lwoff, médecin et biologiste français. (Jack RW, Tagg JR, Ray B., 1995).

❖ Définition

Une bactériocine est une toxine spécifique produite par une bactérie et émise dans le milieu où elle vit afin de se protéger, favorisant ainsi sa propre croissance au détriment des autres bactéries présentes dans le milieu. Il s'agit d'un peptide antimicrobien qui tue ou bloque le développement d'autres bactéries. Elles peuvent, par exemple, être synthétisées en réponse à un environnement défavorable afin que la bactérie productrice survive. Cela lui confère un avantage sélectif vis-à-vis des autres populations bactériennes. (Dillenseger, H. L. 2019) Selon Todd Klaenhammer, qui a donné la définition la plus largement utilisée (1988), « les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Elles représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre et mode d'action ». Généralement les bactériocines produites par des bactéries Gram positif sont inhibitrices d'autres souches Gram positif, et sont moins efficaces contre les souches Gram négatif. Les bactériocines sont spécifiques de la bactérie productrice, par exemple la Colicine pour *Escherichia coli* (Jack RW, Tagg JR, Ray B 1995), la Pyocine de *Pseudomonas aeruginosa*, la Vibriocine de *Vibrio cholerae*, la

Staphylococcine de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, ou encore la Nisine de *Lactococcus lactis*. (Dillenseger, H.- L, 2019)

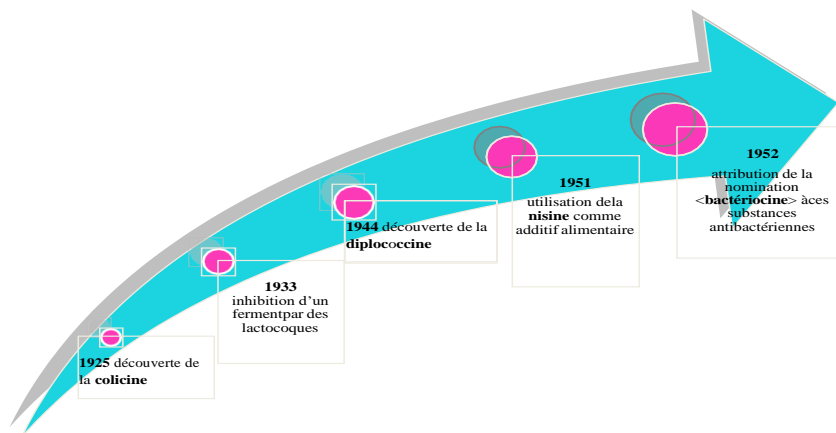


Figure 16 : Historique de la découverte des bactériocines (Kamar, 2019)

- **Classification**

Todd Klaenhammer a proposé, en 1993, une classification, les répartissant en 4 classes selon leur structure peptidique, leur poids moléculaire, leur mode d'action, et leurs propriétés biochimiques. (C Dortu, P Thonart, 2009)

- ✓ **La Classe I**

Se compose des « Lantibiotiques ». Les peptides ont une taille inférieure à 5kDa, sont stables à la chaleur, et contiennent des acides aminés soufrés formés post- traductionnellement (lanthionine, déhydroalanine, déhydrobutyrine...). Cette Classe I peut être divisée en 2 sous-classes Ia et Ib selon la charge des peptides. (C Dortu, P Thonart, 2009).

- ✓ **La Classe II des bactériocines**

Comprend des peptides de poids moléculaire inférieur à 10 kDa, résistants à la chaleur et sans acides aminés modifiés. Elle est subdivisée en trois sous-classes. La sous-classe IIa est caractérisée par des peptides de 27 à 48 acides aminés. Ces bactériocines sont toutes actives contre *Listeria monocytogenes* et peuvent avoir un second pont disulfure dans leur partie C-terminale, ce qui les rend plus stables et efficaces. La sous-classe IIb nécessite l'association de deux peptides pour être active, soit de manière synergique, soit en augmentant mutuellement leur activité. Enfin, la sous-classe IIc regroupe les bactériocines qui ne rentrent pas dans les sous-classes IIa et IIb. (C. Dortu, P. Thonart, 2009)

✓ La Classe III

Contient les bactériocines de poids moléculaire supérieur à 30kDa et sensibles à la chaleur. Elle ne se compose que de 4 molécules qui sont l'Helvéticine J, l'Entérolysine A, la Zoocine A, et la Millericine. (C Dortu, P Thonart, 2009).

✓ Classe IV

Est constituée des peptides nécessitant une partie lipidique ou carbohydratée pour avoir leur activité. A ce jour, aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite. (C Dortu, P Thonart, 2009).

• Production - Mode d'action

Le siège de l'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle la majorité des bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries à Gram négatif, du fait qu'elles n'arrivent pas à franchir la membrane externe sauf dans de rares cas. Cependant, même si le siège d'activité est le même, les mécanismes d'action diffèrent selon les classes des bactériocines. (Kamar, 2019). Les bactériocines ont différents mécanismes d'action. Soit elles vont altérer la perméabilité membranaire des bactéries, soit inhiber la synthèse de leurs peptidoglycanes, soit encore agir en détruisant les liaisons peptidiques entre les peptidoglycanes.

✓ Les « Lantibiotiques »

C'est-à-dire les bactériocines de Classe I, interagissent avec les membranes cellulaires par interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques. Ces interactions permettent de former des pores larges et non-spécifiques à la surface des cellules cibles, causant un efflux rapide des composés cytoplasmiques (ions, ATP, acides aminés...). Elles détruisent donc les bactéries en augmentant leur perméabilité membranaire. (C Dortu, P Thonart, 2009).

✓ Les bactériocines de la classe II

Agissent de la même manière, en provoquant la perméabilisation de la membrane, ce qui conduit à la mort des cellules.

✓ la classe III

Pour cette classe, le mode d'action est complètement différent. En effet, elles agissent par hydrolyse des liens peptidiques entre les peptidoglycanes de la membrane des bactéries sensibles. Selon le nombre de bactéries sensibles, le spectre d'action des bactériocines est

plus ou moins large (étroit pour la Zoocine A, large pour l'Entérollysine A et la Millericine B. (C. Dortu, P. Thonart, 2009).

Les bactériocines étant pour la plupart inodores, sans goût, et surtout non toxiques, elles ont été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) en tant qu'élément « bio- préservatif » alimentaire car elles ont le statut **GRAS** (Generally Regarded As Safe). De nos jours elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation des denrées. (Dillenseger, H.-L, 2019)

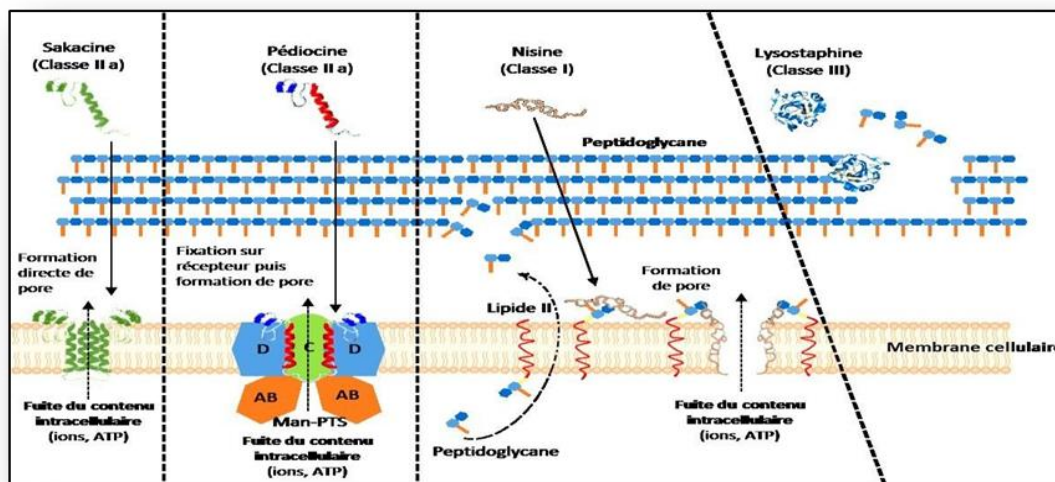


Figure 17 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram+ (Fernandez,2014)



Chapitre II : Matériel et méthodes

II - Matériel et méthodes

Ce travail s'articule autour de plusieurs objectifs clés. Tout d'abord, il vise à évaluer la résistance aux antibiotiques des entérocoques provenant de six sites distincts, afin de mieux comprendre leur capacité à faire face à des agents antibactériens. De plus, on a analysé le profil de résistance de ces entérocoques, ce qui permettra d'identifier les schémas de résistance prédominants au sein de ces populations bactériennes. En parallèle, ce travail cherche à déterminer également certaines caractéristiques spécifiques, telles que leurs effets virulents et la synthèse de bactériocines. Ces bactériocines pourraient être exploitées pour leur potentiel en tant que conservateurs naturels.

La collecte des échantillons a été faite lors d'une sortie réalisée le 21 février 2024.

II-1-Présentation des zones d'études

Des échantillons d'eau de mer et de sédiments ont été collectés au niveau de six sites distincts le long du littoral. Deux sites étaient situés à l'Est de la baie d'Alger, trois à l'Est de la baie de Bousmail, et un à Ain Taya.

La baie d'Alger est située dans la partie centrale de la côte algérienne entre les longitudes Est : de 03°01'00" E à 03°14'30" E et les latitudes Nord : de 36°44'30" N à 36°49'15" N. De forme semi-circulaire et avec une superficie approximative de l'ordre de 180 Km², elle s'inscrit au creux dans la plaine de La Mitidja. Elle est délimitée par deux caps, La Pointe Pescade (Rais Hamidou) à l'Ouest et le cap Matifou (Tamentfoust) à l'Est ainsi que par la Méditerranée occidentale au Nord. Deux Oueds se déversent dans la baie d'Alger, ce sont Oued El Hamiz et Oued El Harrach.

La baie de Bousmail est située dans la partie centrale du littoral algérien, à 50 km à l'Ouest d'Alger dans la wilaya de Tipaza, entre 2°25' à l'Ouest et à 2°55' à l'Est. La baie est limitée par de la pointe de Cap Caxine (Ras Acrata) à l'Est de Sidi-Fredj, et par le Mont **Chenoua** à l'Ouest, par la plaine de la Mitidja au Sud et la mer méditerranéenne au Nord. Cette baie couvre une surface de l'ordre de 350 Km². (**Braik, 1989, in Haddouche, 2003**). La baie est le réceptacle d'oueds à régime irrégulier : Mazafran, Nador et Béni-messous. (**Khaouni, 2003**).

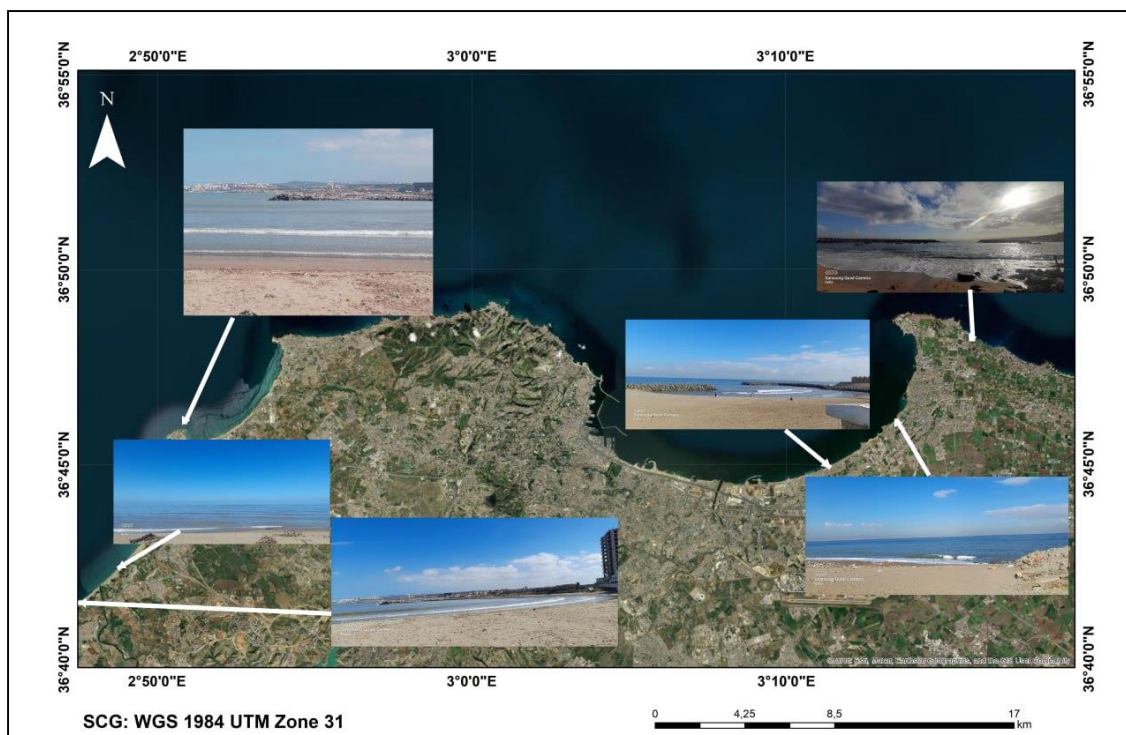


Figure 18: Situation géographique des sites de prélèvement élaboration personnelle (Arc GIS)

➤ Plage d'Ain Taya (Flots Bleus)

La plage d'Ain Taya, située à Ain Chrob dans la commune du même nom, se trouve à 25 km à l'est d'Alger. Elle s'étend sur une longueur de 600 mètres avec une largeur de 10 mètres. Cette plage de type sableuse est un lieu propice à la baignade, où les eaux claires de la Méditerranée invitent à la détente. Avec une latitude de $36^{\circ}47'17.054''$ et une longitude de $3^{\circ}18'56.183''$, elle bénéficie d'une position géographique privilégiée. Son altitude de 17 mètres offre une vue imprenable sur le littoral algérien. On y trouve même une ferme conchylicole.



Figure 19: Plage d'Ain Taya (Flots bleus)

➤ Plage Bateau cassé

La plage Bateau Cassé est située à proximité des localités de Stamboul et Ben Mered, ainsi que de Bordj El Kiffan à l'est d'Alger. Avec une longueur de 1119 mètres et une largeur de 72 mètres, elle fournit un espace généreux pour les visiteurs. Son emplacement géographique précis est marqué par une altitude de 2 mètres, avec une latitude de $36^{\circ}46'2.147''$ et une longitude de $3^{\circ}13'25.504''$. Au niveau de cette plage se trouve la nouvelle station de dessalement d'eau de mer : « Bateau cassé ».



Figure 20 : Plage Bateau Cassé



Figure 21 : Station de dessalement de l'eau de mer à proximité de la plage Bateau cassé (Elwatan.dz.2023)

➤ Plage la Sirène II

La plage de la Sirène II, située à Bordj El Kiffan, est une étendue de sable fin autorisée à la baignade. Avec une longueur de 134 mètres et une largeur de 45 mètres, elle offre aux visiteurs une superficie généreuse de 9000 mètres carrés. Cette plage de typologie sableuse est ouverte, offrant ainsi un accès facile aux eaux cristallines de la Méditerranée. Sa latitude est de $36^{\circ}44'59.66''$ et sa longitude est de $3^{\circ}11'15.751''$, avec une altitude de 14 mètres.

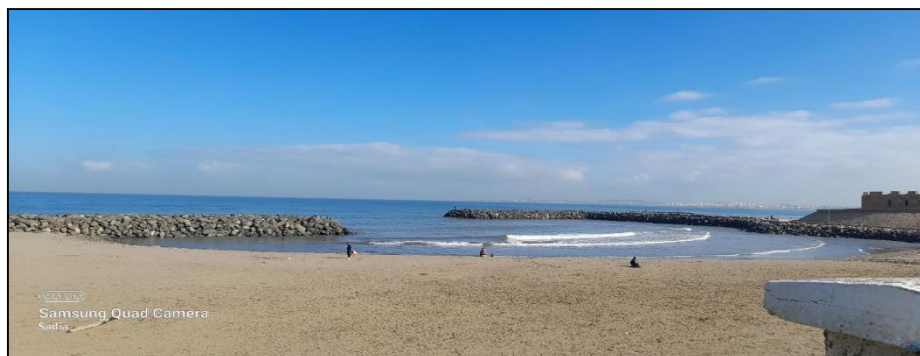


Figure 22: La plage la Sirène II

➤ Plage Kheloufi I

La plage Kheloufi I, s'étendant le long de la mer Méditerranée et occupe la 8ème place parmi les 15 plages de la région d'Alger, à une distance de 23,8 km du centre-ville. Nichée dans le quartier de Mazafran, à seulement 0,9 km de son centre, cette plage offre 800 mètres de sable fin à grossier. À noter également que l'oued Mazafran se trouve à l'ouest de cette plage. Ses coordonnées géographiques sont $36^{\circ} 42' 11.069''$ de latitude et $2^{\circ} 48' 35.266''$ de longitude et 21m d'altitude.



Figure 23 : Plage Kheloufi I

➤ Plage Colonel Abbas

La plage Colonel Abbas, s'étendant sur 3 km, est une destination emblématique de Douaouda Marine, avec son sable fin. Malheureusement l'embouchure de l'oued Mazafran se trouve au niveau de cette plage. Ses coordonnées géographiques sont $36^{\circ}41'30.748''$ de latitude et $2^{\circ}47'37.64''$ de longitude avec une altitude de 21 mètres.



Figure 25 : Plage de Colonel Abbas

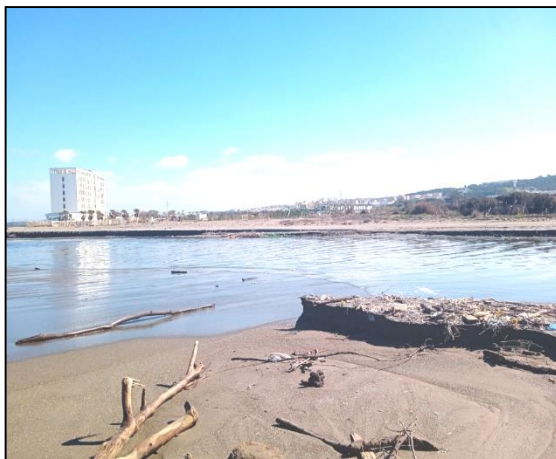


Figure 24 : Confluence de l'oued Mazafran à la plage Colonel Abbas

➤ Plage Sidi Fredj Est

Elle est située sur la côte méditerranéenne, à 19 km du centre d'Alger, La plage est à proximité du Phare de Sidi Fredj, du Port de plaisance de Sidi Fredj ainsi que de l'hôtel Riadh. Elle se trouve à 26 km à l'ouest du centre-ville d'Alger. Distant de 750 mètres de sa jumelle, la Plage Sidi Fredj Ouest. De l'autre côté de la presqu'île, elle offre un sable fin sur une étendue de 414 mètres de long et de 83 mètres de large, où la baignade est autorisée malgré la proximité du port de plaisance et des complexes hôteliers. Sa latitude est de $36^{\circ} 45' 40.038''$, et sa longitude est de $2^{\circ} 50' 53.051''$.



Figure 26 : Plage Sidi Fredj

II-2- Collecte des échantillons

La collecte des échantillons d'eau de mer au niveau des 6 sites, est effectuée à une profondeur de 20 cm et à une distance de 1 mètre du bord de mer.

Les échantillons sont transportés avec soin pour garantir l'absence de contamination et assurer la précision des analyses. Des flacons stériles d'1 litre sont utilisés et maintenus dans la main près du point de prélèvement avant d'être plongés dans l'eau. Les bouchons sont ouverts sous la surface de l'eau pour éviter toute contamination atmosphérique.

Les sédiments ont été prélevés dans des sachets de congélation stériles afin de prévenir toute contamination.

Chaque échantillon a été soigneusement étiqueté avec la date, l'heure et le site de prélèvement pour assurer une identification précise.

Après la collecte, tous les échantillons ont été acheminés vers le laboratoire dans une glacière et les analyses ont été effectuées peu de temps après le prélèvement, assurant ainsi la qualité des résultats.

II-3-Analyse Microbiologique des Échantillons

II-3-1 Dénombrement des coliformes fécaux et totaux dans l'eau de mer par la méthode de filtration

La méthode de filtration est une approche largement adoptée pour l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau. Elle se caractérise par la filtration d'un volume déterminé, généralement 100 ml, de l'échantillon à travers une membrane filtrante stérile dont les pores ont un diamètre de 0,45 micromètre. Ce processus est effectué au sein d'une rampe de filtration en acier inoxydable, comprenant de 4 à 6 postes, dans des conditions stériles (**Rodier et al. 2009**). Une fois la filtration terminée, la membrane filtrante est délicatement déposée à la surface d'un milieu de culture approprié.

Mode opératoire

Pour chaque échantillon d'eau de mer prélevé à partir des 6 sites, procéder à des dilutions successives jusqu'à obtenir une dilution finale de 10^{-3} et un volume total de 100 ml pour chaque dilution.

Filtrer chaque dilution à travers une membrane filtrante de 0,45 μ m.

Déposer les membranes filtrantes sur le milieu solide Tergitol dans des boîtes de Pétri.

Pour chaque échantillon et dilution, placer une boîte à 37°C et une à 44°C pendant 24 à 48 h pour différencier les coliformes totaux des coliformes fécaux.

Compter les colonies présentes sur les membranes et interpréter les résultats en se référant aux normes Algériennes.

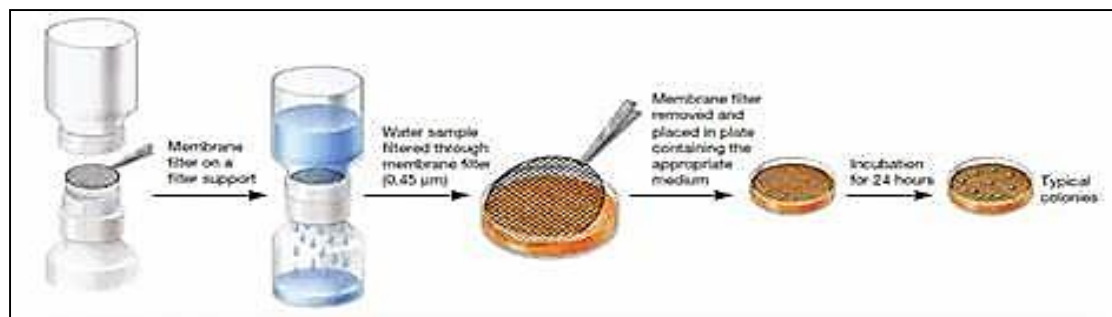


Figure 27 : Schéma représentatif de la méthode de filtration (**Microbiologie-clinique. Constituants. Physiologie bactérienne : Nutrition et Croissance, 2023**)

➤ Mise en évidence de la présence d'*E. coli* dans l'eau de mer

Pour la mise en évidence d'*E. coli*, les colonies jaunes obtenues sur milieu Tergitol sont ensemencées sur milieu Schubert, puis incubées à 44°C pendant 24 heures. La présence de trouble avec production de gaz et l'apparition d'un anneau rouge après l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs déterminent la présence d'*E. coli*.

II-3-2-Dénombrement des entérocoques

➤ Eau de mer

Pour la recherche des entérocoques dans l'eau de mer on a utilisé également la méthode de filtration. Protocole identique à celui employé pour le dénombrement des coliformes.

La membrane est déposée sur le milieu de culture (Slanetz et Bartley). Le dénombrement des colonies obtenues permet d'estimer le nombre d'entérocoques dans l'échantillon d'eau de mer, fournissant ainsi des informations sur la contamination bactérienne et la sécurité sanitaire de l'eau.

La recherche des entérocoques implique deux tests distincts : un test présomptif suivi d'un test confirmatif.

Test présomptif

-Pour chaque échantillon d'eau de mer collecté, effectuer des dilutions séquentielles jusqu'à atteindre une dilution finale de 10^{-3} , tout en assurant un volume total de 100 ml pour chaque dilution, y compris la solution mère.

-Filtrer l'échantillon à travers une membrane stérile de 0,45 micromètre placée dans une rampe de filtration.

-Retirer avec précaution la membrane filtrante une fois la filtration terminée.

-Placer la membrane sur la surface du milieu solide Slanetz et Bartley.

-Incuber les boîtes à 37 C° pendant 24 h.

-Compter les colonies qui se sont développés sur la membrane.

Les streptocoques fécaux apparaissent sous forme de colonies rouges brique ou roses, lisses, un peu bombés.



Figure 28 : La Stérilisation



Figure 29: Dépôt du filtre



Figure 30 : Placer la membrane sur la surface du milieu solide Slanetz et Bartley



Figure 31 : Filtration de l'échantillon

Test confirmatif :

- Pour la confirmation on prend la même membrane et on la dépose sur le milieu BEA
- Incuber les boîtes à une température de 37°C pendant 2 heures.
- Si les colonies deviennent noires : on est en présence d'entérocoques.
- Compter le nombre de colonies noires formées sur la membrane.

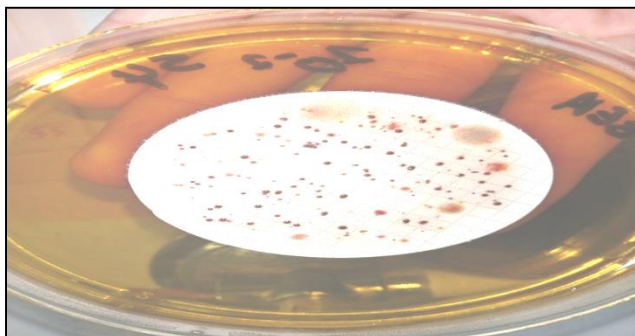


Figure 32 : Dépôt de la membrane sur le milieu BEA

➤ Recherche des entérocoques dans le sédiment par la méthode du nombre le plus probable (N.P.P)

Pour la recherche des entérocoques dans les sédiments, nous avons utilisé la méthode du nombre le plus probable (NPP).

La méthode du NPP repose sur la dilution sériée des échantillons de sédiments dans des milieux de culture spécifiques, permettant l'estimation du nombre le plus probable de bactéries en fonction de la présence ou de l'absence de croissance bactérienne. Cette approche fournit ainsi des données quantitatives précieuses sur la contamination bactérienne des sédiments marins. Elle s'effectue en deux étapes :

1-Test présomptif

Les dilutions sérielles réalisées permettent de créer une gamme de concentrations différentes de bactéries présentes dans les échantillons.

Mode opératoire

Préparation de la série de dilutions : Diluer 1 g de sédiment dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la première dilution.

Continuer la dilution en inoculant 1 ml de la première dilution dans 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une dilution de 10^{-2} . Répéter ce processus jusqu'à obtenir une dilution de 10^{-3} .

Matériel et méthodes

Ensemencement des tubes : Prélever 1 ml de chaque dilution et l'ensemencer dans une série de trois tubes contenant du bouillon Rothe.

Incuber les tubes à une température de 37°C pendant une période allant de 24 à 48 heures pour permettre la croissance bactérienne dans ce bouillon.

2-Test confirmatif

-Prélever 1 ml des tubes où des troubles sont observés.

-Transférer cet échantillon dans des tubes contenant 5 ml de bouillon Litsky. Pour chaque tube positif, effectuer la confirmation en inoculant trois tubes de bouillon Litsky.

-Incuber les tubes à 37°C pendant 24 heures.

-Observer les résultats : si un trouble est présent dans le bouillon Litsky et qu'une pastille violette ou blanche se forme au fond du tube, cela indique un résultat positif.

Les résultats sont rapportés en termes de concentration d'entérocoques par gramme de sédiment, en se référant à la table NPP (Rodier et al, 2000 ; Delarras, 2003)

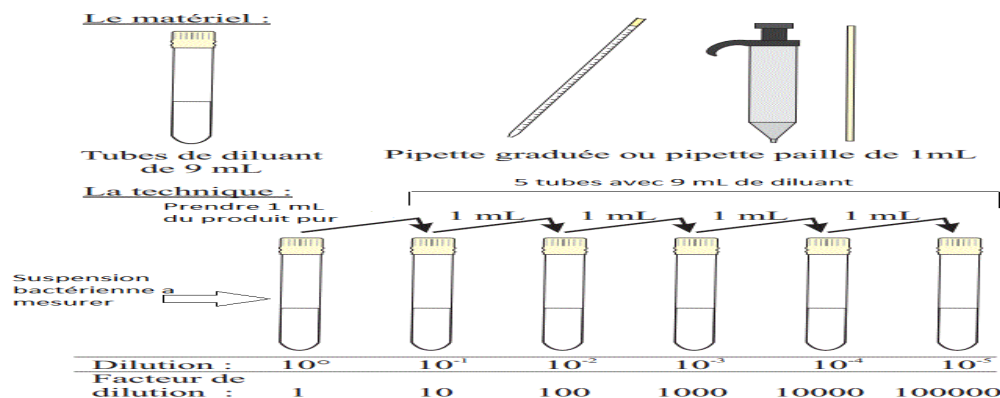


Figure 33 : Schéma représentatif de la méthode NPP (Magniez, 2014)

II-4 Prévalence de la résistance aux antibiotiques des Entérocoques

➤ Dans l'eau

La prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques se réfère à la proportion d'échantillons d'entérocoques qui présentent une résistance aux antibiotiques dans une population donnée. Cette mesure est obtenue en analysant un échantillon représentatif de la population d'entérocoques et en déterminant le pourcentage d'échantillons résistants par rapport au nombre total d'échantillons testés. La prévalence de la résistance aux antibiotiques est un

Matériel et méthodes

indicateur clé pour évaluer la résistance aux antibiotiques dans une communauté ou un environnement spécifique. Elle permet d'orienter les politiques de santé publique et les programmes de lutte contre la résistance aux antibiotiques en identifiant les souches bactériennes les plus préoccupantes et en mettant en place des mesures de prévention et de contrôle appropriées.

L'évaluation des taux de résistance aux antibiotiques des entérocoques a été effectuée par la filtration de 100ml d'échantillon ou de dilution et l'incubation des membranes sur milieu Slanetz et Bartley additionné ou non des antibiotiques suivants à une concentration critique : la Vancomycine (4µg/ml), la Gentamicine (0,5µg/ml), l'Ampicilline (8µg/ml), la Tétracycline (5µg/ml), la Ciprofloxacine (80µg/ml) et l'Azithromycine (0,01g/ml).

L'incubation du milieu est effectuée à 37°C pendant 24-48h.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies rouges ou roses, lisses, légèrement bombées. La confirmation de ces colonies se fait sur gélose BEA additionnée ou non du même antibiotique pendant 2h. Les entérocoques apparaissent noirs.

Calcul du taux de résistance

La prévalence est exprimée par un ratio et a été calculée en divisant le nombre de bactéries obtenues sur le milieu gélosé BEA contenant des antibiotiques par le nombre de bactéries obtenues sur le milieu sans antibiotique.

$$\text{Prévalence (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre de bactéries sur milieu avec antibiotique}}{\text{Nombre de bactéries sur un milieu sans antibiotique}} \right) * 100$$

II-5- Isolement :

Pour obtenir des cultures pures, des isolements ont été réalisées en prenant une colonie préalablement confirmée sur BEA (colonies noires) et en l'ensemencant sur milieu Slanetz. Cette opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

II-6- Identification

II-6- 1- L'identification microscopique des entérocoques

a) Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique de coloration microscopique utilisée en microbiologie, cette méthode permet une classification rapide et précise des bactéries. Elle permet en colorant l'intérieur des bactéries de les différencier selon leur forme (paires, groupes, chaînes...), et leur Gram. Grace aux colorants utilisés, on affine la caractérisation du type de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif et leur morphologie en bacilles ou en coques.

Mode opératoire

- Préparation d'un frottis bactérien : sur une lame de microscope stérile, déposez une goutte d'eau distillée.
- Prélevez 2 à 3 colonies bactériennes avec l'anse de platine stérile.
- Répartissez les colonies sur la lame pour former un frottis.
- Sécher avec une flamme : passez rapidement la lame à travers la flamme du bec Bunsen pour sécher le frottis.
- Fixer le par la chaleur de la flamme.
- Recouvrir la lame avec du violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rincer la lame avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.
- Recouvrir à nouveau la lame avec le lugol pendant 1 minute pour fixer la coloration.
- Rincer à nouveau la lame avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de lugol.
- Plonger la lame dans de l'alcool pendant 30 secondes pour éliminer le violet des bactéries à paroi mince.
- Rincer la lame avec de l'eau distillée pour arrêter la décoloration.
- Recolorer les bactéries décolorées en les plongeant dans de la fuchsine pendant 1 minute.
- Rincer la lame avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de fuchsine.
- Sécher délicatement la lame en la tapotant doucement avec du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle.

-Observer la lame sous un microscope avec un grossissement initial de l'objectif 40, puis augmenter le grossissement à x100 après l'ajout d'une goutte d'huile à immersion.

Les bactéries à Gram positif se colorent en violet, et celles à Gram négatif se colorent en rose.

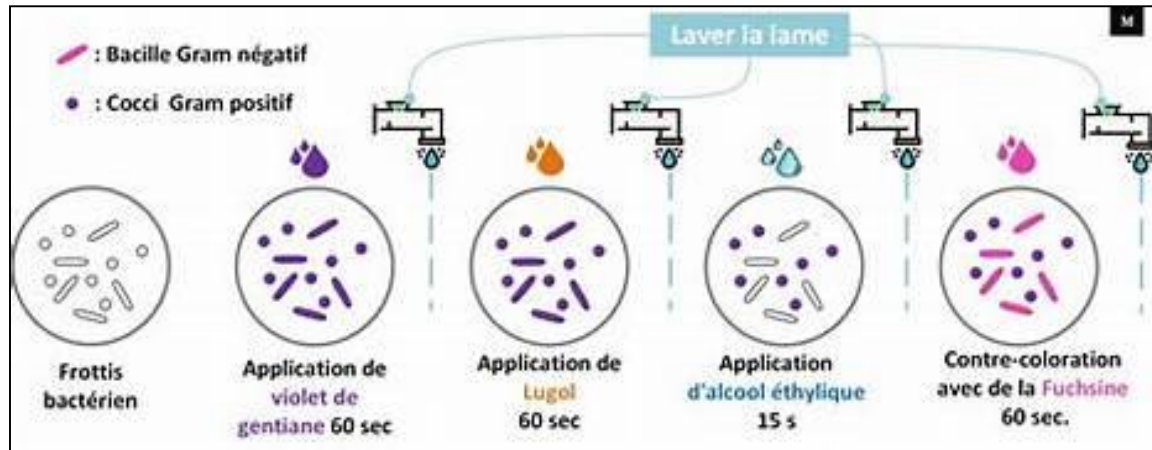


Figure 34 : Schéma représentatif de la coloration de Gram (**Microbiologie-clinique. Coloration-Gram.2023**)

II-6- 2 Les tests Biochimiques pour l'identification des entérocoques

a) Test de la catalase

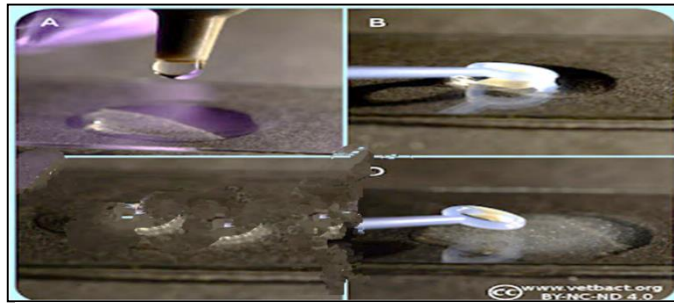
Le test de la catalase est une méthode couramment utilisée en microbiologie pour détecter la présence de l'enzyme catalase dans les bactéries. L'enzyme catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.



La formation immédiate de bulles d'oxygène après l'application du peroxyde d'hydrogène sur la culture bactérienne indique une réaction catalase positive, tandis que l'absence de formation de bulles suggère une réaction catalase négative.

Mode opératoire

- Déposer une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à 3 % sur une lame propre
- Transférer 2 à 3 colonies dans la goutte d'eau oxygénée.
- Observer immédiatement la zone où la suspension bactérienne a été ajoutée à l'eau oxygénée.



**Figure 35 : Les étapes du test Catalase
(Microbiology Laboratory Turkey, 2018))**

b) Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase est une méthode utilisée en microbiologie pour détecter la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase dans les bactéries. Cette enzyme est impliquée dans la chaîne respiratoire des cellules et catalyse la réaction d'oxydation d'un substrat en présence d'oxygène. Lorsque le test est positif, cela se traduit par un changement de couleur caractéristique sur une bandelette ou un disque imprégné du réactif oxydase, permettant ainsi de différencier les bactéries oxydase positives des oxydases négatives. La couleur violette signifie que l'enzyme cytochrome c oxydase est présente dans les bactéries testées. Si aucune couleur violette n'apparaît, cela indique un résultat négatif pour le test de l'oxydase.

Mode opératoire

- Préparez une lame propre et stérile.
- Placez un disque d'oxydase sur la lame.
- Utilisez une boucle d'anse de platine stérile pour déposer une petite quantité de suspension bactérienne sur le disque.
- Observez immédiatement le disque pour toute apparition de couleur violette.

Matériel et méthodes

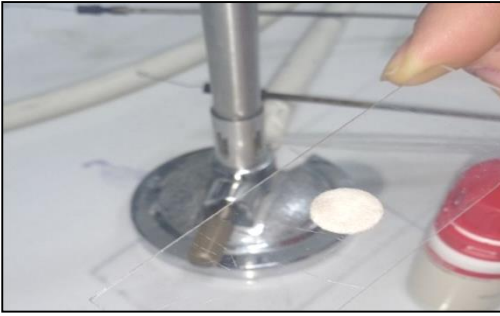


Figure 36 : Dépôt du disque oxydase

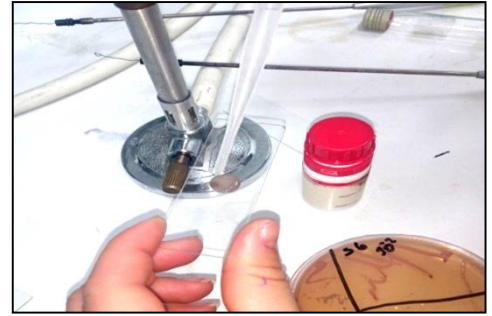
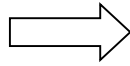


Figure 37 : Humidifier le disque



Figure 38 : Dépôt de la colonie sur le disque.

c) Type fermentaire

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes, homo-fermentaire et hétéro-fermentaire. (Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. 2002).

Mode opératoire

Dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham, on verse un milieu MRS liquide pour mettre en évidence la production de gaz.

Ensuite on ensemence les souches. Après on les incubes à 37°C pendant 24h.

Interprétation : Les souches homo-fermentaire vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétéro-fermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ à proportions égales (A.Ahlamet al ,2021).

d) Test de la résistance à la salinité

Les entérocoques ont la capacité de croître dans une solution contenant 6,5 % de chlorure de sodium (NaCl) (Facklam *et al.*, 1999 ; CEAEQ, 2000; Hancock et Gilmore, 2000) .

Mode opératoire

2 à 3 colonies ont été ensemencées dans un bouillon contenant 3 ml de solution hypersaline (6.5g de NaCl dans 100 ml d'eau peptonée). Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, la présence d'un trouble dans le bouillon indique un résultat positif.

Les cultures positives ont été considérées comme des souches halotolérantes (**Belaid, H., & Hocine, A. (2017).**

e) Test de thermorésistance

Les entérocoques sont des bactéries capables de résister à la chaleur.

Mode opératoire :

Ce test repose sur la préparation d'une suspension bactérienne dans un bouillon BHIB. Cette dernière est placée dans un bain Marie à 60°C, pendant 30min. Après ce traitement thermique, la suspension bactérienne est incubée de nouveau à 37°C pendant 24H. L'apparition d'un trouble bactérien est le résultat de la croissance des entérocoques. (**Badis, A., et al. 2005).**

f) Test de la résistance au tellurite de potassium

Les Entérocoque possèdent un pouvoir réducteur, car ils sont capables de réduire le tellurite de potassium, qui constitue souvent une substance inhibitrice pour les autres espèces (**Belaid, H., & Hocine, A. 2017).**

Mode opératoire

Ensemencement de 2 à 3 colonies ayant poussées sur gélose Slanetz et Bartley dans des tubes qui contiennent 4,5 ml de bouillon BHIB est additionné de 0,5 ml de tellurite de potassium préalablement dilué au 1/250. Par la suite incuber les tubes à 37°C pendant 24 à 48 h. (**Belaid, H., & Hocine, A. 2017).**

Les cultures positives ont été considérées comme des souches capables de réduire le tellurite de potassium et appartenant au genre *E. faecalis*.

g) Test de fermentation des sucres

➤ Test de fermentation du glucose, saccharose et lactose

Le test de fermentation du lactose, saccharose et glucose sur gélose TSI (Triple Sugar Iron) est une méthode utilisée en microbiologie pour évaluer la capacité d'une bactérie à fermenter ces

Matériel et méthodes

sucres. La gélose TSI est un milieu de culture contenant du lactose, du saccharose et du glucose, ainsi qu'un indicateur de pH. Lorsque les bactéries fermentent ces sucres, elles produisent des acides organiques qui abaissent le pH du milieu, entraînant un changement de couleur de l'indicateur. Cette réaction peut être observée sous forme de changements de couleur dans le milieu, permettant ainsi de différencier les bactéries fermentatives de celles non fermentatives.

Culot jaune et pente rouge : La bactérie utilise uniquement le glucose.

Culot et pente jaunes : La bactérie utilise le glucose, le lactose et/ou le saccharose.

Aucun changement de couleur : La bactérie n'utilise aucun des sucres et consomme les peptones. (Ben Abdelkader M. 2003).

Mode opératoire

- Mesurer avec précision 7 ml de gélose TSI dans chaque tube.
- Inclinez les tubes pour obtenir une pente régulière sur toute la surface du milieu.
- À l'aide d'une pipette pasteur, prélevez 2 à 3 colonies bactériennes dans chaque boîte de pétrie.
- Inoculez les colonies en effectuant une piqûre centrale à l'intérieure de chaque tube.
- Placez les tubes inoculés à 37°C.
- Laissez les tubes incuber pendant 24 heures pour permettre la croissance bactérienne et la fermentation des sucres.
- Après l'incubation, observez visuellement les changements de couleur dans le milieu.

➤ **Test de fermentation du sorbitol**

L'utilisation du test de fermentation du sorbitol par les entérocoques sur gélose MEVAG permet de déterminer la voie métabolique préférée des entérocoques lorsqu'ils utilisent le sorbitol comme source de carbone. La gélose MEVAG a été spécialement conçue pour faire la distinction entre les entérocoques en leur permettant de fermenter le sorbitol à travers deux voies métaboliques : la voie des phosphoketolases (PK) et la voie de la métabolisation du glucose (MG). Il est crucial de faire cette distinction afin de caractériser les entérocoques et de les identifier en microbiologie. (A. Bouvet et G. C o w r y 1994).

Mode opératoire

- Mesurer avec précision 7 ml de gélose MEVAG dans chaque tube stérile.
- Ajouter 7 gouttes de solution de sorbitol à 30 % dans chaque tube.
- Bien mélanger les tubes pour homogénéiser la solution.

- Laisser les tubes refroidir à température ambiante jusqu'à ce que la gélose se solidifie.
- Inoculer 2 à 3 colonies dans chaque tube en effectuant des piqûres centrales dans la gélose.
- Placer les tubes dans une étuve à 37 C°.
- Laisser les tubes incuber pendant 24 à 48 heures pour permettre la croissance bactérienne et la fermentation du sorbitol.
- Après l'incubation, observez visuellement les tubes pour tout changement de couleur ou de texture dans la gélose MEVAG ce qui indiquerait la fermentation du sorbitol par les entérocoques. **(Ben Abdelkader M. 2003).**

Remarque : Pour confirmer la dégradation du sorbitol par les entérocoques, le test a été répété en utilisant des boîtes de gélose avec 13 gouttes de solution de sorbitol à 30 %. Les colonies ont étéensemencées sous forme de stries sur la surface de la gélose.

h) Identification par la galerie API 20 streptocoques

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'Identification en fin de notice.

Principe

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification. **(FT-__Api_strep_-_ref_20600. r - 2010/07).**



Figure 39 : Le système de la galerie Api 20 Strept

Dans notre école, nous ne disposons pas des réactifs nécessaires pour la galerie 20 Strept. Par conséquent, nous avons effectué l'identification des souches à l'Institut Pasteur, où nous avons été autorisées à identifier seulement 16 souches parmi les 43 disponibles. Nous les avons sélectionnées en fonction de leurs profils des tests déjà effectués.

Mode opératoire

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparer la suspension bactérienne, en introduisant 2 à 3 colonies dans 2 ml d'eau physiologique stérile puis agiter avec un vortex.
- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH), répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la micropipette sur le côté de la cupule) :
 - ✓ Pour les tests VP à LAP : environ 100 μ l dans chaque cupule.
 - ✓ Pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests Rib à Glyg) :

Ouvrir une ampoule d'api GP Medium et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.

- Répartir cette nouvelle suspension dans les cupules qui restent (Rib à Glyg).
- Remplir les cupules des tests soulignés ADH à Glyg avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 37°C pendant 24 h.
- Après 24 heures d'incubation : Ajouter les réactifs :

- **Test VP** : 1 goutte de VP 1 et VP 2.

- **Test HIP** : 2 gouttes de NIN.

- **Tests PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP** : 1 goutte de ZYM A et ZYM B, on laisse agir pendant 10 minutes.

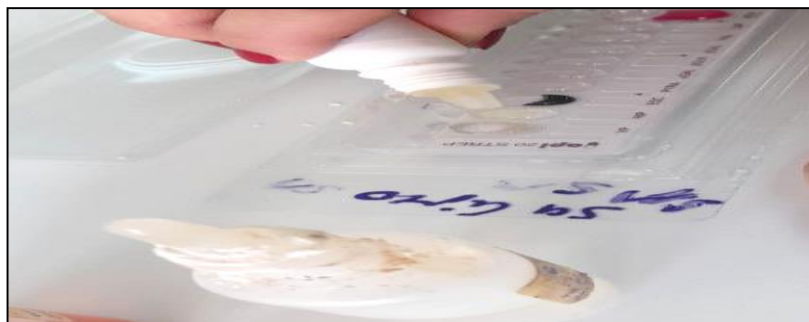


Figure 40 : L'ajout des réactifs

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

- **Interprétation** : L'identification est obtenue à partir du profil numérique.
- **Détermination du profil numérique** : Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.
- **Identification** : L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification APIWEB Plus[®] de BioMérieux en entrant le profil numérique de 7 chiffres inscrit sur la fiche de résultat. (Biomérieux, 2009).

II-7- Antibiorésistance des souches isolées (Antibiogramme)

L'antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité a été testée par la méthode de diffusion sur milieu Muller-Hinton. Les souches d'entérocoques isolées ont été soumises à une liste de molécules d'antibiotiques (Tableau 7). L'interprétation des résultats, a été faite selon le manuel du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM, 2023).

Mode opératoire :

- **Standardisation de la suspension :**

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures jeunes dans de l'eau physiologique.

La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 0,5 Mc Farland.

L'inoculum doit être employé dans les 15min qui suivent sa préparation.

- **Ensemencement :**

Des boîtes de pétri préalablement remplies par 25ml de la gélose Müller-Hinton (CASFM, 2023) sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube. Des stries parallèles et aussi serrées que possible sont réalisées à la surface de la gélose. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte à 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même.

- **Dépôts des disques :**

Des disques d'antibiotiques sont appliqués à l'aide d'une pince stérile, sur la gélose inoculée, selon la figure 37. Une fois le disque déposé, il ne doit pas être déplacé car les antibiotiques diffusent rapidement. Il ne faut pas laisser les boîtes plus de 15min sur la paillasse.

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

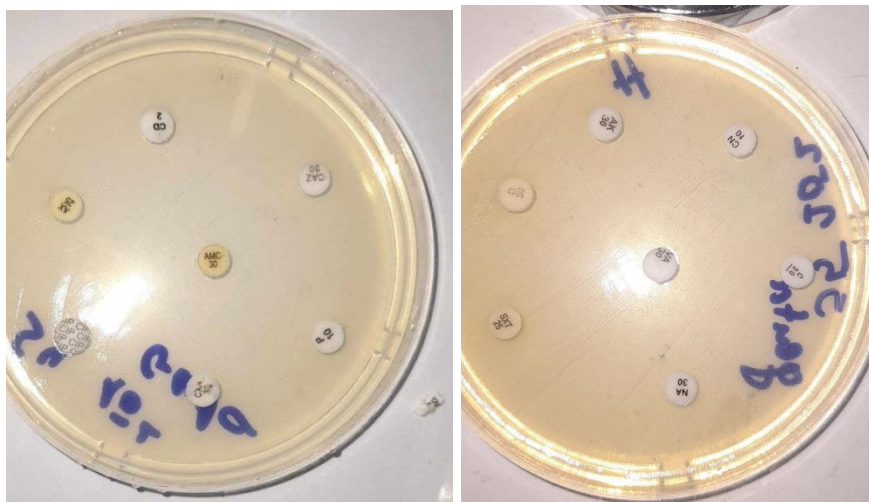


Figure 41 : L'antibiogramme

Les antibiotiques dans les boîtes :

Boîte 01 : L'acide Nalidixide (NA) ; Vancomycine (VA) ; l'Amikacine (AK) ; Chloramphénicol (C) ; Doxycycline (DOXY) ; Triméthoprime - Sulfaméthoxazole (SXT) ; Gentamicine (CN)

Boîte 02 : Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) ; Pénicilline G (P) ; Amoxicilline (AX) ; Céfotaxime (CAZ) ; Cefalexine (CXN) ; Ciprofloxacine (CIP) ; Clindamycine (CD).

• Lecture des boîtes :

La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure du diamètre par une règle graduée en mm de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, qui a été formée autour des disques d'antibiotiques (CASFM, 2023). Après lecture des zones d'inhibition, les souches sont classées en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes.

En bactériologie, les **associations d'antibiotiques** sont caractérisées par deux phénomènes majeurs :

Soit un phénomène **synergique** : l'effet de l'association est significative supérieur à la somme des activités de chaque antibiotiques. (É. Deneset N. Hadri, 2009)

Soit un phénomène **antagoniste** : l'association diminue l'effet de l'un des antibiotiques. L'activité de cette association est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique. (É. Denes a et N. Hadri, 2009)

Tableau 7 : Liste des antibiotiques en disque utilisés

La famille	L'antibiotique	Abréviation	La charge (µg)
β-lactamines	Pénicilline G	P	10
	Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	30
	Amoxicilline	AX	30
	Cefalexine	CXN	30
	Céftazidime	CAZ	30
Glycopeptide	Vancomycine	VA	30
Phénicol	Chloramphénicol	C	30
Sulfamides	Triméthoprim Sulfaméthoxazole	SXT	25
Fluoroquinolone	Ciprofloxacine	CIP	5
Lincosamides	Clindamycine	CD	2
Aminoside	Amikacine	AK	30
	Gentamicine	CN	10
Quinolones	Acide Nalidixique	AN	30
Tétracyclines	Doxycycline	DOXY/D	30

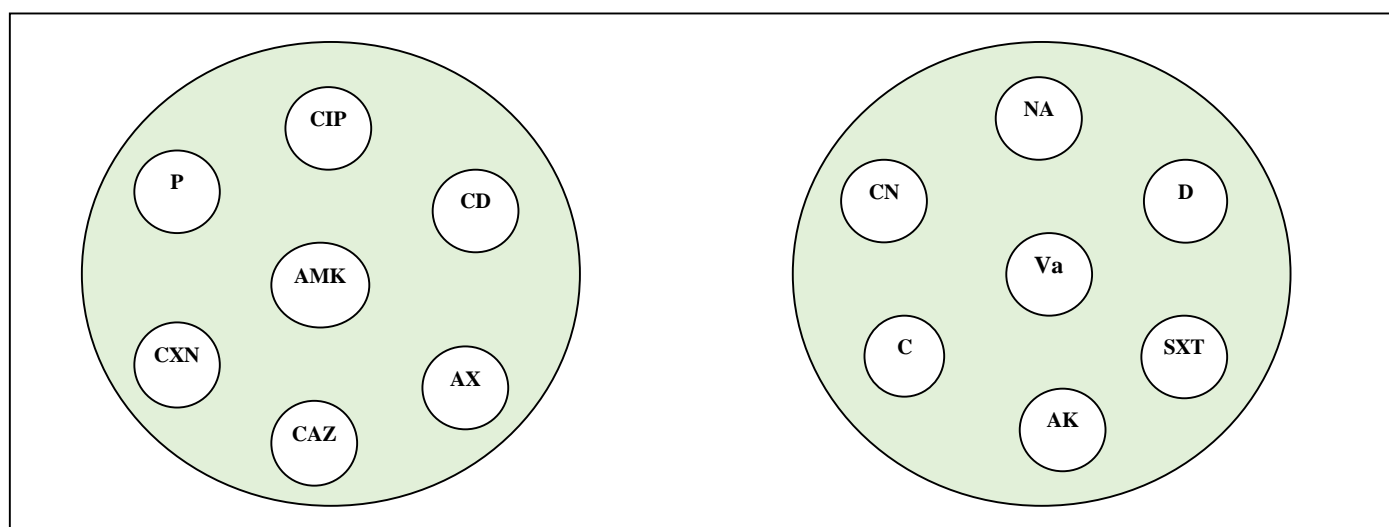


Figure 42 : Emplacement des antibiotiques utilisés dans la boîte de pétrie

II-8- Tests de virulence des entérocoques

a) Formation du biofilm

Mode opératoire

- La détermination quantitative de la formation de biofilm a été réalisée dans une microplaque de titration à 96 puits. Le test est basé sur la mesure colorimétrique du cristal violet incorporé par les cellules sessiles (**Maldonado et al, 2007**).
- Une jeune culture bactérienne de 18 heures est ajustée à une densité optique comprise entre 0.56 et 0.64 à une longueur d'onde de 540 nm.
- Un volume de 250 μ l de cette culture est incubé dans une microplaque pendant 6 heures à 37°C.
- Après l'incubation, les puits sont lavés avec 25 μ l de cristal violet à 1% et laissés en contact pendant 15 minutes.
- Trois lavages sont ensuite réalisés avec du PBS stérile (200 μ l par puits) suivi de 200 μ l d'éthanol.
- Le contenu des puits est transféré dans des tubes stériles contenant 1.2 ml d'alcool.
- Après agitation, la densité optique est mesurée à 540 nm. (**Maldonado et al, 2007**)
- Les souches bactériennes sont ensuite classées en trois catégories en fonction de leur densité optique :

DO > 0.5 : Forte production de biofilms

0.1 < DO < 0.5 : Production moyenne de biofilms

DO < 0.1 : Faible production de biofilms

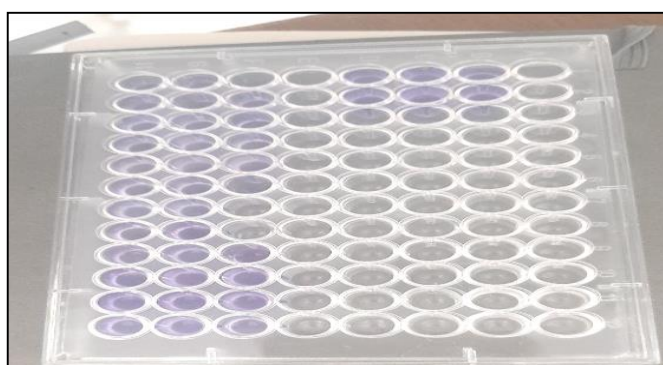


Figure 43 : Le test de Biofilm

b) Test d'hémolyse

L'étude de la pathogénicité des Entérocoques est liée à la recherche de l'existence de l'hémolysine, il s'agit de l'enzyme responsable de la lyse des hématies. Les bactéries qui possèdent l'hémolysine dégradent donc l'hémoglobine (**Joffin, N., & Joffin, P. 1999**).

Mode opératoire

On ensemence les bactéries sur gélose Columbia contenant 5% de sang frais puis on incube à 37°C pendant 24h. (**Guiraud, P., & Rosec, J. P. 2004**).

Il existe trois principaux types d'hémolyse observés dans le test de l'hémolyse : (**Guiraud & Rosec, 2004**).

- **Hémolyse Alpha** : Il s'agit d'une hémolyse partielle où la zone autour des colonies bactériennes présente une coloration verdâtre. Cela indique une dégradation partielle de l'hémoglobine.
- **Hémolyse Bêta** : Il s'agit d'une hémolyse complète où la zone autour des colonies bactériennes est transparente. Cela indique une dégradation complète de l'hémoglobine.
- **Hémolyse Gamma** : Il n'y a pas d'hémolyse observée. Aucun changement de couleur ou de transparence n'est visible autour des colonies bactériennes.

c) La recherche de la Gélatinase

La Gélatinase est une enzyme qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. (**Agrane, L., Akhemoum, Ch., & Akhmoum, N. 2023**).

Mode opératoire

- Ensemencer 2 à 3 colonies dans le bouillon BHIB et incuber à 37°C pendant 24h.
- Des boîtes Müller Hinton + Gélatine (3% P/V) sont préparées.
- Des puits sont creusés dans cette gélose et sont ensuite remplis (50µl) de BHIB déjà ensemencé.
- L'incubation des boîtes est réalisée à 37°C pendant 24H.
- Le test positif se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des puits, la souche est Gélatinase positive. (**Agrane, L.et al., 2023**).

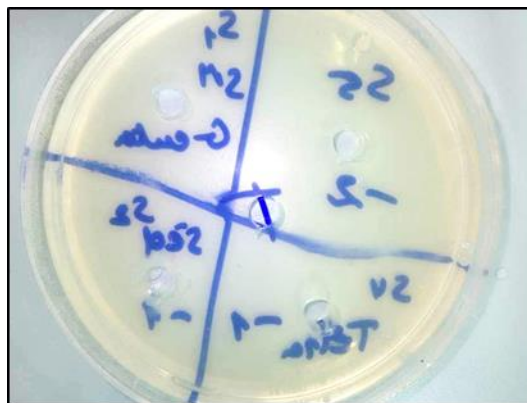


Figure 44 : Recherche de la Gélatinase

II-9 Mise en évidence de la production de Bactériocines par antagonisme

Méthode de diffusion par puits (**Barefoot et Klaenhammer, 1983**). Cette méthode a été modifiée par plusieurs auteurs comme Puizani et al, (**1992**). Cette méthode consiste à :

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 tr/min, 15 min) et le surnageant est alors séparé du culot, filtré et neutralisé avec du NaOH (1N) afin d'avoir un pH entre 6,8-7 et il est conservé à 4°C.

3/ Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide et ensemencé initialement par la souche pathogène : *E. coli*, (correspondant à 10⁶ UFT/ml à 625nm) par écouvillonnage. On laisse les boîtes sécher à température ambiante pendant 30minutes, des puits sont ensuite réalisés avec un emporte-pièce ou une cloche de Durham stérile.

4/ Ces puits recevront 100µl du surnageant brut de la culture lactique à tester et les boîtes seront mises à 4°C pendant 2heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant.

5/ Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 37°C.

6/ Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive. (**Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983)**).

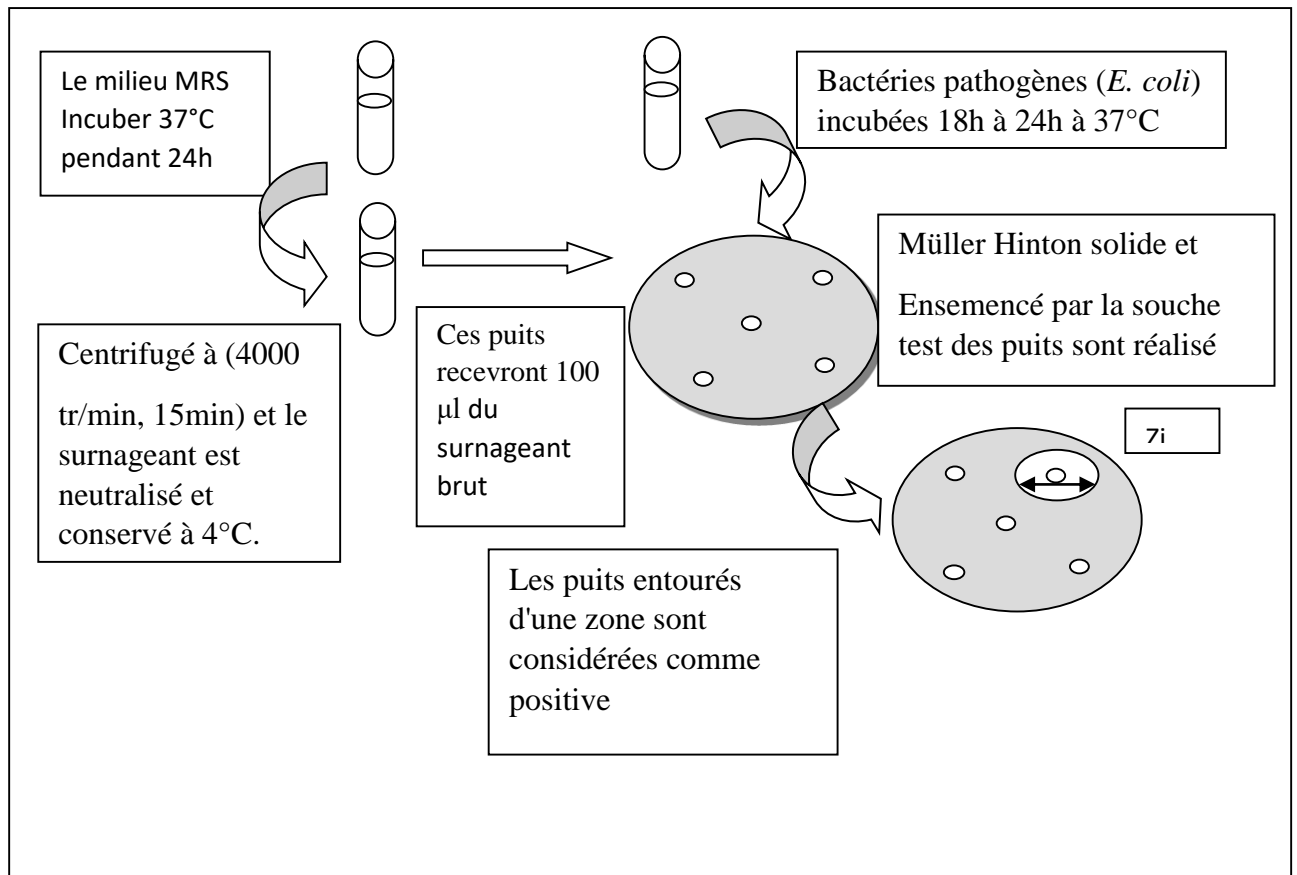


Figure 45 : Schéma de la méthode de diffusion en puits : production de bactériocines

Z_i = diamètre de la zone d'inhibition obtenue – diamètre du puits (6mm)

II-10 Conservation des souches

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



Chapitre III : Résultats et Discussion

III- Résultats et discussion

Lors de notre étude, des échantillons d'eau de mer et de sédiments ont été prélevés puis soumis à une série d'analyses physico-chimiques et bactériologiques. Les résultats de ces analyses sont présentés ci-dessous :

III-1- Résultats des paramètres physicochimiques

Des mesures ont été réalisées lors des prélèvements à fin de voir l'impact des conditions hydro-climatiques sur la qualité de l'eau de mer :

Tableau 8 : Résultats des paramètres physicochimiques

Le Site	Heure du Prélèvement	La Température (C°)	Le Salinité (Psu)
Flots bleus	9h20min	16	36,9
Bateau Cassé	10h15min	16	36,6
La Sirène	10h51min	16,5	36,6
Kheloufi	12h11min	17,1	36,6
Colonel Abbes	11h56min	16	22,6
Sidi Fredj	12h56min	17,4	36 ,6

Selon les données du tableau 08, on constate que les températures sont plus basses dans les trois premières stations en raison de l'échantillonnage effectué en début de matinée.

La salinité est relativement uniforme dans les stations Flots Bleus, Bateau Cassé, la Sirène, Kheloufi et Sidi Fredj. Cependant, elle est significativement basse à Colonel Abbes en raison du déversement direct de l'oued Mazafran dans cette plage.

III-2- Résultats des analyses microbiologiques

Afin de mesurer le niveau de contamination microbiologique des sites étudiés, nous avons recherché la présence de bactéries indicatrices de la pollution et de la contamination, telles que les coliformes totaux et les entérocoques, dans l'eau de mer et les sédiments.

III-2-1 Dénombrement des coliformes totaux

➤ Eau de mer

Les coliformes se manifestent sur le milieu TTC, par des colonies jaunes orange comme le démontre la figure 44.

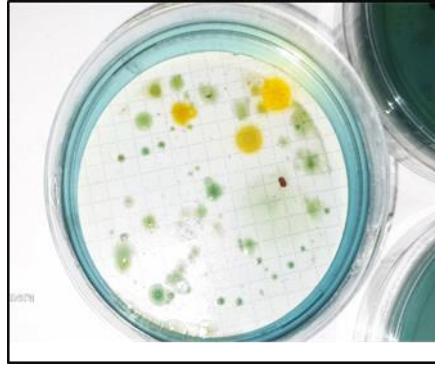


Figure 46 : Aspect des coliformes sur le milieu TTC

Selon l'analyse de l'histogramme, (Figure 47) on constate que les taux de coliformes totaux sont très élevés au niveau de la plage Kheloufi en raison des eaux usées de l'oued Mazafran et des déchets rejetés. En revanche, des concentrations plus faibles ont été observées dans les autres plages telles que la Sirène, Ain Taya, Sidi Fredj et Bateau Cassé.

Malgré l'écoulement direct de l'oued Mazafran dans la plage Colonel Abbès, nous avons observé un faible taux de Coliformes. Cela pourrait être attribué aux conditions météorologiques, étant donné que les jours précédant nos prélèvements le temps était pluvieux, (effet de dilution) et aussi à l'état de la mer, qui était agitée au moment de l'échantillonnage.

En comparant nos résultats à l'étude menée en 2022 par **I. Bouatrous et A. Kara**, nous constatons que le taux de coliformes dans les plages d'Ain Taya, Bateau Cassé, la Sirène, Sidi Fredj et Colonel Abbès sont inférieurs à ceux relevés en 2022, ce qui pourrait être expliqué comme cité précédemment par les mauvaises conditions météorologiques. Néanmoins dans les deux études les résultats sont conformes aux normes algériennes (**Décret exécutif N° 93-164 du 10 juillet 1993**) ce qui indique que la qualité de l'eau est satisfaisante pour toutes les plages.

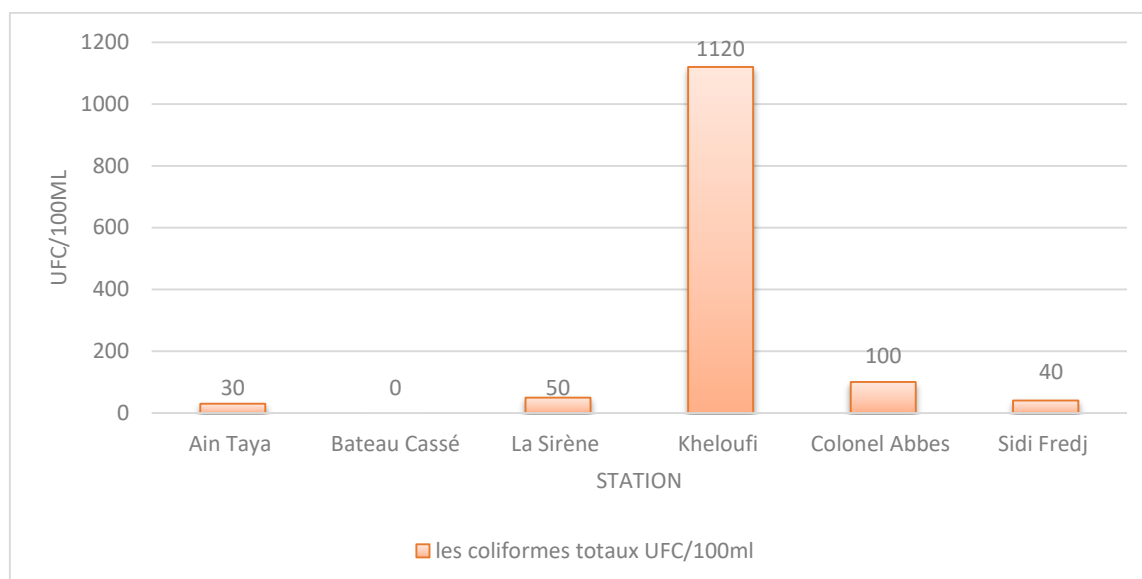


Figure 47 : Résultats du dénombrement des coliformes totaux de l'eau de mer dans les (exprimé en UFC/100ml)

➤ Recherche d'*E. coli* dans l'eau de mer

Aucune trace d'*E. coli* n'a été détectée dans tous nos échantillons. (Absence de l'anneau rouge)



Figure 48 : Recherche d'*E. coli*

III-2-2 Le dénombrement des entérocoques

Le dénombrement des entérocoques a été réalisé dans l'eau de mer et dans le sédiment.

➤ Eau de mer

Test présomptif : Les colonies de couleur rouge observées sur le milieu Slanetz et Bartley sont un indicateur de la présence d'entérocoques. (Figure 49)



Figure 49 : Les colonies d'entérocoques sur milieu Slanetz et Bartley

Test confirmatif : La croissance des souches sur le milieu BEA nous indique que ces bactéries sont résistantes à la fois vis-à-vis des sels biliaries et de l'azide de sodium. Cependant, l'apparition de la couleur noir est due à l'hydrolyse du polyoside complexe "esculine" en libérant de l'aglucone qui est décelée par une réaction chimique en présence de sels de fer. (**Chuard et Reller, 1998**)



Figure 50 : Aspect des entérocoques sur le milieu BEA

➤ Résultats de la recherche des entérocoques

• Dans l'eau de mer

Le graphique (figure 49) représente les résultats du dénombrement des entérocoques dans l'eau de mer au niveau des 06 plages :

L'analyse de l'histogramme révèle une concentration significativement plus élevée en entérocoques au niveau de Colonel Abbes (2211UFC/100ml), suivie par Kheloufi (1636 UFC/100ml), en raison des eaux usées déversée, notamment celles de l'oued Mazafran, contribuant à cette charge importante. En revanche les autres plages (La Sirène (214UFC/100), Sidi Fredj (140UFC/100ml), Bateau cassé (102UFC/100ml), Ain Taya (38UFC/100ml) affichent des charges plus faibles que les deux premières plages.

Résultats et Discussions

Les concentrations d'entérocoques dépassent les normes algériennes (100UFC/100ml), ce qui indique que la qualité de l'eau est inacceptable pour toutes les plages, sauf la plage d'Ain Taya qui possède une valeur acceptable (38UFC/100ml).

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de **Chaachoua A., 2021** et **Bouatrous I., 2022** :

-Une tendance globale à la hausse est observée par rapport à l'année 2021. Cependant, une exception notable a été remarquée à la station d'Ain Taya, où les niveaux sont inférieurs à ceux enregistrés en 2021 (38UFC/100ml<152UFC/100ml). Cette disparité soulève des questions importantes quant aux facteurs environnementaux et aux pratiques de gestion des eaux usées qui pourraient influencer ces variations.

-Les stations d'Ain Taya et de Bateau Cassé affichent une charge d'entérocoques inférieure à celles enregistrée en 2022, se situant autour de 320 UFC/100ml pour Ain Taya et de 180 UFC/100 ml pour Bateau Cassé, ce qui pourrait indiquer une amélioration de la qualité de l'eau dans cette zone. En revanche, les autres plages telles que, la Sirène, Kheloufi, Colonel Abbas et Sidi Fredj (214,1636, 2211, 140UFC/100ml respectivement) présentent des charges d'entérocoques plus élevées qu'en 2022 et 2021 (80, 260, 780, 90 UFC/100ml), dépassant ainsi les normes Algériennes (>100UFC/100 ml).

Ces hauts niveaux de contamination microbiologique, signalent un défi persistant en matière de qualité de l'eau qui nécessite une action immédiate pour protéger la santé publique et préserver l'écosystème marin.

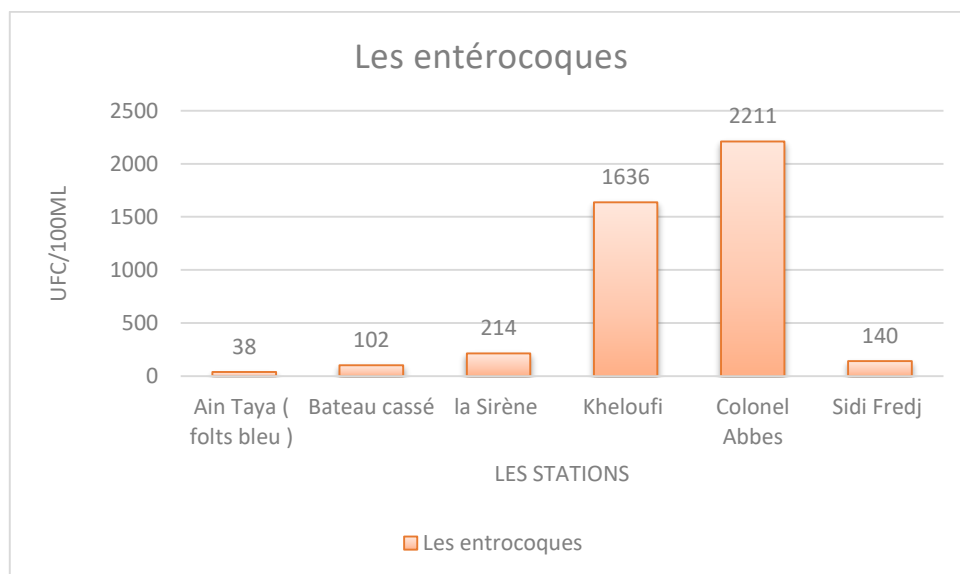


Figure 51 : Résultats du dénombrement des entérocoques dans l'eau

➤ Résultats de la méthode NPP pour la recherche des entérocoques dans les sédiments

Test présumptif : La manifestation des entérocoques dans le milieu Rothe est caractérisée par la présence d'un trouble, comme illustré dans la figure ci-dessous :



Figure 52 : Résultats de recherche des entérocoques dans les sédiments par la méthode NPP (la présence d'un trouble.)

Test confirmatif : Sur le milieu Eva Litsky, les résultats positifs se manifestent par un précipité violet ou blanc au fond du tube. Dans nos échantillons, il y a eu la formation d'un précipité blanc ce qui signifie la présence des entérocoques.



Figure 53 : Confirmation de la présence des entérocoques

➤ Les résultats sont résumés dans le graphique suivant

Selon l'histogramme (Figure 54), une concentration élevée d'entérocoques est observée au niveau de la plage Colonel Abbes (240 NPP/g), suivie par la plage Bateau Cassé (43 NPP/g), ensuite la plage Kheloufi (44 NPP/g) puis la plage la Sirène (23 NPP/g). Enfin, les plages Ain Taya et Sidi Fredj ont la même concentration, la plus faible environ (9 NPP/g). La différence de concentration peut être due à la granulométrie des sédiments, les sédiments boueux ayant le pouvoir de retenir les bactéries plus que les sédiments sableux.

En comparant les résultats de notre étude à celle de **Chaachoua A. 2021**, il est apparu que les concentrations d'entérocoques augmentent dans toutes les stations, en particulier dans celle de Colonel Abbes qui affiche une augmentation significative. (15C/1g en 2021 et 240 en 2024)

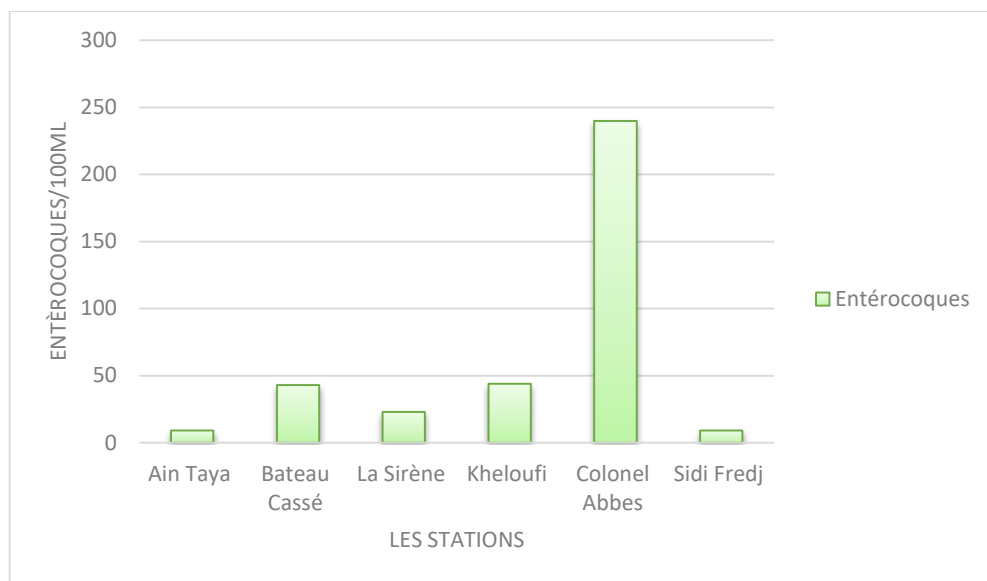


Figure 54 : Résultats de la recherche des entérocoques dans les sédiments par la méthode NPP

III-3 Prévalence de la résistance des Entérocoques aux antibiotiques

Le graphique de la figure 55 représente la prévalence de la résistance des entérocoques aux antibiotiques.

Selon les résultats, on observe que toutes les souches sont résistantes à la Tétracycline (Ain Taya 95%, Bateau Cassé 76,47%, la Sirène 62,15%, Kheloufi 99,02%, Colonel Abbes 71,33% et Sidi Fredj 74%) et à l'Azithromycine (Ain Taya 50%, Bateau cassé 61,76%, la Sirène 55,14%, Kheloufi 85,76%, Colonel Abbes 69,61% et Sidi Fredj 81%), avec des pourcentages variables mais significatifs. Les souches des stations Ain Taya et Sidi Fredj sont sensibles à la Ciprofloxacine (0%), tandis que celles des autres stations (Bateau Cassé 58,82%, la Sirène 70,09%, Colonel Abbes 95,97%, Kheloufi 45,23%) montrent une résistance variable. Les souches des stations Ain Taya (87%) et Sidi Fredj (74%) présentent une résistance importante à la Gentamicine, tandis que celles des stations Colonel Abbes (52,24%), Kheloufi (21,21%), Bateau Cassé (43,14%) montrent une résistance modérée, et la Sirène (4,67%) montre une résistance plus faible. Pour ce qui est de la Vancomycine, les souches de la station Colonel Abbes sont résistantes à hauteur de 61,51%, tandis que celles des autres stations présentent une

résistance plus faible (Bateau Cassé 3,92%, la Sirène 0,93%, Kheloufi 1,83%, Sidi Fredj 14%.) et des souches sensibles à Ain Taya (0%).

En comparant nos résultats à l'étude de **2021 d'A. Chaachoua**, on constate une résistance très élevée des entérocoques à la Tétracycline par rapport aux mois de mai et juin 2021 (respectivement : 28% et 9,9%, 52% et 20%, 3% et 25%, 1,7% et 20%, 18% et 48,51%, 1,7% et 9,52%).

En ce qui concerne la résistance à la Vancomycine dans les différents sites, on constate que Colonel Abbes présente le taux le plus élevé 61,51%, suivi de Sidi Fredj avec 14%, Bateau Cassé avec 3,92%, Kheloufi avec 1,83% et la Sirène avec 0,93%. Quant à Ain Taya, le taux de résistance est nul.

Une étude antérieure menée en 2021 (**A. Chaachoua, 2021**), a montré que le taux de résistance des entérocoques à la Vancomycine au niveau de Colonel Abbes et Sidi Fredj est très bas par rapport à notre étude (respectivement 2% et 1,6% en mai 2021, 26,17% et 0% en juin 2021). En revanche, pour Bateau Cassé, Kheloufi et la Sirène, les taux de résistance en mai et juin 2021 sont plus élevés que ceux de notre étude (respectivement 30% et 40%, 4% et 11,82%, 8,3% et 0%). Concernant la plage d'Ain Taya, notre résultat est similaire à celui de mai 2021 (0%).

On observe une forte résistance à l'Azithromycine dans les stations suivantes : Kheloufi avec un taux de 85,76%, Sidi Fredj avec 81%, Colonel Abbes avec 69,61%, Bateau Cassé avec 61,76%, la Sirène avec 55,14%, et Ain Taya avec 50%. En comparant ces résultats à l'étude de 2021, on remarque une augmentation significative des taux de résistance dans ces 05 stations par rapport à l'étude précédente, ceci est probablement dû à l'utilisation excessive de cet antibiotique lors de la pandémie du Covid 19.

L'étude de **Chaachoua (2021)**, a montré une augmentation de la résistance à la Gentamicine dans trois stations, par exemple au niveau de la plage de Ain Taya la résistance est passée de 0% à 15% (mai à juin 2021) et à 87% dans notre étude. La station la Sirène a montré des résultats similaires dans les deux études. Selon **I. Bouatrous et A. Kara (2022)**, il y a une augmentation généralisée de la résistance dans toutes les stations.

Pour la Ciprofloxacine, un niveau élevé de résistance a été constaté dans la plage de Kheloufi avec 95 %, suivi de la Sirène avec 70,09 %, Bateau Cassé avec 58,82 %, Colonel Abbes avec 45,23 %, tandis qu'aucune résistance n'a été observée à Ain Taya et Sidi Fredj.

Comparativement à l'étude de 2021 (**A. Chaachoua 2021**), on note une absence totale de résistance dans les plages Ain Taya, Bateau Cassé, la Sirène et Sidi Fredj en juin 2021, à l'exception de Kheloufi et Colonel Abbes où le taux de résistance est faible, 7,51 % et 15,31 % respectivement. Dans l'étude de 2022 de **I. Bouatrous et A. Kara**, aucune résistance n'a été observée dans les 05 stations (Ain Taya, Bateau Cassé, la Sirène, Kheloufi et Sidi Fredj), à l'exception de la plage Colonel Abbes avec un taux de résistance très faible de 4 %.

Nos résultats montrent que les entérocoques ont développé une augmentation de la résistance par rapport aux années 2021 et 2022 ce qui est dû aux différents mécanismes, notamment la mutation génétique et l'échange de gènes. De plus, l'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotiques contribue également au développement de la résistance bactérienne, notamment pendant la période de l'épidémie de la Covid-19.

Les fluctuations dans les taux de résistance observées, sont probablement dû également aux conditions d'hydrodynamisme qui redistribuent la répartition des microorganismes par les effets de décantation et de remise en suspension (**Miranda et Zemelman, 2001 ; Matyar et al, 2004 ; Ghosh et Mandal, 2010**).

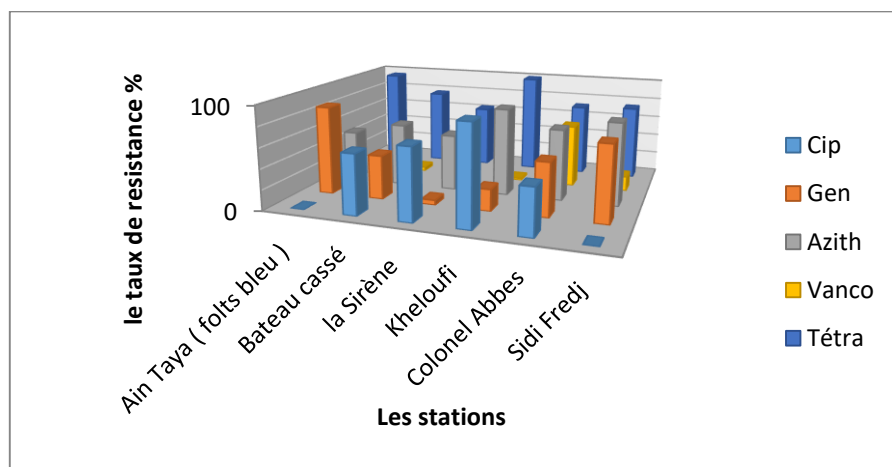


Figure 55 : Prévalence de la résistance des entérocoques aux différents antibiotiques

Vanco : Vancomycine, Cip: Ciproflaxine, Azith : Azithromycine, Gen : Gentamicine, Tétra: Tétracycline

III-4-Isolement

Il est préférable d'isoler les bactéries sur le milieu Slanetz et Bartley afin d'obtenir une meilleure visibilité. Lors de notre étude, nous avons isolé 43 souches qui semblent être des entérocoques et les avons soumises à une série de tests pour les identifier.



Figure 56 : Résultats de l'isolement sur le milieu Slanetz

:

Les 43 souches isolées sont distribués sur les 06 stations selon le graphe suivant (Figure57) :

Les stations Kheloufi, la Sirène, et Colonel Abbes ont chacune 9/43 souches, représentant 20,93% du total, ce qui indique un niveau élevé de pollution dans ces zones. Bateau Cassé suit avec 7/43 souches (16,27%), tandis que Sidi Fredj et Ain Taya présentent respectivement 5/43 souches (11,62%) et 4/43 souches (9,30%). Ces résultats suggèrent que certaines stations sont plus affectées par la pollution que d'autres.

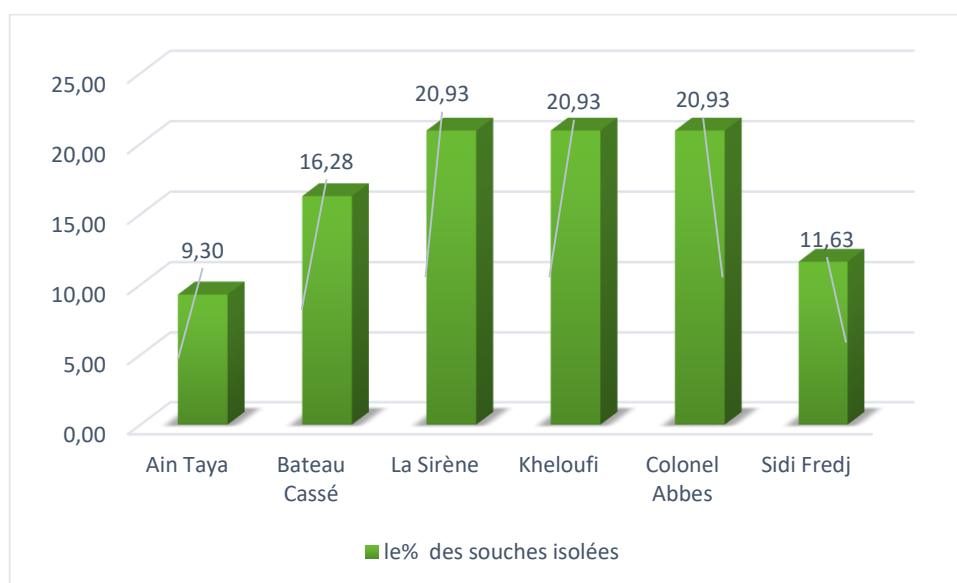


Figure 57 : Répartition des entérocoques dans les six stations

III-5 Identification

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques. Cette identification nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

III-5-1 Identification microscopiques des souches

a) Coloration de Gram

L'aspect microscopique des entérocoques, révélé par la coloration de Gram, montré des formes cellulaires en Cocci, disposées en paire (diplocoques) ou en courtes chainettes de couleur Violettes. Par conséquent, ces souches sont confirmées comme des bactéries à Gram positif répondant au type de Gram des Entérocoques et des Streptocoques (**Franz et Holzapfel, 2004**)

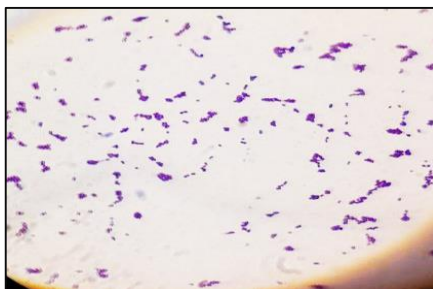


Figure 58 : Aspect microscopique des souches d'entérocoques isolées dans l'eau de mer après coloration de Gram, observées sous un grossissement de *100

III-5- 2 Identification biochimiques des souches

a) Test de la catalase

Suite à la réalisation du test de catalase sur les souches, les résultats ont indiqué une réaction négative. Cette observation révèle l'absence d'activité catalase, par conséquent, ces résultats confirment que les souches étudiées se classent parmi les entérocoques, conformément à leurs propriétés biochimiques distinctives.

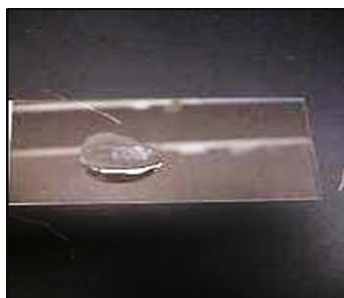


Figure 59 : Résultat négatif du test catalase d'une souche isolée

b) Test de l'oxydase

Suite à la réalisation du test de l'oxydase, les résultats ont indiqué une réaction négative. Cette observation suggère l'absence d'activité oxydasique dans les bactéries testées. Par conséquent, ces résultats sont cohérents avec le profil biochimique des entérocoques, qui sont généralement

oxydase négatifs. Ainsi, cette conclusion confirme davantage l'identification des souches étudiées en tant qu'entérocoques.



Figure 60 : Résultat du test oxydase d'une souche isolée

c) Type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO_2 qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS glucosé. Ce test permet de différencier les souches homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Parmi les 43 souches étudiées, aucune n'a produit de gaz (CO_2) à partir du glucose, ce qui indique qu'elles sont homofermentaires. Cela signifie qu'elles fermentent le glucose principalement en produisant de l'acide lactique (A. Bouvet et G. Coudry, 1994) (Figure 61)



Figure 61 : Résultat obtenu pour le type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham (10% de CO_2 et 90% d'acide lactique)
(Homofermentaire à gauche, tube témoin à droite)

d) Test de thermorésistance

Le test de résistance à la chaleur demeure un outil crucial pour différencier le genre *Streptocoques* des *Entérocoques*. Dans notre étude portant sur 43 souches d'Entérocoques, la grande majorité a présenté une résistance au traitement thermique à 60°C pendant une durée de 30 minutes. Cependant, une seule souche a donné un résultat négatif, suggérant la possibilité qu'elle appartienne à une espèce moins thermorésistante, telle que *E. avium* ou *E. gallinarum*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. sulfureus*. (Brodsky and Schiemann, 1976 ; Budnicket al., 1996 ; Messer and Dufour, 1998).

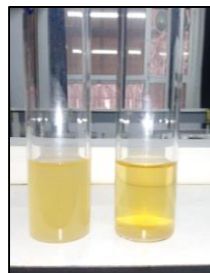


Figure 62 : Résultat du test de thermorésistance des souches.

(Après incubation à gauche, tube témoin à droite)

Parmi les 43 souches isolées de l'eau de mer et des sédiments 38 souches, ont poussé dans le bouillon hyper salin. Cependant, la détection de résultats négatifs chez certaines souches est un élément d'intérêt, suggérant la possibilité de présence d'autres espèces du genre *Entérocoques* telles qu'*E. asini*, *E. cecorum* et *E. columbae* (Devriese et al.1993)

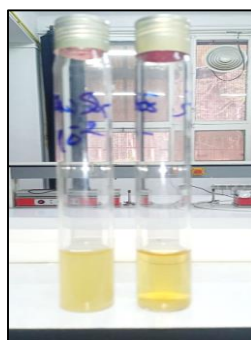


Figure 63 : Résultat de la croissance sur bouillon hyper salé

(Après incubation à gauche, tube témoin à droite)

e) Test de la réduction du tellurite de potassium

Les résultats obtenus avec le tellurite de potassium révèlent une répartition significative des souches testées, avec 16/43 affichant une réaction négative et 27 /43 montrant une réaction positive. Cette distribution asymétrique suggère fortement la présence prédominante d'*Enterococcus faecalis* parmi les échantillons examinés. Cette conclusion est étayée par des recherches antérieures, telles que celles mentionnées par **Trovatelli et al. (1987)** et par **Atlas (1995)**.

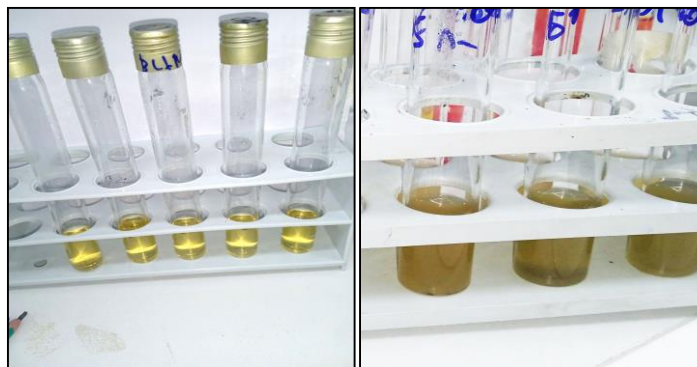


Figure 64 : Résultat du test de la réduction du tellurite de potassium
(A gauche avant incubation, à droite après incubation)

f) Test de fermentation des sucres

➤ Test de fermentation du glucose, du saccharose et du lactose

Les résultats du test de fermentation des sucres ont montré une réaction positive dans la plupart des tubes, du glucose (35/43), du lactose et du saccharose (41/43) avec un changement de couleur jaune observé à la fois dans le culot et sur la pente des géloses. Ce changement de couleur indique une acidification du milieu due à la fermentation de ces sucres par les bactéries testées, démontrant ainsi leur capacité à utiliser efficacement le glucose, le lactose et/ou le saccharose comme sources de carbone et d'énergie.

L'absence de changement de couleur dans le culot et sur la pente des géloses TSI pour les deux tubes indique une incapacité des souches à fermenter les sucres testés, probablement due à des limitations métaboliques ou à l'absence d'enzymes spécifiques. En l'absence de fermentation, les bactéries utilisent les peptones comme source de carbone et d'énergie, entraînant une alcalinisation du milieu, observable par une couleur rouge/orange.

Cependant, deux tubes ont présenté des résultats négatifs, suggérant qu'ils pourraient être des souches d'*Enterococcus durans* ou *Enterococcus seriolicida*. (**Devriese et al.1993**)

De plus, l'absence d'une ligne noire entre le culot et la pente indique l'absence de production de H_2S .

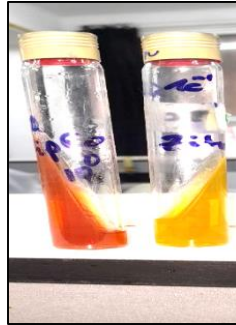


Figure 65 : Résultats du test de fermentation des trois sucres.

(Réaction positive à droite et négative à gauche)

➤ Test de fermentation du sorbitol

Le test de fermentation du sorbitol a mis en évidence que 23 souches présentent une réaction positive chez les souches d'entérocoques étudiées, confirmant ainsi leur capacité à métaboliser ce sucre, comme indiqué par le changement de couleur du milieu de culture. Cependant, 20 souches ont présenté une réaction négative, suggérant une différence dans leur capacité à métaboliser ce sucre. Parmi ces souches, il est possible de trouver *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*, *E. gallinarium* et *E. durans*, soulignant ainsi la diversité métabolique au sein du genre *Entérocoques*. Nos résultats sont en accord avec les résultats précédemment rapportés par (Harley et Prescott, 2002).



Figure 66 : Résultats du test de fermentation du sorbitol

(Coloration jaune résultat (+) ; coloration rouge résultat (-))

Résultats et Discussions

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats d'Identification des souches d'entérocoque isolées :

Tests	Test de salinité	Test de chaleur	Test de tellurite de potassium	Test de fermentation des sucres		
				Glu	Sac/lac	Sor
Résultats des souches identifiées	38 souches qui sont très probablement : <i>E. avium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. dispar</i> <i>E. durans</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. flavescens</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. haemoperoxidus</i> <i>E. hirae</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. moraviensis</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. porcinus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. ratti</i> <i>E. saccharolyticus</i> <i>E. solitarius</i> <i>E. sulfureus</i> <i>E. villorum</i> (Devriese et al.1993)	42 souches qui sont très probablement : <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. ratti</i> <i>E. porcinus</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. saccharolyticus</i> (Devriese et al. 1993)	27 souches de : <i>E. faecalis</i>	35 souches d'entérocoques	41 souches qui sont : <i>E. gallinarum</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. sulfureus</i> <i>E. hirae</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundtii</i> (A. Bouvet** et G. C o w r y *.1994)	23 souches qui sont : <i>E. faecalis</i> ou <i>E. solitarius</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. sulfureus</i> <i>E. avium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. malodoratus</i> (A. Bouvet** et G. C o w r y *.1994)

g) Identification par la galerie API 20 streptocoques

L'analyse des galeries biochimiques a été réalisée dans le but d'identifier les 16 souches d'entérocoques. Cette méthode permet de caractériser les propriétés biochimiques spécifiques de chaque souche à l'aide d'une série de tests standardisés.



Figure 67 : Galerie api® 20 Strept après 24 heures d'incubation après l'ajout des réactifs

- Pour le test de l'ADH, toutes les souches sont positives, ce qui signifie qu'elles sont capables d'hydrolyser l'arginine grâce à la présence de l'ADH (Arginine déshydrogénase).
- Pour la dégradation de l'esculine, toutes les souches sont capables d'hydrolyser l'esculine en esculetine et glucose. L'esculetine se lie au citrate ferrique présent dans le milieu pour former un complexe brun foncé ou noir indiquant une réaction positive. **(H. Ghabour, 2020)**
- 14 souches sont VP positif, il y a production d'acétoïne tandis que 2 souches sont VP négatif (pas de production d'acétoïne). **(Bernhard Proskauer, 1998)**
- Le profil fermentaire (figure 76) : On constate que toutes les souches testées ont la capacité de métaboliser le ribose, l'arabinose, le mannitol, le tréhalose et le lactose. Aucune des souches ne métabolise l'insuline.

Il a été observé que les souches identifiées comme étant *E. faecium*, avaient des profils métaboliques différents : 92,86 % sont capables de métaboliser le sorbitol, 50% ont la capacité de métaboliser l'amidon et le raffinose, tandis que seulement 7,14% des souches *E. faecium* peuvent métaboliser le glycogène. Ces résultats mettent en évidence la diversité des profils fermentaires au sein de la même espèce, probablement due à des éléments de transfert tels que les plasmides. **(Tatiana Dimitriu, 2014)**

Les souches identifiées comme étant *E. faecalis* ont par contre le même profil fermentaire. Toutes les souches ne métabolisent ni le raffinose ni le glycogène, mais elles fermentent les sucres qui restent.

Résultats et Discussions

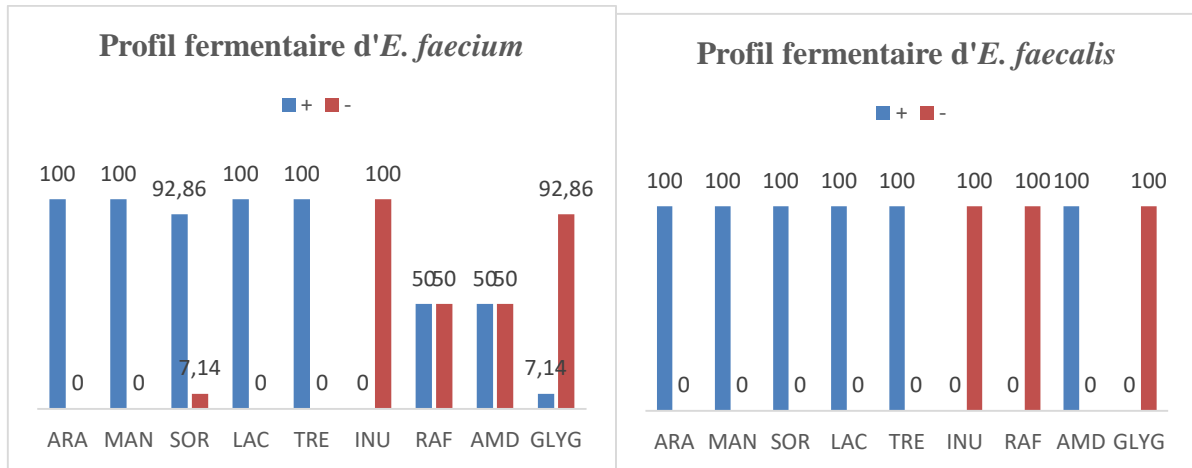


Figure 68 : Profil fermentaire des souches identifiées

ARA: Arabinose; MAN : Mannitol ; SOR : Sorbitol; LAC: Lactose ; TRE: tréhalose ; INU: Inuline ; RAF: Raffinose ; AMD: Amidon ; GLYG: glycogène

Parmi les 16 souches identifiées à l'aide des galeries Api 20 strept, 88% ont été identifiées comme étant *E. faecium*, tandis que 12% ont été identifiées comme étant *E. faecalis*.

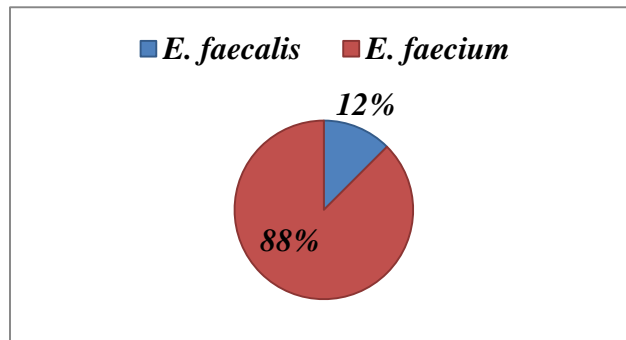


Figure 69 : Espèces d'entérocoques identifiées par la galerie Api 20 Strept

III- 6 Résultats de l'antibiogramme

La résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés à partir de l'eau de mer et des sédiments a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Une collection de 43 Souches isolées de l'eau de mer et des sédiments a été mise en place pour l'évaluation de l'état de résistance dans ces plages :

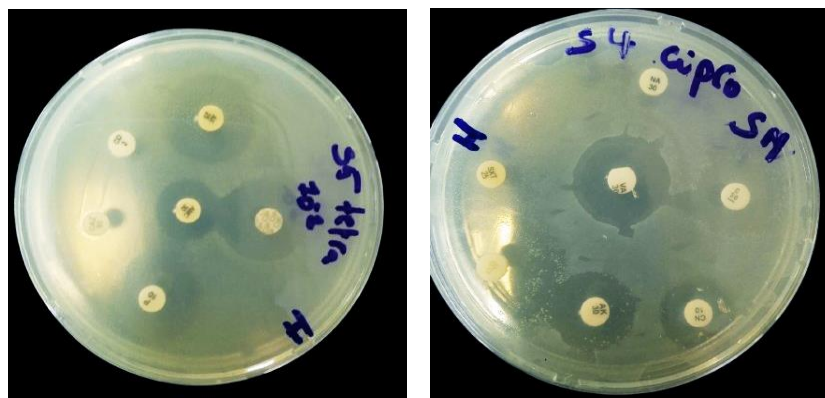


Figure 70 : Profil de résistance des souches isolées

Les disques d'antibiotiques :

Boite 01 : L'acide Nalidixide (NA) ; Vancomycine (VA) ; l'Amikacine (AK) ; Chloramphénicol (C) ; Doxycycline (DOXY) ; Triméthoprim - Sulfaméthoxazole (SXT) ; Gentamicine (CN)

Boite 02 : Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) ; Pénicilline G (P) ; Amoxicilline (AX) ; Céftazidime (CAZ) ; Cefalexine (CXN) ; Ciprofloxacine (CIP) ; Clindamycine (CD).

- Lors de la recherche de la production de céphalosporinases et de bêta-lactamases à spectre élargi chez les souches étudiées, il n'a été observé aucun signe d'antagonisme ou de synergie.

D'après la figure 72, tous les isolats présentent une résistance totale (100%) à l'Acide Nalidixique (NA) et à la Céfalexine (CXN).

Pour les souches isolées d'Ain Taya, Bateau Cassé, Kheloufi et Sidi Fredj, la sensibilité à la Vancomycine est de 100% (elles ne sont pas résistantes). En revanche, les souches isolées de la Sirène et de Colonel Abbes présentent un faible taux de résistance de 22,22% et 11,11% respectivement.

Pour la Gentamicine, les souches isolées de Kheloufi et de Sidi Fredj sont sensibles à 100%. Les stations Ain Taya et Bateau Cassé présentent un taux significatif de sensibilité de 75% et

Résultats et Discussions

85,61% respectivement, tandis que les deux stations la Sirène et Colonel Abbes affichent un taux de sensibilité de 66,67%.

Pour la Doxycycline (D), les souches isolées d'Ain Taya et de Colonel Abbes sont résistantes à 100%. Pour les stations : la Sirène et Kheloufi, on observe un taux significatif de résistance de 88,89% et 66,67% respectivement. Les stations Bateau Cassé et Sidi Fredj présentent des taux moyens de résistance de 42,86% et 40% respectivement.

Pour l'Amikacine (AK), les souches isolées d'Ain Taya présentent une résistance totale de 100%. En revanche, pour les souches de la Sirène, on observe une résistance moyenne de 44,44% (55,56% sont sensibles) tandis que les taux de résistance sont faibles au niveau des stations Bateau Cassé et Colonel Abbes, avec respectivement 14,29% et 11,11% (85,71% et 88,89% sont sensibles). Aucune résistance n'a été enregistrée au niveau des stations Kheloufi et Sidi Fredj (0%) où les souches sont sensibles à 100%.

Concernant le Chloramphénicol (C), toutes les souches d'Ain Taya sont sensibles à 100% (pas de résistance). En revanche, les souches de Bateau Cassé et de Sidi Fredj présentent une résistance significative, avec des taux de 71,43% et 60% respectivement (28,57% et 40% sont sensibles). Quant aux souches de la Sirène et de Kheloufi, elles affichent des taux moyens de résistance de 55,56% et de 44,44% respectivement (44,44% et 55,56% sont sensibles).

Pour Triméthoprim - Sulfaméthoxazole (SXT), les souches isolées à Ain Taya et Kheloufi présentent une résistance totale de 100%. Les souches de Bateau Cassé, la Sirène et Sidi Fredj montrent une résistance significative de 85,71%, 88,89% et 60% respectivement. En revanche, le taux de résistance est faible à la station Colonel Abbes avec 11,11%.

Pour l'Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC), les souches d'Ain Taya montrent une résistance à 100% (pas de sensibilité). Les souches des stations la Sirène et Sidi Fredj présentent un taux significatif de résistance, à savoir 66,67% et 60% respectivement. Quant aux souches des stations Bateau Cassé, Kheloufi et Colonel Abbes, elles affichent un taux moyen de résistance de 42,86%, 55,56% et 33,33% respectivement.

Pour la Pénicilline G (P), les souches de Sidi Fredj sont entièrement sensibles (100%), tandis qu'un taux élevé de résistance est observé à Ain Taya avec 75%. Les souches de la Sirène et Kheloufi présentent un taux de résistance de 55,55%, tandis que les stations Bateau Cassé et Colonel Abbes affichent des taux de résistance plus faibles, s'élevant à 28% et 25% respectivement.

Résultats et Discussions

Pour la Ciprofloxacin (CIP) et l'Amoxicilline (AX), les souches de Sidi Fredj ont montré une sensibilité totale, tandis que les souches d'Ain Taya ont montré une résistance de 25% pour la CIP et 50% pour l'AX. Au niveau de Bateau Cassé, la résistance était de 28,57% pour les deux antibiotiques. Pour Colonel Abbes, les pourcentages de résistance étaient de 11,11% pour la CIP et 33,33% pour l'AX. Enfin, les souches de la Sirène ont montré une résistance de 33,33% pour chaque antibiotique, et celles de Kheloufi une résistance de 33,33% pour la CIP et 44,44% pour l'AX.

Concernant la Clindamycine (CD), on constate une variation significative de la résistance parmi les souches étudiées : le taux le plus élevé de résistance a été observé aux stations Kheloufi et Colonel Abbes, avec 88,89%, suivi par Bateau Cassé avec 85,71%, Ain Taya avec 75%, la Sirène avec 66,67% et enfin Sidi Fredj avec 60%.

Pour la Céfotaxime, les souches présentes aux stations Sidi Fredj et Colonel Abbes sont toutes résistantes (100%). Des taux significatifs de résistance sont observés aux stations Kheloufi, Bateau Cassé et la Sirène, avec respectivement 88,89%, 83,33% et 71,43%. Le taux moyen de résistance à la Céfotaxime est de 50% à la station Ain Taya.

Résultats et Discussions

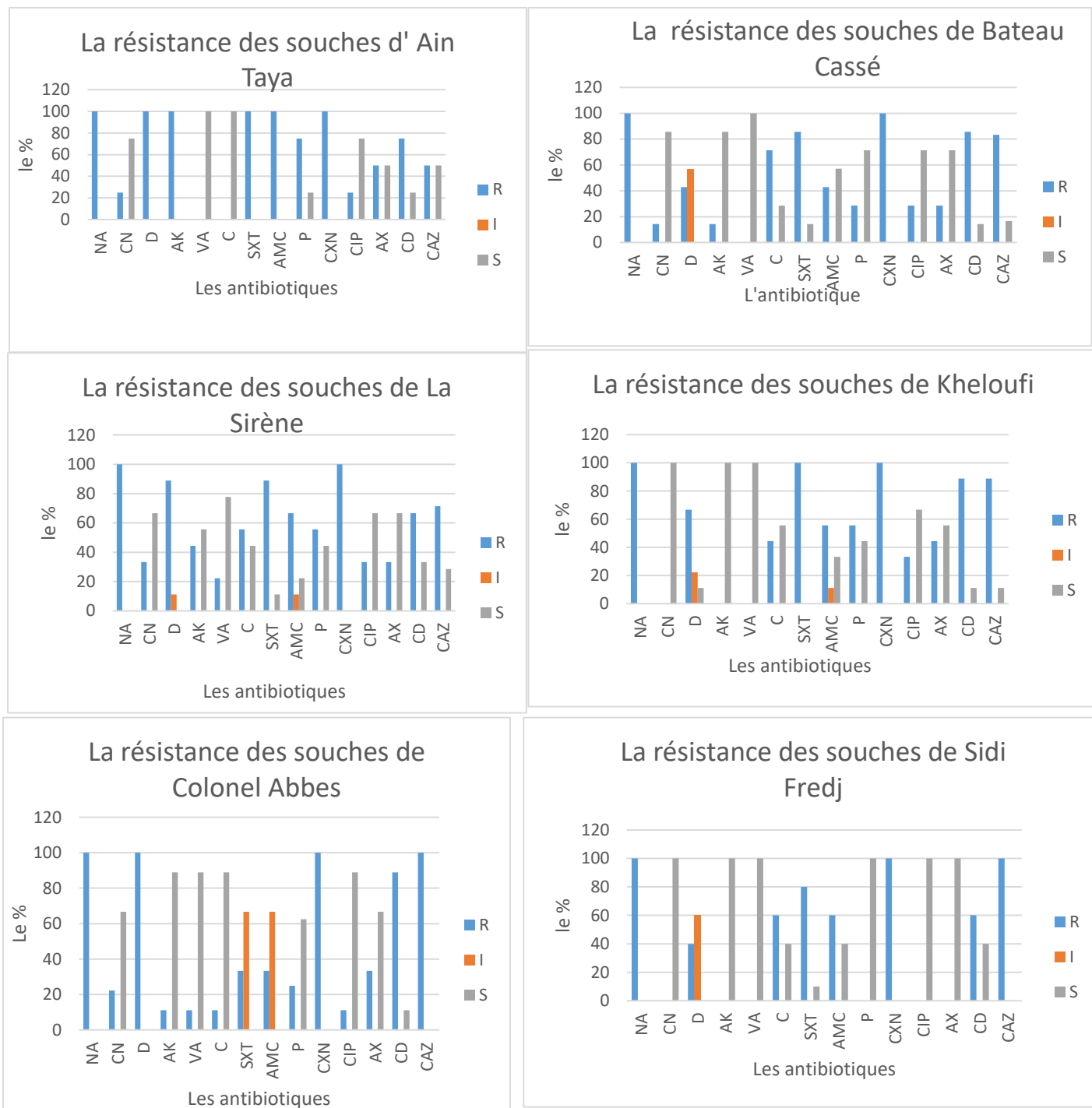


Figure 71 : Résultats de l'antibiogramme par site

L'acide Nalidixide (NA) ; Vancomycine (VA) ; l'Amikacine (AK) ; Chloramphénicol (C) ; Doxycycline (DOXY) ; Triméthoprime - Sulfaméthoxazole (SXT) ; Gentamicine (CN) ; Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) ; Pénicilline G (P) ; Amoxicilline (AX) ; Céfétazidime (CAZ) ; Cefalexine (CXN) ; Ciprofloxacine (CIP) ; Clindamycine (CD).

Résultats et Discussions

Selon la figure 73, il est important de noter que toutes les souches isolées sont entièrement résistantes à l'Acide Nalidixique (NA) et à la Céfalexine (CXN). En comparant nos résultats à l'étude d'**I. Bouatrous et A. Kara (2022)**, nous avons remarqué une similitude par rapport à l'Acide Nalidixique (NA), et une augmentation significative de la résistance à la Céfotaxime, qui était seulement de 24 % en 2022. Cependant, par rapport à l'étude menée par **A. Chaachoua 2021**, nous constatons un taux élevé de la résistance à l'Acide Nalidixique (68 %).

Dans notre étude, nous avons observé une forte résistance au Triméthopriime Sulfaméthoxazole (SXT) avec un taux de 93,02%, suivie de la Doxycycline (D) avec 83,72%, de la Céfotaxime (CAZ) avec 82,35% et de la Clindamycine (CD) avec 79,07%. En comparant nos résultats avec l'étude d'**I. Bouatrous et A. Kara (2022)**, nous avons constaté des résultats similaires pour le Triméthopriime Sulfaméthoxazole (SXT) (93%), et une augmentation significative pour la Clindamycine (CD) qui était de 45% et la Céfotaxime (CAZ) qui était nulle (0%).

En comparant nos résultats avec l'étude de **A. Kacimi et T. Ouazzi en 2018** portant sur des souches d'entérocoques isolées à partir de produits alimentaires, ainsi que l'étude de **L. Agrane et al (2023)** portant sur des souches d'*Enterococcus spp* isolées du portage intestinal chez la volaille, nous avons constaté que ces souches présentaient une faible résistance au SXT, avec des taux de 19,23% et 0% respectivement.

Nos résultats révèlent une résistance moyenne à l'Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) et au Chloramphénicol (C) avec un taux avoisinant les 48,84% suivie par la Pénicilline G (P) avec un taux de 40,48% et enfin l'Amoxicilline (AX) avec un taux de 32,56%.

En comparant nos résultats à ceux d'**I. Bouatrous et A. Kara (2022)** et **A. Chaachoua (2021)** nos valeurs montrent une augmentation du taux de résistance pour AMC, qui était de 5% en 2022 et de 36% en 2021.

Concernant les résultats du Chloramphénicol (C) par rapport à l'étude de **L. Belhout 2021** sur les souches d'entérocoques d'origine aviaire, on a constaté que nos résultats sont supérieurs à ceux de cette étude (10%). En ce qui concerne l'étude de **L. Agrane et al 2023** sur les souches d'*Enterococcus spp*. Isolées du portage intestinal chez la volaille, nos résultats sont presque identiques aux leurs (42,10%).

En ce qui concerne la Pénicilline G (P) par rapport à l'étude de **L. Belhout 2021** sur des souches d'entérocoques d'origine aviaire, on observe un taux de résistance de 30%. En ce qui concerne l'étude de **L. Agrane et al 2023** sur des souches d'*Enterococcus spp* le taux de résistance était

de 36,84%. Pour l'étude de **A. Kacimi et T. Ouazzi 2018** sur des souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires, le taux de résistance était de 23,07%.

En comparant nos résultats à ceux d'autres auteurs, tels que **F. Guessoum et H. Mokeddem (2019)** qui ont étudié les entérocoques responsables des infections dentaires, ainsi que **Benbelaid (2015)** qui a également étudié la résistance des souches d'*Enterococcus faecalis* isolées des infections des racines dentaires, nous avons constaté que nos souches sont résistantes, contrairement à celles des autres auteurs qui présentent une sensibilité équivalente de 100% à l'Amoxicilline (AX).

Dans notre étude, nous avons observé une faible résistance à la Ciprofloxacine avec un taux de 23,26%, à l'Amikacine (AK) et à la Gentamicine avec un taux de 16,28%, ainsi qu'un taux très bas pour la Vancomycine (9,30%).

En comparant nos résultats à ceux de **I. Bouatrous et A. Kara (2022)** ainsi qu'à ceux de **A. Chaachoua, (2021)**, nous avons observé une résistance plus faible à la Gentamicine en 2022 (29%) et en 2021 (50%), et à l'Amikacine en 2022 (36%) et en 2021 (68%). Nous avons également constaté une légère augmentation de la résistance à la Vancomycine (VA) qui était nulle en 2022 et 2021.

En revanche, par rapport à l'étude de **L. Belhout (2021)** et **L. Agrane et al (2023)** sur les souches d'entérocoques d'origine aviaire, ainsi qu'à celle de **A. Kacimi et T. Ouazzi (2018)** sur les souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires, aucune souche n'a montré de résistance à la Vancomycine (toutes sensibles).

Cependant, **L. Agrane et al (2023)** ont trouvé que toutes les souches d'*Enterococcus spp.* étaient sensibles à la Gentamicine. En revanche, dans l'étude de **F. Guessoum et H. Mokeddem (2019)** sur les entérocoques responsables des infections dentaires, ils ont observé un taux moyen de résistance de 35,71%.

Le taux de résistance à la Ciprofloxacine dans l'étude de **L. Agrane, et al. 2023**, était de 27,27%, tandis que dans l'étude de **A. Kacimi, T. Ouazzi 2018**, des souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires, aucune souche n'a montré de résistance à cet antibiotique (0%).

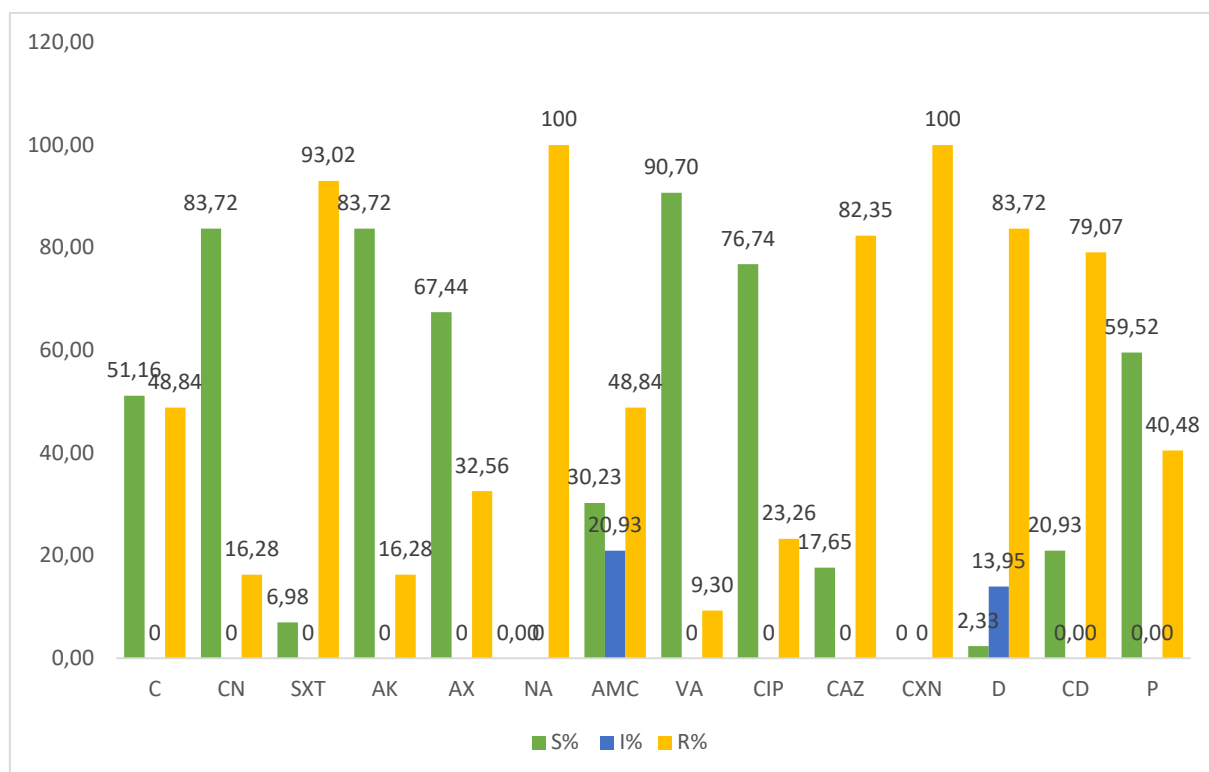


Figure 72 : Résultat de l'antibiogramme des souches isolées

L'acide Nalidixide (NA) ; Vancomycine (VA) ; l'Amikacine (AK) ; Chloramphénicol (C) ; Doxycycline (DOXY) ; Triméthoprime - Sulfaméthoxazole (SXT) ; Gentamicine (Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) ; Pénicilline G (P) ; Amoxicilline (AX) ; Céfotazidime (CAZ) ; Cefalexine (CXN) ; Ciprofloxacine (CIP) ; Clindamycine (CD).

Le profil de résistances des souches identifiées par galeries

Toutes les souches identifiées comme étant *E. faecalis* et *E. faecium* sont totalement résistantes à l'Acide Nalidixique et à la Céfalexine, et fortement résistantes au Triméthoprime-Sulfaméthoxazole avec un taux de 92,86%. Elles sont toutes sensibles à la Vancomycine, en raison de l'absence de gènes conférant une résistance aux glycopeptide (gènes Van A et B) **(Brykier, 1999)**.

Pour l'espèce *E. faecalis*, la résistance est totale (100%) à la Doxycycline, la Clindamycine et la Céfalexine, et moyennement résistante à la Gentamicine (50%) ainsi qu'à l'Amikacine, au Chlorophénicol, à la Pénicilline, à la Ciprofloxacine, à l'Amoxicilline et à l'Amoxicilline + Acide Clavulanique, avec un taux de 50%.

Pour l'espèce *E. faecium*, les souches présentent une forte résistance à la Clindamycine (71,43%), suivie par la Céfotaxime (66,67%) et la Doxycycline (64,29%) (Le pourcentage restant représente des souches intermédiaires), et une résistance moyenne pour le Chloramphénicol (53,85%), suivi de l'Amoxicilline + Acide Clavulanique (42,86%). Le taux de résistance est très faible pour la Gentamicine, la Ciprofloxacine et l'Amoxicilline, avec un taux de 28,29%, et pour l'Amikacine avec un taux de résistance de 14,29%.

On peut dire que :

Les souches présentent une résistance totale à l'Acide Nalidixique ; c'est une résistance due à plusieurs causes comme les enzymes tels que la DHPS et la DHFR qui dégradent l'Acide Nalidixique, le rendant ainsi inactif. (Yvon Michel-Briand, 2006)

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 la sensibilité à la Vancomycine, cela est généralement lié à l'absence des gènes conférant une résistance aux glycopeptides, tels que les gènes VanA et VanB. (Brykier, 1999).

Les souches d'*Enterococcus faecalis* qui montrent une résistance naturelle à la Clindamycine sont souvent liées à la présence du gène « Isa », qui code pour une protéine apparentée à une pompe d'efflux. Cette protéine empêche la fixation de l'antibiotique au ribosome, ce qui rend les bactéries résistantes à la Clindamycine (Agrane et Akhmoum, 2023)

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 la fixation de la Tétracycline

Pour les souches qui présentent une résistance à la Gentamicine et à l'Amikacine, cela indique que ces souches peuvent posséder une enzyme capable de dégrader ces deux antibiotiques, ainsi que l'utilisation de protéines d'efflux pour expulser l'antibiotique hors de la cellule bactérienne.

Les souches qui présentent une résistance au Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (TMP-SMX) ont souvent des mutations dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide folique.

Résultats et Discussions

Pour les souches qui présentent une résistance au Chloramphénicol, plusieurs mécanismes sont possibles. Par exemple, les bactéries produisent des enzymes telles que le chloramphénicol acétyltransférase qui acétylent le chloramphénicol, le rendant ainsi inactif.

- La majorité des résistances observées sont liées à des mécanismes tels que : inactivation enzymatique, modification de la cible, diminution de la perméabilité membranaire.

En outre, les mécanismes de résistance peuvent varier d'une espèce à une autre et même au sein de la même espèce, ce qui donne une diversité de profils de résistance.

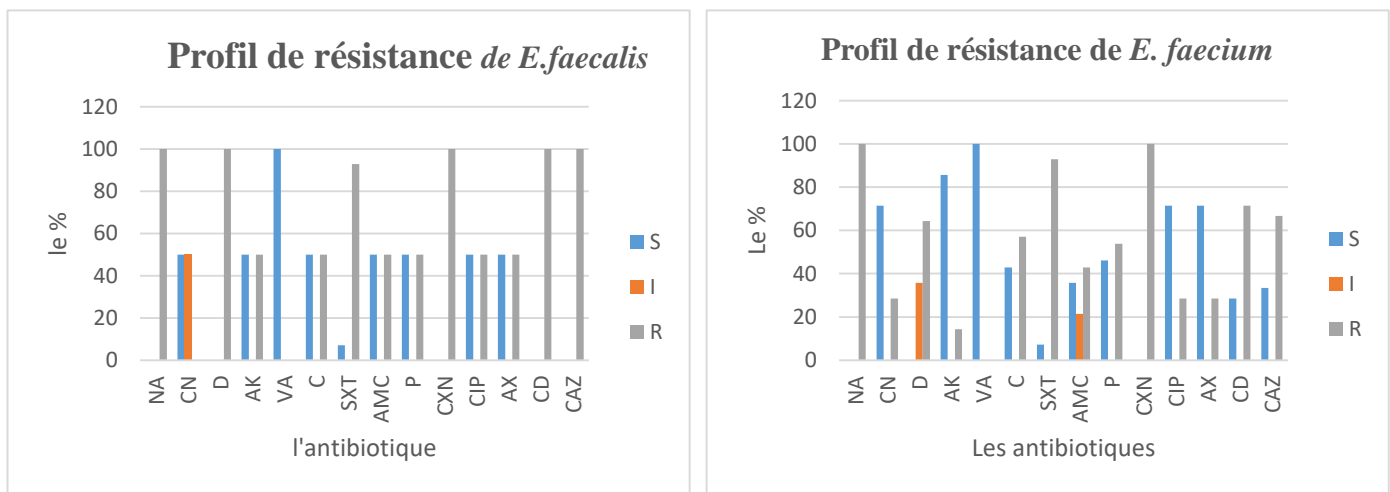


Figure 73 : le profil de résistance des souches identifiées

L'acide Nalidixide (NA) ; Vancomycine (VA) ; l'Amikacine (AK) ; Chloramphénicol (C) ; Doxycycline (DOXY) ; Triméthoprime - Sulfaméthoxazole (SXT) ; Gentamicine (Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) ; Pénicilline G (P) ; Amoxicilline (AX) ; Céftazidime (CAZ) ; Cefalexine (CXN) ; Ciprofloxacine (CIP) ; Clindamycine (CD).

III 7- Résultats des tests de virulence :

a) Test de biofilm

Selon les résultats présentés dans la figure ci-dessous, 83 % des souches testées se révèlent être de faibles productrices de biofilm, présentant une densité optique (DO) inférieure à 0,1.

Les souches Btetra-2 et S-1 se distinguent nettement par leur capacité élevée à produire du biofilm, avec des DO respectives de 0,8 et 0,6. Ces valeurs indiquent que ces souches possèdent une forte production de biofilm.

En ce qui concerne les souches Khacip0, Khalgen-1, Khaltet-1 et Khaltet-3, elles sont classées comme moyennement productrices de biofilm avec des DO de 0,1, 0,1, 0,37 et 0,11 respectivement. Cette classification intermédiaire suggère une capacité de formation de biofilm modérée, ce qui pourrait avoir des implications variées selon le contexte écologique ou clinique de ces souches.

Les souches à forte production de biofilm, comme Btetra-2 et S-1, pourraient jouer un rôle crucial dans les infections chroniques et la résistance aux traitements.

Les souches moyennement productrices de biofilm, bien que moins problématiques que les fortes productrices, peuvent néanmoins contribuer à la formation de biofilms mixtes. (**A. Ben Hadj et al 2016**)

I. Bouatrous, A. Kara 2022 ont trouvé que la majorité des souches étudiées étaient moyennement productrices de biofilm, avec des densités optiques (DO) comprises entre 0,1 et 0,5. La DO la plus élevée a été observée pour la souche SFtet, qui présente une adhésion partiellement plus importante aux surfaces. D'autres souches, telles que Bctet et Coltet, ont montré des DO de 0,12, tandis que la souche la moins productive, Cozith, avait une DO inférieure à 0,1. Notre étude a révélé que 83,7 % des souches testées sont de faibles productrices de biofilm, avec des DO inférieures à 0,1.

En comparant nos résultats avec ceux **d'Aouine et al. (2022)**, nous avons constaté des différences significatives. Alors qu'**Aouine et al.**, ont rapporté que près de 90 % des souches isolées à partir du poulet avaient la capacité de former du biofilm in vitro, avec seulement une souche présentant une forte formation et 27,77 % montrant une formation moyenne, nos résultats indiquent une prédominance de souches à faible production de biofilm (83,7 %) et seulement 11,62 % de souches moyennement productrices.

Ces différences peuvent s'expliquer par des variations dans les conditions expérimentales, les sources d'isolement, ou des caractéristiques génétiques spécifiques des souches étudiées. (**Flemming et al., 2010**) sans oublier l'utilisation abusive des antibiotiques dans les élevages de poulet.

En revanche, l'étude **d'Osman et al. (2019)** montre que toutes leurs souches isolées avaient la capacité de produire du biofilm.

De manière encore plus contrastée, l'étude de **Diarra et al. (2010)** n'a révélé aucune capacité de formation de biofilm parmi les souches testées. Ceci souligne une variabilité extrême entre les différentes études.

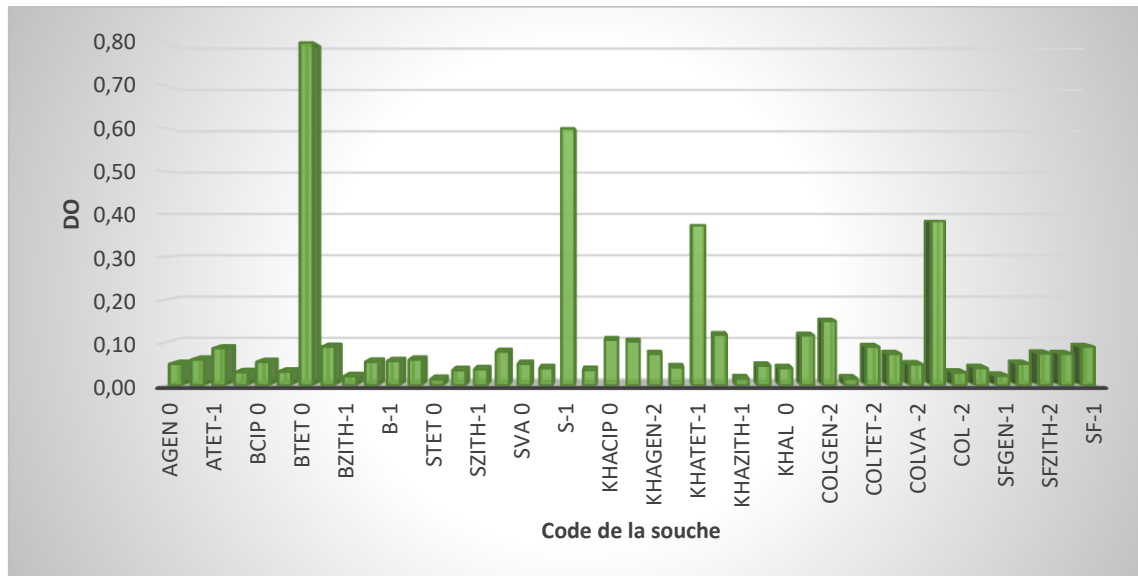


Figure 74 : Résultat de la production de Biofilm

b) Les Résultats de l'hémolyse

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 les dites souches (**Merabet & Maouche, 2018**) (Figure 75)



Figure 75 : Résultats du test d'hémolyse (milieu Columbia + sang).

(Formation de zone transparente qui représente l'hémolyse β : dégradation totale de l'hémoglobine)

D'après la Figure 76, il a été constaté que 60 % de nos souches sont capables de dégrader partiellement l'hémoglobine, ce qui suggère qu'elles pourraient appartenir au genre *Enterococcus faecium*. En revanche, 28 % des souches sont capables de la dégrader totalement, ce qui pourrait indiquer la présence de l'enzyme responsable de cette dégradation et seulement 12 % des souches ne semblent pas être capables de dégrader l'hémoglobine, d'après ces résultats, on suggère la présence d'*Enterococcus faecalis*.

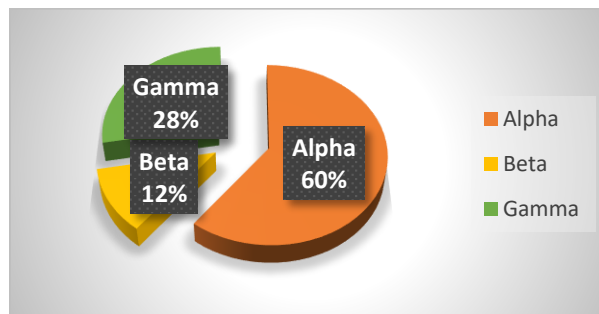


Figure 76 : Résultats du test d'hémolyse

c) Test de la Gélatinase

L'apparition d'une zone transparente autour des puits, signifie que ces isolats possèdent le phénotype [GEL], une protéase (la Gélatinase) capable d'hydrolyser la gélatine. (Figure 73)

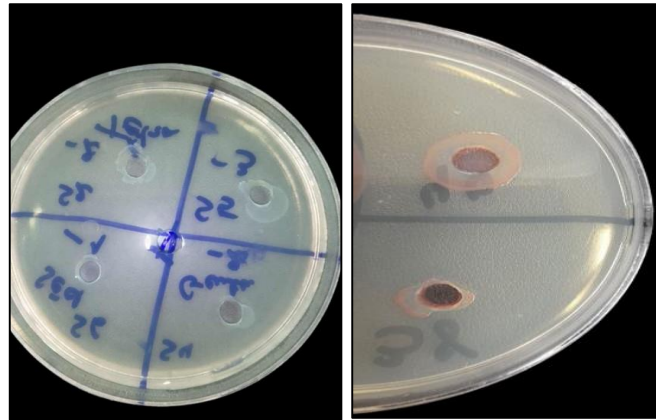


Figure 77 : Apparition d'une zone transparente autour des puits

Les résultats de la Figure 78 indiquent que 56% des souches testées ont la capacité de dégrader la gélatine, tandis que 44% ne le sont pas en raison de l'absence du phénotype [GEL].

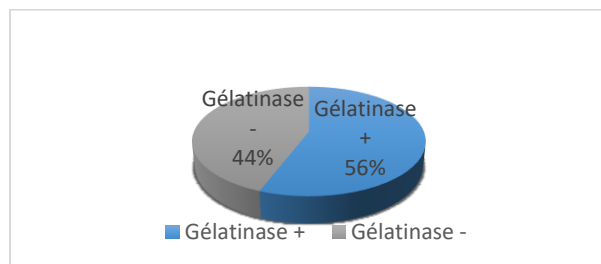


Figure 78 : Résultats du test Gélatinase

Le profil de virulence des 16 souches identifiées est résumé dans le tableau suivant :

D'après le tableau 11, on constate que les souches identifiées comme étant *E. faecalis* présentent le même profil de virulence, tandis que les autres souches identifiées comme étant *E. faecium* montrent une diversité de gènes au sein de la même espèce.

Tableau 10 : Profil de virulence des souches identifiées :

Espèce	Origine	Gélatinase	Hémolyse	Biofilm
<i>E. faecalis</i>	Agen-1	+	Gamma	Faible
	Khzith -2	+	Gamma	Faible
<i>E. faecium</i>	Agn0	+	Alpha	Faible
	Bcip0	+	Alpha	Faible
	Bsedi-1	-	Alpha	Faible
	Bzith-1	+	Gamma	Faible
	Scip-2	-	Alpha	Faible
	Szith-1	+	Alpha	Faible
	Sva 0	+	Gamma	Faible
	Khcp0	-	Alpha	Moyen
	Khtet-1	+	Gamma	Moyen
	Kh0	-	Alpha	Faible
	Colva-2	-	Gamma	Moyen
	Col-2	+	Alpha	Faible
	Col-3	-	Alpha	Faible
	SFzith-2	-	Alpha	Faible

III-6 Production de bactériocine par antagonisme

Un autre objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de certaines souches d'entérocoques à produire des entérocoques, capables d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes comme *E. coli* (Ispirli et al., 2015). Pour ce faire, nous avons testé nos souches contre une *E. coli* pathogène. Les résultats ont révélé que certaines souches présentaient des zones d'inhibition, indiquant qu'elles produisent des bactériocines. En revanche, d'autres souches n'ont montré aucune zone d'inhibition, suggérant qu'elles ne sont pas bactériocinogènes. Sur les 43 souches testées (Figure 81), 9% ont montré un résultat positif, tandis que les autres étaient négatives (91%), ce qui suggère que les souches produisant des entérocoques appartiennent probablement à l'espèce *Enterococcus faecium* (Ispirli et al., 2015).

Nos résultats ont indiqué que les 04 souches qui ont la capacité de produire des bactériocines appartiennent à l'espèce *E. faecium*. Les bactériocines produites appartiennent principalement à la classe II a, également appelées "bactériocines de type pediocine.



Figure 79 : Extrait de bactériocine

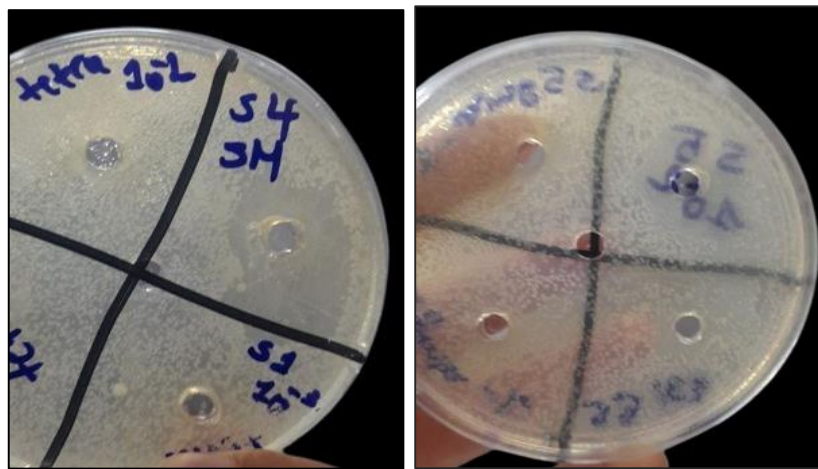


Figure 80 : Antagonisme des souches d'entérocoques

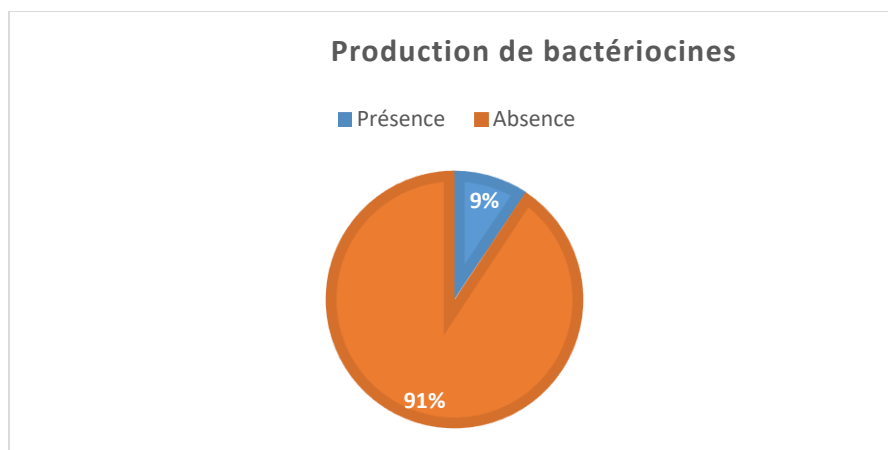


Figure 81 : Production de bactériocines

III-7 Discussion générale

Les entérocoques, bien que souvent associés à des environnements intestinaux, sont fréquemment isolés de l'eau de mer et des sédiments marins, révélant une persistance notable dans les milieux aquatiques. Leur présence dans ces écosystèmes est un indicateur clé de la qualité microbiologique de l'eau et soulève des questions cruciales sur la contamination fécale et la santé environnementale. (Clausen et al., 1977 ; Edberg et al., 1997 ; OMS, 2000)

Les entérocoques, notamment *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, sont des agents pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales sévères. Ces bactéries peuvent provoquer des infections urinaires, des bactériémies, des endocardites et des infections des plaies, particulièrement préoccupantes en raison de leur résistance croissante aux antibiotiques. Leur présence dans l'environnement marin souligne non seulement les risques pour la santé humaine via les activités récréatives, mais aussi le potentiel de dissémination de gènes de résistance dans les écosystèmes aquatiques. (Luciana Furlaneto- Maia et al, 2013).

Nos résultats ont montré une sensibilité à deux antibiotiques appartenant à la famille des Aminocyclitolides : Amikacine et Gentamicine avec un taux de résistance très faible (Taux de sensibilité de 83,72 % pour la Gentamicine). Nos résultats vont dans le sens de ceux d'A. Chaachaou (2021) et I. Boutrouas et A. Kara (2022) qui ont également observé une sensibilité significative pour ces deux antibiotiques. L'étude de L. Agran et al. (2023) a également montré une sensibilité totale à la Gentamicine. En revanche, Guessoum et H. Mokeddem (2019) ont trouvé une sensibilité faible, tandis que Kacimi et T. Ouazzi (2018) ont rapporté une sensibilité réduite.

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, en particulier dans le traitement des infections entérocoquiques chez les patients immunodéprimés (Kayser, 2003). L'analyse du profil de résistance de nos isolats révèle une résistance alarmante à la Céfalexine, avec un taux de 100%. Ce constat contraste fortement avec les résultats de I. Boutrouas et A. Kara (2022), qui n'ont pas observé une telle résistance ainsi que l'étude de 2021 de A. Chaoucha qui a rapporté une absence totale de résistance. Les entérocoques sont souvent considérés comme naturellement résistants aux antibiotiques de la famille des Bêta-lactames (Kak et Chow, 2002). Concernant d'autres antibiotiques de cette famille, notre étude a indiqué une résistance de 82,35 % au Céfotaxime, ce qui est en contradiction avec les études précédentes d'A. Chaoucha (2021) et I. Boutrouas et A. Kara (2022). Pour la Pénicilline

G, nous avons observé une résistance de 40,48 %. Des résultats similaires ont été trouvés par **L. Belhout (2021)** et **Agrane et al (2023)**.

La résistance à l'Amoxicilline associée à l'Acide Clavulanique (AMC) est de 48,84 %, ce qui est en accord avec les études de **A. Chaouchaa (2021)** et **I. Bouatrous et A. Kara (2022)**. En revanche, la résistance à l'Amoxicilline seule est de 32,56 %, contrairement aux résultats des études de **Guessoum et H. Mokeddem (2019)**, ainsi que ceux de **Benblaid (2015)**.

La résistance des entérocoques aux glycopeptides, en particulier à la Vancomycine, reste un sujet de préoccupation majeure dans le domaine de la microbiologie clinique. Dans notre étude, nous avons observé un taux de résistance relativement faible de 9,30 % pour la Vancomycine, contrairement aux résultats rapportée par plusieurs études antérieures (**A. Chaachoua, 2021 ; I. Bouatrous et A. Kara, 2022 ; Kalibi et al., 2013 ; Benblaid, 2015 ; Belhout, 2021 ; Agrane et al., 2023 ; Hammad et al., 2014**).

Il y a des travaux qui ont révélé l'émergence de souches d'entérocoques résistantes à la Vancomycine dans divers types d'aliments (**Robredo et al., 2000 ; Valenzuela et al., 2008 ; Koluman et al., 2009 ; Lopez et al., 2009 ; Yilmaz et al., 2016**). Cette émergence est souvent attribuée à l'utilisation excessive d'Avoparcine, un promoteur de croissance chez les animaux, favorisant la sélection de souches résistantes à la Vancomycine qui sont ensuite transmises à l'homme via la chaîne alimentaire (**Koluman et al., 2009**). Les variations dans les taux de prévalence des entérocoques résistants à la Vancomycine (ERV) peuvent s'expliquer par les différences dans les politiques d'utilisation des antibiotiques chez les animaux (**Klibi et al., 2013**). De plus, l'utilisation intensive de la Vancomycine, la transmission croisée, et le transfert génétique des gènes de résistance sont les principaux facteurs contribuant à la prévalence croissante des ERV (**Bourafa et al., 2016**)

Le taux élevé de résistance observé dans notre étude pour la famille des phénicoles, atteignant 48,84 %, est en accord avec les résultats rapportés par **L. Agrane et al. (2023)**. De plus, il est notablement plus élevé que celui rapporté par **L. Belhout (2021)**. Cette disparité peut être attribuée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, les différences méthodologiques entre les études, telles que les techniques de diagnostic et les critères de résistance utilisés, peuvent influencer les résultats. De plus, les variations géographiques et temporelles dans l'utilisation des phénicoles dans l'élevage animal et la médecine vétérinaire peuvent également y jouer un rôle. (**A. krir et al 2019**)

Le taux élevé de résistance observé dans notre étude pour la famille des sulfamides, notamment vis-à-vis de la molécule Triméthoprim- Sulfaméthoxazole (SXT), atteint 93,02 %, ce résultat est en accord avec ceux rapportés par plusieurs autres auteurs, dont **A. Chaachoua (2021)** et **A. Kacimi et T. Ouazzi (2018)**, qui ont également constaté une résistance moyenne mais variable. Cependant, nos résultats sont contradictoires avec les résultats rapportés par **L. Agrane et al. (2023)**. Les variations dans les pratiques d'utilisation des sulfamides dans différents contextes géographiques ou cliniques pourraient contribuer à ces différences. Par exemple, des schémas d'antibiothérapie spécifiques peuvent causer ces différentes infections, les entérocoques doivent être capable de coloniser les tissus de l'organisme de l'hôte, résister aux mécanismes de défense immunitaire, causer des changements pathologiques. Des pressions de sélection locales pourraient également favoriser l'émergence de souches résistantes dans certaines régions. (**Hammad et al. 2015 ; Pharmaco médicale. org 2017**).

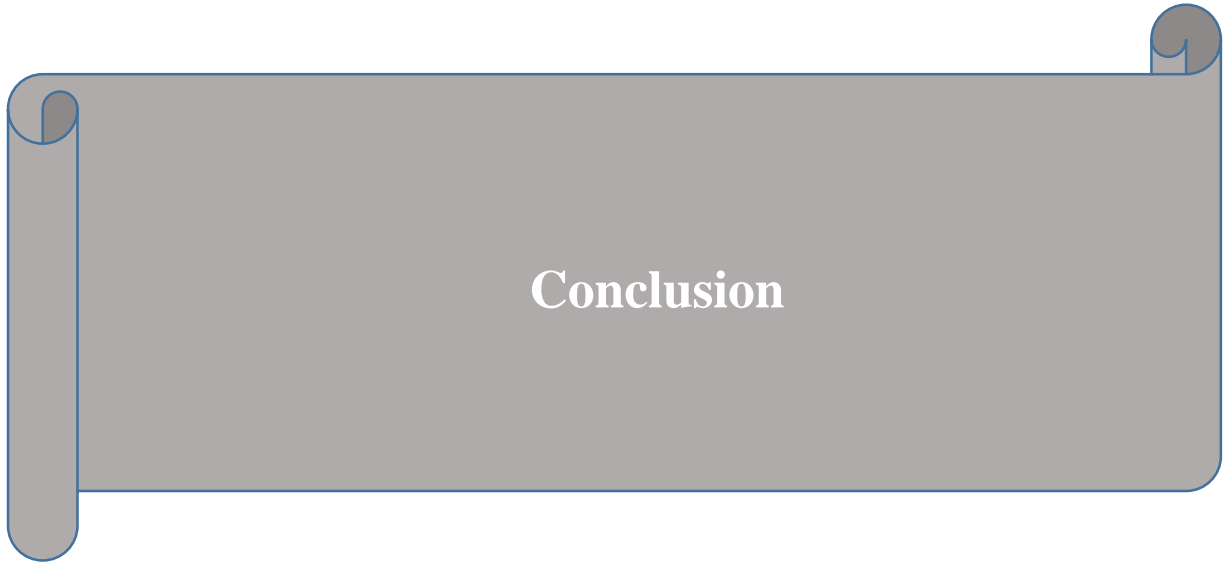
Toutes les souches isolées étaient dotées d'une Gélatinase. Nos résultats rejoignent ceux de **Klibi et al, 2013**, concernant des souches isolés des viandes notant que la Gélatinase est une enzyme qui hydrolyse le collagène et d'autres peptides bioactifs (**kamenitsu et al .2001**). Cette enzyme est codée par le gène gelE, situé sur le chromosome bactérien. La présence de ce gène est l'un des facteurs de virulence associés aux entérocoques généralement observé chez les *E. faecalis* et *E. faecium* (**Chaje, cka- Wierzchowska et al, 2017**).

Parmi les souches analysés et identifiés (16/43), *Enterococcus faecium* était la plus détectée (14/16), suivie d'*Enterococcus faecalis*. Nos résultats rejoignent ceux de **Gomes et al. (2008)** et **Pesavento et al. (2014)** qui ont signalé qu'*E. faecium* était l'espèce dominante dans les aliments analysés. En revanche, **Klibi et al. (2013)** et **Yilmaz et al. (2016)** ont rapporté qu'*E. faecalis* était l'espèce la plus observée dans les produits laitiers analysés. Ces divergences dans la fréquence d'identification des entérocoques peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, tels que les variations géographiques, les différences dans les sources de contamination, et les conditions spécifiques des environnements étudiés.

Des études antérieures ont démontré les propriétés bénéfiques des entérocoques dans les produits alimentaires, notamment leur capacité à produire des bactériocines, qui prolongent la durée de conservation des aliments et inhibent les bactéries indésirables (**Rohaiem et al., 2016**). Ainsi, l'utilisation des entérocoques peut améliorer le profil de sécurité sanitaire des aliments, en particulier en contrôlant des pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (**Relery et Wertz, 2002 ; Galvez et Ben Omar, 2007**). Dans ce contexte, nous avons déterminé l'activité antagoniste de quelques souches d'entérocoques contre une *E. coli* pathogène. Les résultats

Résultats et Discussions

montrent un effet antagoniste des souches d'*Enterococcus* testées. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs ayant démontré la capacité des souches d'*Enterococcus*, notamment *E. faecium*, à sécréter des entérocoïnes inhibant une large gamme de microorganismes pathogènes. Par exemple, **Rivas et al. (2012)** ont démontré que des souches d'*Enterococcus faecium* isolées du lait de brebis exerçaient un effet antagoniste contre *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*. De nombreuses études corroborent 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; Rehaïem et al., 2016 ; Aspri et al., 2017; Hwanhlem et al., 2017; Perumal et Venkatesan, 2017**)



L'objectif principal de cette étude était de rechercher et d'évaluer la résistance aux antibiotiques ainsi que la virulence chez les entérocoques isolés du milieu marin à partir de différentes plages, exposées à divers niveaux d'apports anthropiques.

Les analyses microbiologiques ont révélé que le taux des entérocoques dépasse la norme algérienne, à l'exception de la plage d'Ain Taya.

L'étude de la résistance aux antibiotiques a montré une résistance élevée des souches d'entérocoques à l'Acide Nalidixique, suivie de la Céfalexine, du Triméthoprime-Sulfaméthoxazole, de la Doxycycline, de la Ceftazidime et de la Clindamycine. Une résistance moyenne a été observée pour la Ciprofloxacine, l'Amikacine et la Gentamicine, tandis que la résistance à la Vancomycine était très faible (9,3 %). De plus, la majorité des souches testées étaient faiblement productrices de biofilm.

Les résultats de l'hémolyse révèlent que 60 % des souches présentent une hémolyse partielle (Alpha-hémolyse) et 28 % des souches présentent une hémolyse totale (Bêta-hémolyse), tandis que 12 % des souches n'ont montré aucune capacité à dégrader l'hémoglobine (Gamma-hémolyse).

Les résultats de notre étude ont démontrés également la capacité des souches d'*Enterococcus*, en particulier *Enterococcus faecium*, à sécréter des entérocoques inhibant une large gamme de microorganismes pathogènes tels qu'*Escherichia coli*, soulignant ainsi leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens naturels.

Notre étude, nous a permis donc de classer les entérocoques en souches partiellement virulentes et en d'autres qui le sont moins. Ces dernières peuvent avoir un intérêt dans des applications biotechnologiques telles que leur potentiel probiotique et leur rôle dans la conservation des aliments.

L'identification de 16 isolats a permis de déterminer 14 souches appartenant à l'espèce *Enterococcus faecium* et 2 souches appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis*.

En perspective, il est nécessaire d'utiliser des techniques moléculaires pour une identification génotypique précise des isolats et une caractérisation des gènes de résistance et de virulence ainsi que l'exploration de l'activité antagoniste de ces entérocoques contre d'autres germes pathogènes. Ces perspectives pourraient améliorer la compréhension des mécanismes de résistance et le contrôle de la dissémination des pathogènes dans les environnements marins.

Conclusion

En conclusion, cette étude a mis la lumière sur l'importance de surveiller les entérocoques dans les environnements marins afin d'évaluer les risques sur la santé publique. Tous ces risques sont liés aux différents apports anthropiques. Une stratégie de gestion visant à limiter la propagation de souches virulentes et résistantes aux antibiotiques est nécessaire.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Achour, S., Djemai, H., Tine, S. (2023).** Effets inhibiteurs de certaines huiles essentielles vis-à-vis des entérocoques responsables des infections dentaires. médecine dentaire.Biskra . Université Mohamed Khider de Biskra. Disponible sur le site web <http://archives.univbiskra.dz/handle/123456789/13419>
- **Adjeroud Nadjat, N., Meriem, N. (2014).** La recherche des bactéries antibiorésistantes dans les eaux de surface : cas de l'oued Messida (Nord-Est Algérien). Thèses Algérie. Disponible sur le site : <https://theses-algerie.com/2214314786720079/memoire-de-master/universite-8-mai-1945-guelma/la-recherche-des-bacteries-antibioresistantes-dans-les-eaux-de-surface-cas-de-l-oued-messida-nord-est-algerien>
- **Agrane, L. (2023)et al .** Prévalence et caractérisation phénotypique (facteurs de virulence et antibiorésistance) des souches d'Enterococcus spp. isolées du portage intestinal chez la volaille.Microbiologie,Tizi-Ouzou.Université Mouloud Mammeri . disponible sur le site : <https://dspace.ummo.dz/items/a62211b6-568d-4aa7-8ce2-05add6a6956c>
- **Ahlem, A., Rania, D., Houria, D. (2021).** Des bactéries lactiques productrices des bactériocines isolées à partir du Colostrum et caractérisation de leur activité antimicrobienne vis-à-vis des souches cliniques. Disponible sur le site : <https://t.me/c/2147553238/7>
- **Ahlam et al. (2021).** Diversité et utilisation des plantes spontanées de la région de Dar Chioukh (w. Djelfa) dans la pharmacopée traditionnelle. Djelfa.Université Ziane Achour
- **Almakki, A. Q. M. (2017).** Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri hospitalières considérées dans un continuum hydrologique (En ligne).(consulté le 25/03/2024). Thèses HAL.disponible sur le site <https://theses.hal.science/tel-01684701>
- **Amensag, K. (2019).** Les bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels marocains : production de bactériocines et applications potentielles contre des pathogènes multirésistants aux antibiotiques.(En ligne) . (Consulté le: 05/04/2024)Thèses HAL. Disponible sur le site <https://theses.hal.science/tel-03934550>
- **Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012).** The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. Nature Reviews Microbiology. (consulte le 04/07/2024). disponible sur le site : <https://www.nature.com/articles/nrmicro2761>
- **Atlas, R. M. (1995).** Legionella contamination of dental-unit waters. Applied and Environmental Microbiology, 61(4), P.P.1208-1213. (consulte le (04/07/2024). Disponible sur le : <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.61.4.1208-1213.1995>
- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., & Technologie, C. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines. Disponible sur : Revue.umc.edu.dz.
- **Bagci, U., Togay, S. O., Temiz, A., & Ay, M. (2019).** Probiotic characteristics of bacteriocin-producing Enterococcus faecium strains isolated from human milk and colostrum. Folia Microbiologica, 64(6),P.P. 735-750.disponible sur <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00687-2>
- **Balsalobre, C., et al. (2019).** Beta-lactams. Wiley Online Library. Disponible sur <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119282549.ch3>
- **Barefoot, S. F., Klaenhammer, T. R. (1983).** Inhibitions obtenues par la méthode par des souches de Ln1, Ln2, Ln3, Ln11 (Leuconostoc mesenteroides subs mesenteroides).
- **Belhout, L., & Amel, A. (2021).** Isolement et caractérisation des souches d'enterocoques d'origine aviaire. Microbiologie. BLIDA.Université de Blida 1 .(consulte le 04/07/2024) . disponible sur le site web : <https://di.univ-blida.dz/xmlui/handle/123456789/14065>
- **Benbelaid, F. (2015).** Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur Enterococcus faecalis responsable d'infections d'origine dentaire.Microbiologie Tlemcen. Université de Tlemcen.

Références bibliographiques

- **Ben Omar, N., Zet al.(2004)**. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. (En ligne).(Consulté le 09/02/2024) .Systematic and Applied Microbiology, 27,P.P. 118-130. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.1078/072320204322881813>
- **Benghazi, B., Belhassab, N. (2023)**. Étude comparative de la qualité microbiologique de l'eau de Barrage Bouhamdan (Guelma) et Zit-Emba (Skikda). Microbiologie . Guelma .Université de Guelma.disponible sur le site : <http://dspace.univguelma.dz/jspui/handle/123456789/15133>
- **Berche, P., et al. (1988)**. Emergence of vancomycin resistance in the genus Streptococcus: characterization of a vanB transferable determinant in Streptococcus bovis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.(consulte le 04/07/2024). Disponible sur le site : <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.41.1.24>
- **Bhardwaj, A., Malik, R. K., Chauhan, P. S. (2008)**. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. SpringerLink. (Consulte le 04/07/2024).disponible sur le site : <https://link.springer.com/article/10.1007/s12088-008-0041-2>
- **Birnbaum, J., et al. (1985)**. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: discovery and development of imipenem/cilastatin.
- **Bouatrous, K., & Kara, A. (2022)**. Caractérisation et évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques isolés dans le milieu marin.Dely Ibrahim .Ecole National Supérieure des sciences de la mer et de l'Aménagement du littoral .
- **Bourafa, N., Loucif, L., Boutefnouchet, N., & Rolain, J. M. (2015)**. Enterococcus hirae, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: First case report in Algeria. New Microbes and New Infections,P. 8, P.P.7-9.
- **Boussouar, F. (2017)**. Caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle du Sud-ouest algérien.Microbiologie.Tlemcen.Université de Tlemcen .
- **Bouvet, A. (1994)**. Identification des entérocoques en microbiologie clinique. Canadian Journal of Microbiology, 57(12), P.P.993-1001. Consulte le 04/07/2024) disponible sur le site web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0399077X05802963>
- **Bryskier, A. (1999)**. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses. (Consulte le 24/07/2024). Disponible sur le site web : <https://www.editions-ellipses.fr/accueil/11282-antibiotiques-agents-antibacteriens-et-antifongiques-9782729847128.html>
- **Bush, K., Bradford, P. A. (2016)**. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. (Consulte le 04/07/2024).disponible sur le site : <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/6/8/a025247.short>
- **Butler, M. et al (2017)**. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. Nature Reviews Microbiology, 15(11), P.P.679-686.(consulte 04/07/2024). disponible sur le site web : <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.101>
- **Capelo-Martínez, J. L., Igrejas, G. (2020)**. Diversity and genetic lineages of environmental staphylococci: A surface water overview.
- **Casadevall, A., Pirofski, L. (2001)**. Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage–response framework. Journal of Water and Health, 7(S1), S2-S.
- **Chandrika, N. T., Garneau-Tsodikova, S. (2018)**. Resistance to aminoglycosides: Glycomics and the link to the human gut microbiome. Wiley Online Library. Disponible sur le site : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119282549.ch1>
- **Chopra, I., Roberts, M. (2001)**. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular

Références bibliographiques

Biology Reviews, 65(2), P.P.232-260..disponible sur le site : <https://mibr.asm.org/content/65/2/232.short>

- **Darghouth, A., Laâroussi, H. (2020).** Contamination des eaux souterraines par les entérocoques : cas de la station d'épuration de Rezé (France). Université de La Rochelle. Disponible sur le site : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02380871>
- **Dehkordi, F. S., et al. (2014).** Occurrence of Enterococcus spp. and detection of vanA and vanB genes in raw and treated wastewater in Isfahan. Journal of Applied Microbiology, 117(2), P.P.412-421.
- **Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P. (1995).** Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33(1), P.P.24-27.
- **Eckburg, P. B., et al. (2005).** Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, 308(5728), 1635-1638. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38(9), 1980-1983. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.1980>
- **Eladi, A. H. (2015).** Résistance aux antibiotiques chez Enterococcus spp. isolés de volailles en Égypte. Journal of Applied Microbiology, 118(3), P.P.628-638. Disponible sur le site : <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13152>
- **Elkhatib, W. F. (2023).** Évaluation de la résistance aux antibiotiques des entérocoques isolés dans les eaux usées municipales. Microbiologie. Batna. Université de Batna. Disponible sur le site : <http://dspace.univ-batna.dz/handle/123456789/1885>
- **El-Moughith, A. A. (2014).** The occurrence of vancomycin-resistant enterococci in river water and their antimicrobial resistance profiles. Journal of Pure and Applied Microbiology, 8(Spec. Edn. 2), 1089-1097.
- **El-Omari, M. (2021).** Phénotypes et génotypes de résistance des entérocoques isolés des eaux usées municipales à Casablanca, Microbiologie . Maroc. Université Hassan II de Casablanca. <http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/fmp/PFE.php?id=7814>
- **Emane, E. Ket al (2021).** Occurrence and antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from water sources in the Western Highlands of Cameroon. BMC Microbiology, 21(1), Article 124. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02142-8>
- **Emane, K. E., Mbofung, C. M. F. (2023).** Caractérisation phénotypique des entérocoques résistants aux antibiotiques isolés des sources d'eau dans les hauts plateaux de l'Ouest du Cameroun.
- **El-Naggar, N. et al . (2021).** Molecular identification of Enterococcus spp. from water environment in Egypt and its prevalence of antibiotic resistance genes. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 25(4), P.P.435-450. Disponible sur le site : https://ejabf.journals.ekb.eg/article_217827.html
- **El-Sokkary, M. M. A. (2019).** Molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from the hospital environment in Minia, Egypt. Brazilian Journal of Microbiology, 50(4), P.P.983-992. disponible sur le site : <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00158-4>
- **Endtz, H. P., Ruijs, G. J., et al. (1991).** Quinolone resistance in Campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 27(2), P.P.199-208.
- **Fardos, N., et al. (2018).** Review on the occurrence and antimicrobial resistance of Enterococcus spp. in river and beach waters. Journal of Bacteriology & Parasitology, 9(1), Article 355.(consulte le 04/07/2024) .disponible sur le site :

Références bibliographiques

- <https://www.omicsonline.org/open-access/review-on-the-occurrence-and-antimicrobial-resistance-of-enterococcus-spp-in-river-and-beach-waters-2155-9597-1000355.pdf>
- **Fisher, K., & Phillips, C. (2009).** The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757. Consulté le (04/07/2024).disponible sur le site : <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.026385-0>
 - **Flannagan, S. et al. (2003).** Plasmid-encoded tet(L) tetracycline resistance in enterococcus faecalis: acquisition of macrophage-inducible erythromycin resistance in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococcus faecalis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 2040-2042. Disponible sur le site : <https://aac.asm.org/content/47/6/2040.short>
 - **Foulquié Moreno, M. et al .(2006).** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), P.P.1-24. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160505004205>
 - **Gagetti, P., et al. (2012).** Enterococcus spp. co-resistant to erythromycin but susceptible to clindamycin: Application of new broth microdilution assay to study the prevalence of inducible resistance in Argentina. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), P.P.275-279. Disponible sur le site Web : <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2011.0088>
 - **Geldart, K. G., Komarova, I., Adams, R., Simjee, S. (2012).** Investigation of macrolide and lincosamide resistance genes in Enterococcus spp. from food animals using multiplex PCR assays. *FEMS Microbiology Letters*, 337(1), P.P.56-65. Disponible sur le site : <https://academic.oup.com/femsle/article/337/1/56/642676>
 - **Giraffa, G., Carminati, D. (1997).** Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60(6), P.P.732-738.
 - **Glaser, P., Martins-Simões, P., Villain, A. (2021).** Comparative genomics of Enterococcus spp. isolated from wastewater treatment plant and river water. *Microbial Genomics*, 7(5), Article 000598. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000598>
 - **Gousia, P., Economou, V., & Boziaris, I. S. (2014).** Assessment of the virulence potential of Listeria monocytogenes isolated from fish and processing plant environments using in vitro methods and Galleria mellonella larvae. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(8), P.P.626-632. Disponible sur le site : <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2014.1744>
 - **Guzmán Prieto, A.et al. (2016).** Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 788. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00788>
 - **Hanafy, M. et al. (2019).** Antibiotic resistance profile of Enterococcus species isolated from different clinical specimens in Minia, Egypt. *African Journal of Microbiology Research*, 13(24), P.P.480-487.disponible sur le site : <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/A209AD862151>
 - **Homan, W.et al .(2002).** Multilocus sequence typing scheme for Enterococcus faecium. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1963-1971. Disponible sur le site : <https://jcm.asm.org/content/40/6/1963.short>
 - **Howden, B. et al . (2013).** Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci. *mBio*, 4(4), e00412-13. Disponible sur le site : <https://mbio.asm.org/content/4/4/e00412-13>
 - **Huebner, J., Goldmann, D. A., Coagulase-Negative Staphylococci. (1999).** Coagulase-negative staphylococci: Role as pathogens. *Annual Review of Medicine*, 50(1), P.P.223-236. (consulté le 04/07/2024) .disponible sur le site web : <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.50.1.223>

Références bibliographiques

- **Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P. (2007).** Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), P.P.29-34. (Consulte le 04/07/2024). Disponible sur le site : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160507001471>
- **Jahan, M .et al .(2020).** Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from ready-to-eat street vended foods in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Food Quality*, 2020, Article 8429745. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.1155/2020/8429745>
- **Jung, Y. et al. (2017).** Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species: A hospital-based study in Korea. *Korean Journal of Internal Medicine*, 32(2), P.P.338-344. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.290>
- **Klibi, N., et al. (2018).** Emergence of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a Tunisian hospital: Description of clonal spread of resistant isolates. *Microbial Drug Resistance*, 24(5), P.P.606-612. Disponible sur le site : <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2017.0191>
- **Kontos, F., Nathanail, C., Papadopoulou, C., Petropoulos, M., & Makris, K. C. (2021).** Occurrence and antibiotic resistance of Enterococcus spp. in wastewater and riverine sediments. *Science of The Total Environment*, 754, Article 141889. Disponible sur le site <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141889>
- **Kühn, I., Iversen. et al. (2003).** Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment—A European study. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), P.P.133-145. Disponible sur le site <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160503000561>
- **Kumar, V., Goyal, R., Kumar, V., Kumar, S. (2020).** Antimicrobial resistance and virulence traits of enterococci isolates from the hospital effluents in north India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, P.P.167-172. Disponible sur le site <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.001>
- **Langaee, T. Y., Gagnon, S. J. (2010).** Genetic and environmental factors associated with tetracycline resistance in an effluent receiving river. *Science of The Total Environment*, 408(22), 5399-5407. disponible sur le site : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.010>
- **Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J. D. A. (2004).** A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity. *Journal of Bacteriology*, 186(3), P.P.672-682. Disponible sur le site : <https://jb.asm.org/content/186/3/672>
- **Liu, Y., Zhao, F., Han, L., Yang, J., Zhang, J. (2020).** Prevalence of antibiotic resistance and virulence determinants in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from retail pork in China. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 280. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00280>
- **Lozano, C., et al . (2012).** Genetic environment and location of the lnu(A) and lnu(B) genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other staphylococci of animal and human origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(12), 2804-2808. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.1093/jac/dks320>
- **López, M., et al . (2016).** Characterization of clinical vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates sensitive to co-trimoxazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(1),P.P. 109-112. disponible sur le site : <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.004>
- **Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., Olanczuk-Neyman, K. (2010).** Antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from wastewater and river water in northern Poland: Impact of treated wastewater discharge. *Chemosphere*, 78(7), P.P.882-887. Disponible sur le site : <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.011>

Références bibliographiques

- **Mac Govan et Wise, 2001.** "Establishing MIC breakpoint and the interpretation of in vitro susceptibility tests." J. Antimicrob. Chemother, 48(1), P.P.17-28.
- **Maldonado et al., 2007.** "Antibacterial activity produced by Enterococcus spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese." Consulte le 04/07/202) disponible sur le site web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814002643>
- **Manero et al., 1999.** "Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key."
- **Marcinek et al., 1998.** "Enterococcus faecalis Gene Transfer under Natural Conditions in Municipal Sewage Water Treatment Plants." Disponible sur le site <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.64.2.626-632.1998>
- **Marie-France Duckett, 2000.** "Etude d'une souche bactérienne anaérobie capable de transformer le phénol et l'acide 4-hydroxybenzoïque en acide benzoïque." Disponible sur le site web : <https://espace.inrs.ca/id/eprint/4926/1/Duckett%20%28Version%20Assembl%C3%A9e%29.pdf>
- **Marlène Amara et al., 2023.** "CASFM2023_V1.0.pdf." (consulte le 04/07/2024). Disponible sur le site web : https://www.sfmmicrobiologie.org/wpcontent/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf
- **Martinez-Murcia et Collins, 1991.** "Enterococcus Sulfureus, a New Yellow-Pigmented Enterococcus Species." FEMS Microbiology Letters 80(1), P.P.69-74. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04638.x>
- **Maryse Archambaud et Danielle Clave, 2007.** "Enterococcus faecalis (Edition 2007)." (consulte le 04/07/2024) Disponible sur le site <https://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques%20BAC/Enterococcus%20faecalis%20%28Edition%202007%29.pdf>
- **Merah Abdelkader, 2019.** "Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique de l'eau des puits de la région EL Hassiane. (En ligne).(Consulté le 28/03/2024). (W. Mostaganem)." Thèse microbiologie : Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- **Miller WR, Munita JM, Arias CA, 2014.** "Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci." Expert Review Anti Infect Ther 12(10), 1221–1236.
- **Matyar et al., 2004.** "Antibiotic resistant bacteria in consumable fishes from Digha coast, West Bengal, India. (Consultele le 04/07/2024) disponible sur le site Web : <https://www.researchgate.net/publication/225618979>
- **Monteiro, Silvia, et Ricardo Santos, 2020.** "Incidence of Enterococci Resistant to Clinically Relevant Antibiotics in Environmental Waters and in Reclaimed Waters Used for Irrigation." Journal of Water and Health 18(6),P.P. 911-924.disponible sur le site <https://doi.org/10.2166/wh.2020.020>
- **MS Gilmore, DB Clewell, Y Ike, N Shankar, 2014.** "Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Disponible sur le site " <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24649510/>
- **Mukhopadhyay et al., 2015.** "Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode au chlorhydrate de vanilline." Disponible sur le site : <https://123dok.net>
- **Muller Allison, 2017.** "Bon usage des antibiotiques : Résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé. (En ligne).(Consulté le 05/05/2024)" Thèse SNV : L'université de Bourgogne Franche-Comté.
- **Mundy et al., 2000.** "Association Between Resistance to Vancomycin and Death in Cases of Enterococcus faecium Bacteremia."
- **Naber, K. G., autres. (2000).** Antimicrobial resistance among urinary tract infection (UTI) isolates in Europe: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997.

Références bibliographiques

- **O Si Abderrahmane. (2016).** Contribution à l'évaluation du système management qualité et des paramètres physicochimiques, bactériologiques et organoleptiques des eaux des stations. Microbiologie . Tizi Ouzou . Université de Mouloud Mameri. disponible sur le site <https://ummtto.dz>
- **O'Driscoll, T., Crank, C. (2015).** Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. (consulte le 04/07/2024) disponible sur le site <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/IDR.S54125>
- **Olfa Ben Braiek, & Slim Smaoui. (2019).** Enterococci: Between emerging pathogens and potential probiotics. BioMed Research International, 2019, Article ID 13.
- **Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 59(2), P.P.171-Disponible sur le site <https://doi.org/10.1128/m.59.2.171-200.1995>
- **Kumar, R. et al . (2011).** Purification and characterization of Enterocin MC13 produced by a potential aquaculture probiont Enterococcus faecium MC13 isolated from the gut of Mugil cephalus. Canadian Journal of Microbiology, 57(12),P.P. 993-1001. <https://doi.org/10.1139/w11-092>
- **Leclercq, R. (1995).** Faut-il identifier les entérocoques, et comment. La Lettre de l'Infectiologue, 16(7), P.P.217-222.
- **Papp-Wallace, K. M., Wallace, T. L., et al. (2011).** Molecular investigations of PenA-mediated β -lactam resistance in Burkholderia pseudomallei. Frontiers in Microbiology, 2, Article 139.(consulte le 04/07/2024). Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00139>
- **Pinheiro, E., Gomes, B., Drucker, D., Zaia, A., Ferraz, C., Souza-Filho, F. (2004).** Antimicrobial susceptibility of Enterococcus faecalis isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. International Endodontic Journal, 37(11), P.P.756-763.
- **Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., et al. (2000).** Macrolide resistance genes in Enterococcus spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(4), P.P.967-971. (consulte le 24/07/2024).disponible sur le site web: <https://doi.org/10.1128/aac.44.4.967-971.2000>
- **Raspaud, E. (2018).** La mécanique des biofilms à la surface de liquides. Reflets de la Physique, 77, P.P.114-115.
- **Rehman, M. A., Yin, X., et al. (2018).** Genotypes and phenotypes of Enterococci isolated from broiler chickens.
- **Reissier, S., et al. (2016).** Daptomycine et infections sévères à entérocoques.
- **Rivas, L., Fegan, N., et al. (2012).** Antibacterial potential of Enterococcus faecium strains isolated from ewes' milk and cheese. Journal of Applied Microbiology, 113(1),P.P. 6-12. (consulte le 04/07/2024).disponible sur le site : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05263.x>
- **Ruhal, R., Kataria, R. (2021).** Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria.
- **Shepard, B. D., Gilmore, M. S. (2002).** Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature, 415, P.P.84-84.
- **Singleton, P. (2005).** Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including Enterococcus faecium strains of CC17 and the new singleton ST425.
- **Slanetz, L. W., Bartley, C. H. (1957).** Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium.
- **Société Française de Microbiologie. (2019).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2019 V.2.0 Mai.

Références bibliographiques

- **Souhila, N. (2021).** Caractérisation moléculaire de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries isolées à partir des eaux usées traitées rejetées à la mer. Microbiologie .Blida . Université de Blida 1 (consulte le 04/07/2024) disponible sur le site : <https://di.univ-blida.dz/xmlui/browse?type=subject&value=bact%C3%A9ries+r%C3%A9sistantes+aux+antibiotiques>
- **Semedo, A. (2003).** Le paysage muséal professionnel : poétique et politique portugaise-Volume 1. (consulte le 04 / 07/2024) Récupéré de <https://search.proquest.com>
- **Strateva, T., et al. (2016).** Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria.
- **Subiros, M., et al. (2016).** Bilan 2001-2017 des signalements externes d'infections nosocomiales. Part des signalements impliquant une bactérie multirésistante, hautement résistante-émergente ou un *Clostridium difficile* Svec, P., & Devriese, L. A. (2009). The family Enterococcaceae. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acids and Molecular Biology* (p.p. 184-206). Springer.(consulte le 04/07/2024) disponible sur : <https://doi.org/10.1002/9781118655252#page=184>
- **Tannock et Cook, 2002 .**The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic resistance (consulte le 04/07/2024) disponible sur le site : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1128/9781555817923>
- **Tannock, G. W., Cook, G. (2002).** The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. *Wiley*.
- **Tatiana Dimitriu. (2014).** The coevolution of gene mobility and sociality in bacteria. (consulte le 04/07/2024) disponible sur <https://theses.hal.science/tel-00993436/>
- **Thiziri, Ouazzi. (2018).** Caractérisation phénotypique des souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires. Microbiologie . Tizi Ouzou . Université de Mouloud Mammeri. Consulte 04/07/2024) disponible sur <https://dspace.ummo.dz/items/5fce7690-cc33-40c4-921a-85dfc7427553>
- **Touahir, N. (2017).** Evaluation et caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez des bactéries à Gram négatif isolées à partir de milieux et d'animaux aquatiques. Thèse de Magister .Dely Ibrahim. Ecole nationale supérieure des sciences de la mer. (consulte le 04/07/2024) disponible sur : <https://virtuallibrary.enssmal.edu.dz/collection/item/9939-evaluation-et-caracterisation-de-la-resistance-aux-antibiotiques-chez-des-bacteries-a-gram-negatif-isolees-a-partir-de-milieux-et-d-animaux-aquatiques?offset=3>
- **Tran, T. T., et al. (2013).** Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids.
- **Tremblay, Z. (2012).** Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques.
- **Trovatelli, L. D., Schiesser, A., Massa, S. (1987).** Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow.
- **Upadhayaya, G., et al. (2009).** Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen.(Consulte le 04/07/2024) Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255085721015656>
- **Valenzuela, A. et al . (2008).** Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem. Toxicol.*, 46,P.P 2648-2652.
- **Veerachamy, S., Yarlagadda, T., et al. (2014).** Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review.
- **Veysiére. (2020).** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Consulte le 04/07/2024 disponible sur <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02432394>

Références bibliographiques

- **Werner, J. et al. (2012).** Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. *The ISME journal*, 6, P.P.94-103.
- **Werth, B. (2020).** Occurrence of cross-resistance and β -lactam seesaw effect in glycopeptide-, lipopeptide- and lipoglycopeptide-resistant MRSA correlates with membrane phosphatidylglycerol levels.
- **Willems, R. J., Bonten, M. (2008); Teixeira, L. M., et al. (2011).** Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin with periapical lesions. *International endodontic journal*, 37(11), P.P.756-763.
- **Wozniak-Biel, A., et al. (2019).** Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Humans and Turkeys in Poland.
- **Yala, J. F., et al. (2001).** Résistance bactérienne aux antibiotiques.(Consulte le 04/07/2024) Disponible sur <https://www.santetropicale.com/Resume/9102.pdf>
- **Yvon, M.-B. (2009).** Une histoire de la résistance aux antibiotiques A propos de six bactéries. Édition l'Harmattan, p.350 .



Annexe I :**Tableau I :** Normes de salubrité des plages, les normes algériennes (**Décret exécutif N° 93-164 du 10 juillet 1993**)

Germes	Valeurs limites (Normes de journal officiel)
Coliformes totaux /100ml	500-10000
Coliformes fécaux /100ml	100-2000

Tableau II : Résultats des coliformes totaux dans les sédiments :

Station	Ain Taya	Bateau Cassé	La Sirène	Colonel Abbes	Kheloufi	Sidi Fredj
Le nombre des coliformes	16	35	15	240	290	21

Tableau III: Les résultats de recherches des entérocoques dans l'eau de mer et sédiment dans les 06plages :

La Station	Entérocoques dans l'eau de mer	Entérocoques dans les sédiments
Ain Taya	38	9
Bateau Cassé	102	43
La Sirène	214	23
Kheloufi	1636	44
Colonel Abbes	2211	240
Sidi Fredj	140	9

Tableau IV : La prévalence des entérocoques

Station	Cipro	genta	zithro	VA	Tetra	Sans AT B	CIP	GEN T	ZITH R	VA	TETRA
Ain Taya (Flots bleus)	0	33	19	0	36	38	0	87	50	0	95
Bateau cassé	60	44	63	4	78	102	58,82	43,14	61,76	3,92	76,47
La Sirène	150	10	118	2	133	214	70,09	4,67	55,14	0,93	62,15
Kheloufi	1570	347	1403	30	1620	1636	95,97	21,21	85,76	1,83	99,02
Colonel Abbas	1000	1155	1539	1360	1577	2211	45,23	52,24	69,61	61,51	71,33
Sidi Fredj	0	103	113	20	103	140	0	74	81	14	74

Tableau V : Les concentrations de coliformes dans les six stations

Station	Valeurs (UFC/100ml)	Etat
Ain Taya	30	Satisfaisante
Bateau cassé	0	Satisfaisante
La Sirène	50	Satisfaisante
Kheloufi	1120	Satisfaisante
Colonel Abbas	100	Satisfaisante
Sidi Fredj	40	Satisfaisante

Tableau VI : Récapitulatif des tests effectués pour les 43 souches isolées :

	coloration de gram	catalase	oxydase	test de salinité	test de chaleur	test de tellurite de potassium	Lac	sacch	GLU	sor	type Fermentaire	Gélatinase	Bactériocine
Agen 0	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	homo	-	-
Agen-1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Atet-1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Azith 0	+	-	-	+/- trouble	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Bcip 0	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	homo	+	-
Bcip-1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Btet 0	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Btet-2	+	-	-	+/- trouble	+	+	+	+	+	-	homo	+	-
Bzith-1	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	homo	-	-
Bsédi-1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	homo	+	-
B-1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	-	-
Scipro-2	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	homo	+	-
Stet 0	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Szith 0	+	-	-	+/- trouble	+	+	+	+	+	+	homo	-	-
Szith-1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	homo	+	+
Szith-3	+	-	-	+/- trouble	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Sva 0	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	homo	+	+
Ssédi-1	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	homo	+	-
S-1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
S-3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Khacip 0	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	homo	+	-
Khagen-1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	homo	+	-
Khagen-2	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Khaltet 0	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Khaltet-1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	homo	-	-
Khaltet- 3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	-	-
Khazith-1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	homo	+	-
Khalzith-2	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	homo	+	-
Khal 0	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	-	+
Colgen-1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	homo	+	-
Colgen-2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	homo	+	-
Coltet-1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Coltet-2	+	-	-	+/- trouble	+	+	+	+	+	+	homo	-	-
Colva -1	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	homo	+	-
Colva -2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	homo	-	-
Col -1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	homo	+	-
Col -2	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	homo	-	+
Colo-3	+	-	-	+/- trouble	-	-	+	+	+	-	homo	+	-
Sfgen-1	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	homo	+	-
SfFet-2	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	homo	+	-
Sfzith-2	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	homo	-	-
Sfsédi-1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	homo	-	-
SF-1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	homo	+	-

Tableau VII : Répartition des souches d'entérocoques selon les sites de prélèvement :

Les stations	Ain Taya	Bateau Cassé	La Sirène	Kheloufi	Colonel Abbes	Sidi Fredj
Le nombre des souches isolées	4	7	9	9	9	5
Le pourcentage des souches isolées	9,3	16,28	20,93	20,93	20,93	11,63

Tableau VIII: Diamètre des zones d'inhibitions des souches étudiées

CODE DE LA SOUCHE	NA	CN	D	AK	VA	C	SXT	AMC	P	CXN	CIP	AX	CD	CAZ
Agen 0	0	0	13	0	21	24	0	0	0	0	0	0	0	0
Agen-1	0	17	10	19	0	0	0	0	0	0	19	0	8	0
Atet-1	0	14	9	19	19	19	19	20	18	0	20	12	0	14
Azith 0	0	9	15	17	19	20	18	0	0	0	15	15	0	15
Bcip 0	0	16	14	15	30	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Bcip-1	0	14	20	12	15	15	0	18	0	0	0	20	0	20
Btet 0	0	15	19	20	22	0	25	25	25	0	21	20	0	0
Btet-2	0	9	19	9	20	19	0	0	14	0	29	14	13	0
Bzith-1	0	7	7	0	17	12	15	0	20	0	19	20	0	/
Bsédi-1	0	15	19	15	22	19	0	19	20		20	20	0	0
B-1	0	12	15	10	15	0	0	14	15		20	0	0	0
Scipro-2	0	13	20	12	19	0	0	20	20		17	20	15	15
Stet 0	0	7	8	9	24	23	0	0	0	0	13	0	0	0
Sva 0	0	7	15	12	18	0	15	15	0	0	12	20	10	0
Szith 0	0	15	14	19	25	15	19	9	19		22	20	9	0
Szith-1	0	23	10	22	25	11	29	0	24	0	25	26	0	16
Szith-3	0	20	0	0	0	20	0	0	18	0	10	0	0	0
Ssédi-1	0	9	15	0	20	0	0	0	0	0	0	15	0	/
S-1	0	0	0	0	20	24	0	0	0	0	20	19	0	0
S-3	0	20	0	0	0	20	0	0	0		10	0	0	/
Khacip 0	0	13	15	8	19	18	0	0	0		0	0	0	0
Khagen-1	0	10	20	10	20	19	19	18	14		20	16	0	0
Khagen-2	0	12	23	26	18	24	22	8	19	0	25	22	7	0
Khaltet 0	0	10	10	10	22	20	15	20	0		19	15	0	19
Khatet-1	0	15	0	15	23	0	0	0	26	0	27	28	0	0
Khaltet-3	0	10	10	15	16	15	0	0	0		24	0	0	0
Khazith-1	0	8	6	13	22	0	20	14	20	0	20	19	0	0
Khalzith-2	0	13	7	19	23	18	19	0	0	0	0	0	0	0
Khal 0	0	25	19	24	25	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Colgen-1	0	15	0	25	20	23	20	0	0	0	0	0	0	0
Colgen-2	0	0	0	16	18	0	20	0	20	0	19	20	0	0
Colgen-3	0	9	8	10	20	20	19	8	19		15	0	0	/
Coltet-2	0	9	9	10	20	20	20	9	15		15	19	0	0
Colva -1	0	15	0	0	0	15	0	0	0		25	15	0	/
Colva -2	0	9	9	10	20	18	20	9	15		15	19	0	0
Col -1	0	15	0	17	17	19	19	9	23		20	20	0	/
Col -2	0	0	0	12	20	14	12	8			15	0	12	/
Col-3	0	9	9	12	20	19	0	9	13		19	15	0	0
SFgen-1	0	9	0	19	20	15	15	9	16		18	18	17	/
SFtet-2	0	14	6	12	19	7	21	0	19		18	23	0	0
SFzith-2	0	14	20	15	20	8	19	0	20		19	19	9	0
SFsédi-1	0	9	20	15	24	20	24	21	24	0	24	25	0	0
SF-1	0	19	20	19	20	20	20	0	15		20	15	0	0

Tableau IX : Valeurs des diamètres des zones d'inhibitions. (CLSI-2027/2020 et CASFM : 2019/2020/2021/2022/2023).

Antibiotiques	Diamètre critique (mm)		
	S	I	R
Triméthopri- Sulfaméthoxazole	≥23	-	<23
Gentamicine	≥8	-	<8
Ciprofloxacine	≥12	-	<12
Pénicilline	≥10	8-9	>8
Amoxicilline	≥10	8-9	>8
Vancomycine	≥12	-	<12
Amoxicilline+Acide Clavulanique	≥10	8-9	<8
Céftazidime	≥10	8-9	>8
Doxycycline	≥22	21-22	<20
Chloramphénicol	≥18	-	<18
Amikacine	≥8	-	<8
Acide Nalidixique	≥12	-	<12
Céfalexine	≥10	8-9	>8
Clindamycine	Présence de diamètre	-	Absence de diamètre

Tableau X: Lecture des résultats du système d'identification « api® 20 Strep » selon Bio Mérieux 2010.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétolaine (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
				4 h	24 h	4 h	24 h
ESC	esculine citrates de fer	1,16 0,152	hydrolyse β-glucosidase (ESCuline)	Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique-β-naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
αGAL	6-bromo-2-naphtyl-α-D-galactopyranoside	0,0376	α-GALactosidase	Incolore		Violet	
βGUR	acide naphтол-ASBI-glucuronique	0,0537	β-GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
βGAL	2-naphtyl-β-D-galactopyranoside	0,0306	β-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-β-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DIHydrolase	Jaune		Rouge	
				4 h	24 h	4 h	24 h
<u>RIB</u>	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	acidification (ARAbinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>INU</u>	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>GLYG</u>	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

Annexe II

Matériel des analyses bactériologiques :

1. Milieu de culture :

Milieu Slanetz et Bartley

-Solution NaCl

Milieu BEA

- Eau distillé stérile

Bouillon Rothe

- Réactif de Kovacs.

Milieu Tergitol

. **Appareillage et verrerie :**

Milieu Schubert

- Pipettes graduées de 1 ml.

Bouillon Eva Litsky

- Pipettes graduées de 10 ml.

Bouillon BHIB

- Tubes à essai stériles.

Milieu TSI

- Bec bunsen.

Milieu Mevag

- Boites de pétri.

Milieu MRS

- Etuve à 37°C et 44°C.

Milieu Muller-Hinton

- Bain marie.

Milieu Columbia

- Réfrigérateur.

. **Réactifs, additifs et solutions :**

- Flacons en verre de 250 ml stériles.

- Eau physiologique stérile.

- Portoirs.

- Solution PBS

- Anse de platine

-Réactifs de galerie API 20 Strep

-Huile de paraffine

-Alcool

-Solution de cristal violet

-Tellurite de potassium

-Eau oxygénée



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

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



La production d'extraits de bactériocines à partir des entérocoques marins

Présenté par :

- **Maamri Sadia**
- **Mahour Saadia**

Soutenu le 27/06/2024 devant le jury

Mme ALOUACHE S.

Incubateur ENSSMAL

M. MIHOUBI B.

NESDA

Mme MAHI Z.

ANVREDET

Mme CHAOU N. Maitre Assistante A : Promotrice

Promotion 2023/2024

Sommaire

I.	PRESENTATION DU PROJET : BIO ENTERO CONSERVE :	1
1.	L'idée du projet :.....	1
2.	Valeurs ajoutées	1
3.	Equipe de travail :.....	2
4.	L'objectif du projet :.....	3
II.	ASPECTS INNOVANTS	5
1.	Nature des Innovations Adoptées par BioEnteroConserve :.....	5
2.	Domaines d'Innovation de BioEnteroConserve :.....	5
III.	ANALYSE STRATEGIQUE DU MARCHÉ	6
1.	Le segment du marché :.....	6
2.	Mesure de l'intensité de la concurrence :.....	7
3.	La stratégie marketing :.....	8
4.	Analyse SWOT :.....	9
IV.	PLAN DE PRODUCTION ET D'ORGANISATION	9
1.	Le processus de production :.....	9
2.	L'approvisionnement :.....	10
3.	Main-d'œuvre :.....	12
4.	Les principaux partenaires:	Error! Bookmark not defined.
V.	LE PLAN FINANCIER	13
1.	Les coûts et charges.....	13
2.	Les revenus et les dépenses calculés mesuellement :.....	Error! Bookmark not defined.
VI.	LE PROTOTYPE EXPERIMENTAL	15

I. Présentation du Projet : Bio Entéro Conserve

1. L'idée du projet

« **Bio Entéro Conserve** » Révolutionne la conservation alimentaire avec des solutions naturelles.

Notre entreprise est une SARL (Société à Responsabilité Limitée) avec le code du registre de commerce **611017**. Ce code atteste de son activité : la vente au détail de conservateurs pour produits agroalimentaires. (CNRC)

Elle est spécialisée dans la production d'extraits de bactériocines à partir d'entérocoques isolés de l'eau de mer. Ces extraits naturels sont destinés aux industries fabriquant des conservateurs, afin de développer des solutions de conservation bio pour divers produits agroalimentaires. En répondant à la demande croissante pour des conservateurs naturels et sans produits chimiques, **Bio Entéro Conserve**, vise à garantir la sécurité et la qualité des aliments tout en contribuant à la santé des consommateurs et à la protection de l'environnement. **Bio Entéro Conserve**, c'est bien plus qu'une simple SARL. C'est une vision ambitieuse pour un avenir où la conservation alimentaire rime avec naturalité, performance et durabilité.



Figure 1 : Logo de Bio Entéro Conserve

2. Valeurs ajoutées

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques offrent plusieurs valeurs ajoutées pour la production de conservateurs naturels bio destinés à préserver les produits agro-alimentaires.

- ✓ **Prolongation de la durée de vie des aliments** : En ajoutant nos extraits de bactériocines dans les aliments, nous contribuons à prolonger leur durée de vie, réduisant ainsi le gaspillage alimentaire et offrant une plus grande disponibilité des produits frais aux consommateurs.

- ✓ **Innovation** : En exploitant les dernières avancées en microbiologie et en biotechnologie, **Bio Entéro Conserve** développe des produits novateurs qui répondent aux besoins évolutifs du marché de la conservation alimentaire.
- ✓ **Naturalité** : Contrairement à de nombreux conservateurs traditionnels qui contiennent des produits chimiques potentiellement nocifs, les extraits de bactériocines de **Bio Entéro Conserve** sont naturels et respectueux de l'environnement, répondant ainsi à la demande croissante des consommateurs pour des produits biologiques et sans additifs artificiels.
- ✓ **Efficacité** : Les extraits de bactériocines de **Bio Entéro Conserve** ont démontré leur efficacité dans l'inhibition de pathogène tout en préservant la qualité et la fraîcheur des aliments, offrant ainsi une solution de conservation sûre et fiable.
- ✓ **Durabilité** : En favorisant l'utilisation de conservateurs naturels et durables, **Bio Entéro Conserve** s'engage dans des pratiques respectueuses de l'environnement, contribuant ainsi à la préservation des ressources naturelles et à la réduction de l'empreinte environnementale de l'industrie alimentaire.

3. Equipe de travail

✓ **Mahour Saadia - Maamri Sadia - Responsables de Production**

- **Compétences** : Nous avons toutes les deux suivi une formation en Biotechnologie marine et possédons une connaissance approfondie du processus de production ainsi que de la gestion des opérations quotidiennes. De plus, nous avons effectué des stages en contrôle de qualité microbiologique des eaux et aliments.
- **Responsabilités** : Notre rôle est de diriger et de coordonner toutes les étapes du processus de production, de la préparation des matières premières à l'emballage final des produits.
- ✓ **Technicien de Production et technicien en maintenance (Contrat de travail déterminé)** :
 - **Compétences** : Expérience dans la manipulation de machines, capacité à apprendre rapidement les nouveaux processus, compétences en réparation et maintenance.
 - **Responsabilités** : Apprendre le fonctionnement des machines de production, effectuer les réglages nécessaires, assurer leur bon fonctionnement et effectuer les réparations si nécessaire pendant la période de démarrage de l'entreprise.

Modes de Communication et de Collaboration au sein notre équipe de Production :

- Communication ouverte et transparente à tous les niveaux de l'équipe.
- Collaboration étroite entre les responsables de production et le technicien de production.
- Organisation de réunions régulières pour discuter des progrès, des défis et des mesures correctives.
- Soutien et guidance des responsables envers le technicien de production tout au long de la période de démarrage de l'entreprise.

4. L'objectif du projet

Bio Entéro Conserve se lance dans une aventure passionnante avec pour objectif de révolutionner le secteur de la conservation alimentaire grâce à des extraits de bactériocines innovants d'origine marine. Notre mission est claire : proposer des solutions naturelles, performantes et durables qui répondent aux enjeux actuels de la sécurité alimentaire, de la santé des consommateurs et de la protection de l'environnement.

Notre feuille de route se décline en trois phases clés :

- **A court terme (1-2 ans)**

Lancement de nos premiers produits sur le marché local, pour faire connaître notre technologie et son potentiel auprès des acteurs de l'agroalimentaire.

Finalisation des phases de recherche et développement, afin d'optimiser nos procédés et de garantir la qualité irréprochable de nos produits.

Mise en place d'une production de haute qualité, pour répondre à la demande croissante et assurer une chaîne d'approvisionnement fiable.

Atteinte d'une part de marché de 5 à 10%, en établissant une présence solide sur le marché local et en gagnant la confiance de nos clients.

- **A moyen terme (3-5 ans)**

Établissement de partenariats avec des entreprises locales et régionales, pour élargir notre réseau de distribution et renforcer notre expertise.

Augmentation de notre capacité de production, pour répondre à l'expansion de notre marché et aux besoins croissants de nos clients.

Exploration des marchés du Maghreb, pour asseoir notre position de leader régional et proposer nos solutions innovantes à un public plus large.

Atteinte d'une part de marché de 15 à 20%, en consolidant notre présence sur les marchés existants et en conquérant de nouveaux territoires.

- **A long terme (5-10 ans)**

Devenir un leader reconnu dans le secteur des conservateurs bio, en nous imposant comme une référence en matière d'innovation et de qualité.

Innovation continue pour proposer des solutions toujours plus performantes, en investissant dans la recherche et le développement pour répondre aux besoins évolutifs de nos clients.

Exportation de nos produits à l'international, pour partager notre expertise et nos solutions innovantes avec le monde entier.

Atteinte d'une part de marché de 25 à 30%, en devenant un acteur incontournable sur la scène internationale de la conservation alimentaire.

Élargissement de notre spectre d'activité à la cosmétique et à la pharmacie, pour explorer de nouvelles applications prometteuses de nos technologies.

5. Calendrier de réalisation du projet

Cette figure illustre la répartition des tâches

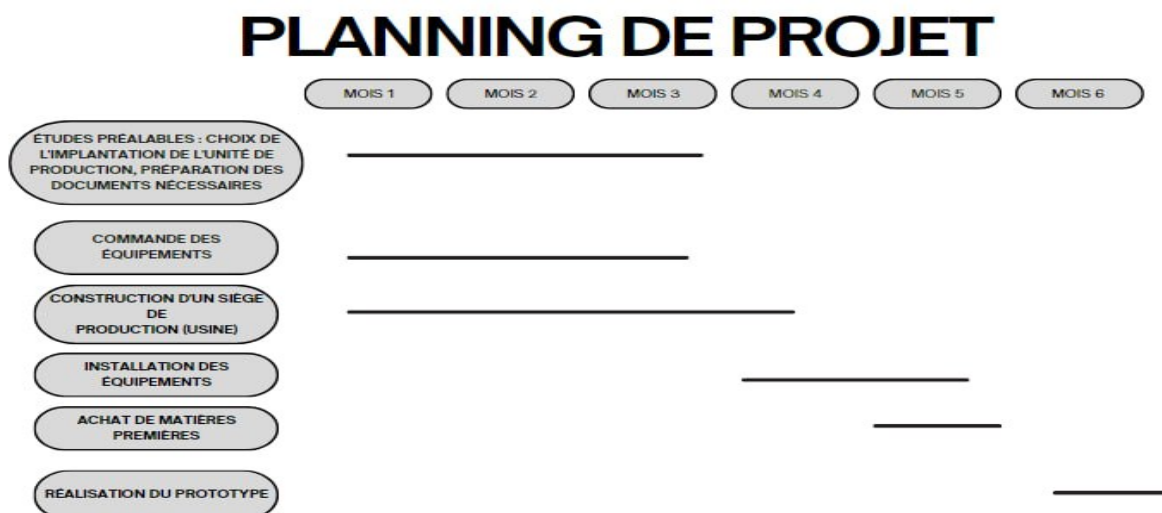


Figure 02 : Gestion des tâches en fonction de temps

I- Aspects Innovants

1. Nature des innovations adoptées par Bio Entéro Conserve

➤ Incertitude du Marché

Répondre à une demande croissante pour des conservateurs bio, dont le marché est encore émergent.

➤ Innovation du Marché

Introduction d'un nouveau produit naturel à base de bactériocines, différencié des conservateurs chimiques traditionnels.

➤ Innovation Technologique

Développement de techniques avancées pour l'extraction et la purification de bactériocines à partir d'entérocoques.

➤ Incertitude Technologique

Défis liés à la mise en œuvre de nouvelles technologies pour garantir l'efficacité et la stabilité des conservateurs bio.

2. Domaines d'innovation de Bio Entéro Conserve

Bio Entéro Conserve, premier projet de ce genre en Algérie, est une entreprise pionnière dans la production d'extraits de bactériocines à partir d'entérocoques isolés de l'eau de mer. Ces extraits naturels sont destinés à la préparation de conservateurs bio ainsi qu'à leur inclusion directe dans les produits alimentaires. Nous nous engageons à révolutionner l'industrie agroalimentaire en introduisant des solutions de conservation naturelles qui répondent aux exigences croissantes des consommateurs pour des produits sans conservateurs chimiques. Notre approche innovante couvre plusieurs domaines clés :

➤ Nouveaux Processus

Mise en place de techniques avancées pour l'extraction et la purification de bactériocines, augmentant l'efficacité des opérations et la rentabilité de l'entreprise.

➤ Nouvelles Fonctionnalités et offres

Introduction de produits innovants, comme des extraits de bactériocines personnalisés pour différentes applications agroalimentaires pour fabriquer des conservateurs naturels, offrant une alternative naturelle et efficace aux conservateurs chimiques.

➤ Nouveaux Clients

Extension de notre offre avec des extraits naturels à base de bactériocines, destinés à être incorporés dans les produits alimentaires comme les fromages et les laits acidifiés et aux usines de fabrication de conservateur.

➤ Nouveaux Modèles :

Adoption d'un modèle d'affaires axé sur la durabilité et l'innovation, créant de la valeur en répondant aux exigences croissantes des consommateurs pour des produits alimentaires sains et écologiques.

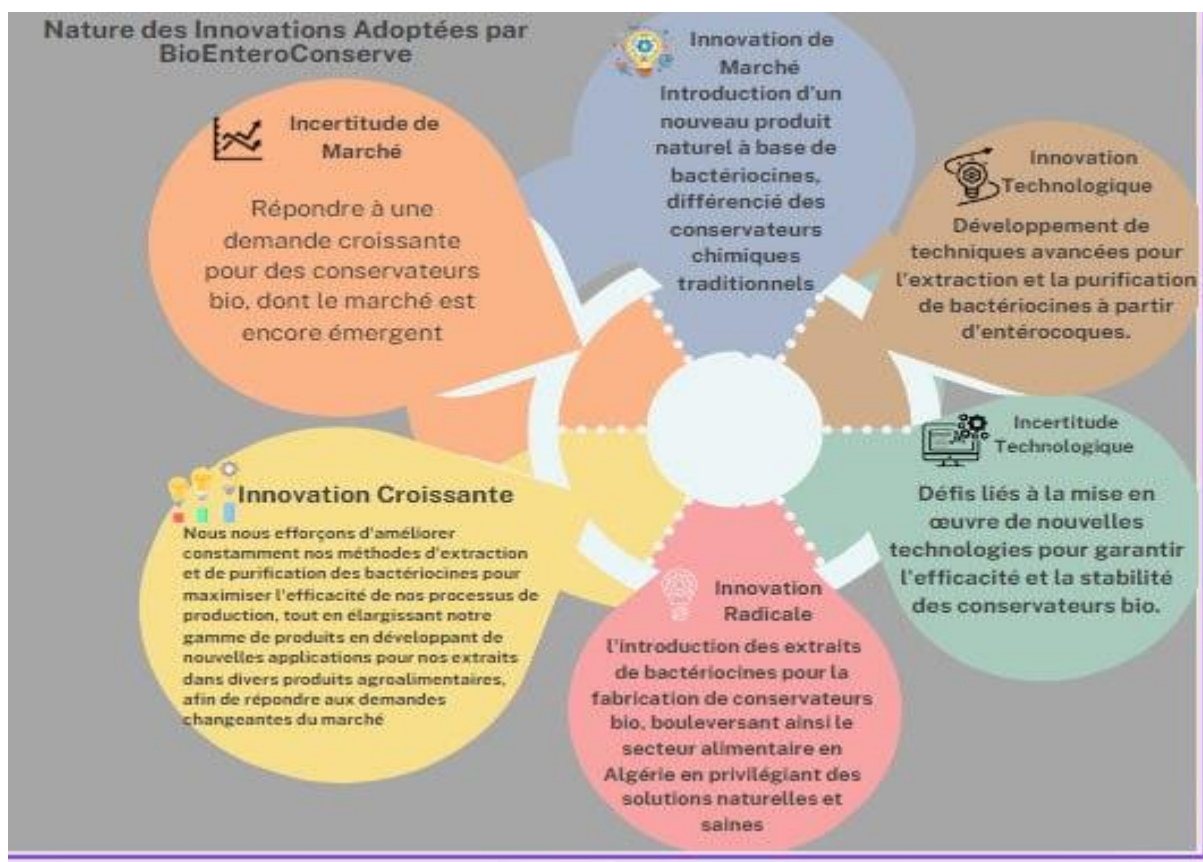


Figure 03 : Nature d'innovation adopte par l'entreprise

II- Analyse stratégique du marché

1. La segmentation du marché

Le marché potentiel pour les extraits de bactériocine de **Bio Entéro Conserve** en Algérie c'est toute entreprise cherchant à conserver ses produits d'une façon naturelle. Les divers acteurs du secteur agroalimentaire, tels que les fabricants d'aliments, les producteurs de conservateurs, les entreprises agroalimentaires, les supermarchés et les restaurants.

Parmi les clients potentiels en Algérie, on retrouve des entreprises renommées telles que Mekla Lait, Cevital, Soummam, Tifra lait, laiterie DBK, ainsi que des entreprises situées dans des régions économiquement dynamiques comme Tizi Ouzou, Alger, Boumerdes, Tipaza et Bejaïa. Ces entreprises sont motivées par le besoin de prolonger naturellement la durée de conservation de leurs produits alimentaires tout en répondant à la demande croissante des consommateurs pour des solutions de conservation naturelles et durables. Le marché cible de **Bio Entéro Conserve** se concentre principalement sur les entreprises productrices de conservateurs en Algérie, telles que NCA Rouïba, Fresh Food Company, en raison de leur intérêt potentiel pour les extraits de bactériocine de qualité supérieure pour leurs produits de conservation. Ce choix de marché cible est motivé par l'opportunité de répondre à un besoin clairement identifié dans le marché algérien, ainsi que par la proximité géographique avec ces entreprises, facilitant ainsi les relations commerciales et la logistique. Il existe une possibilité réelle de conclure des contrats d'achat avec certains clients importants dans ces régions, en mettant en avant la qualité, l'efficacité et la durabilité des produits de **Bio Entéro Conserve**, ainsi qu'en établissant des partenariats stratégiques pour répondre aux besoins spécifiques des clients.

2. Mesure de l'intensité de la concurrence

Les concurrents les plus importants sur le marché algérien c'est les entreprises qui produisent, des conservateurs bio ou bien chimique ou bien les fournisseurs des conservateurs, les conserveries artisanales... etc.

Ils sont classés selon leur part de marché comme suit :

- **Algérie Agro** : Ils pourraient offrir des conservateurs alimentaires tels que le nitrite de sodium, le sulfite de sodium, ou des mélanges d'antioxydants pour prolonger la durée de conservation des aliments.
- **Algérie Chimie Industrielle** : Ils pourraient fournir des conservateurs pour diverses applications industrielles telles que le formaldéhyde, le bromure de méthyle, ou bien des inhibiteurs de corrosion pour les produits chimiques et les produits métalliques.
- **Algérie Chimie** : Ils pourraient fournir des conservateurs chimiques tels que le benzoate de sodium, le sorbate de potassium, ou encore des mélanges de conservateurs pour diverses applications industrielles.

Parmi leurs atouts, citons leur ancienneté sur le marché algérien et la force de leur marque. Parmi leurs faiblesses, leur recours aux produits chimiques.

3. La stratégie marketing

Pour notre entreprise **Bio Entéro Conserve**, spécialisée dans la production d'extraits de bactériocines utilisés comme conservateurs naturels, notre stratégie marketing repose sur plusieurs piliers.

D'abord, nous nous engageons à maintenir des prix compétitifs en contrôlant rigoureusement nos coûts de production. En parallèle, nous exploitons des avancées technologiques pour optimiser nos processus opérationnels sans recourir à des investissements coûteux.





En ce qui concerne les canaux de consultation et d'offre de visite, nous mettons en place des rendez-vous personnalisés avec nos clients entreprises. Ces visites nous permettent de comprendre leurs besoins spécifiques et de leur présenter nos produits de manière détaillée. De plus, nous proposons des consultations individuelles pour discuter des avantages de nos produits et des solutions sur mesure que nous pouvons offrir pour répondre à leurs besoins.

De plus, nous avons créé un profil professionnel sur LinkedIn pour notre entreprise, où nous partageons des mises à jour sur nos produits, des articles pertinents du secteur et des annonces sur les événements à venir. Ce profil nous permet de rester en contact avec nos clients actuels et potentiels, ainsi qu'avec d'autres acteurs de l'industrie, renforçant ainsi notre présence en ligne et notre crédibilité dans le secteur.

Parallèlement, nous utilisons des appels d'offres pour proposer nos produits à de nouveaux clients potentiels. Nous nous engageons à répondre de manière proactive aux appels d'offres, en fournissant des informations complètes et en proposant des solutions adaptées aux exigences spécifiques de chaque projet.

Enfin, nous explorons activement les opportunités de collaboration avec d'autres entreprises du secteur agroalimentaire. Ces collaborations peuvent prendre différentes formes, telles que des partenariats de distribution, des projets de recherche conjoints ou des initiatives de marketing croisé. En travaillant ensemble, nous pouvons créer des synergies qui bénéficient à toutes les parties impliquées et renforcent notre position sur le marché.

4. Analyse SWOT :

 FORCES	 FAIBLESSES	 OPPORTUNITES	 MENACES
<ul style="list-style-type: none">• Technologie innovante : extraction et purification des bactériocines. (Produit naturel)• Potentiel de marché important : croissance des conservateurs naturels.• Engagement envers le développement durable : alternatives écologiques aux conservateurs chimiques.	<ul style="list-style-type: none">• Entreprise relativement jeune : notoriété et crédibilité limitées.• Besoins en capitaux importants : investissements nécessaires en R&D, production et marketing.• Réglementation complexe : mise sur le marché de nouveaux produits compliquée par des réglementations strictes	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation de la demande des consommateurs : produits alimentaires sains et respectueux de l'environnement.• Élargissement de la gamme de produits : nouvelles utilisations des extraits de bactériocines dans la cosmétique et la pharmacie.	<ul style="list-style-type: none">• Réduction des marges bénéficiaires.• Réglementations plus strictes : nécessité de modifier les produits pour se conformer.• Contamination par des souches pathogènes.

III- Plan de production et d'organisation

1. Le processus de production

Dans notre SARL, le processus de production suit une série d'étapes précises et rigoureuses pour garantir la qualité de nos produits. Tout commence par la culture des souches d'entérocoques dans un bioréacteur, une étape cruciale où les conditions optimales sont maintenues pour favoriser la croissance bactérienne. Ensuite, nous procédons à l'extraction des bactériocines, des peptides antimicrobiens produits par les entérocoques. Cette étape est suivie par la purification des extraits pour éliminer toutes les impuretés et obtenir un produit d'une grande pureté. Enfin, le produit purifié est conditionné dans des flacons soigneusement stérilisés et emballé avec soin pour garantir sa stabilité et son efficacité. Notre processus de production

est conçu pour assurer la plus haute qualité et sécurité de nos produits, répondant ainsi aux normes les plus strictes de l'industrie.

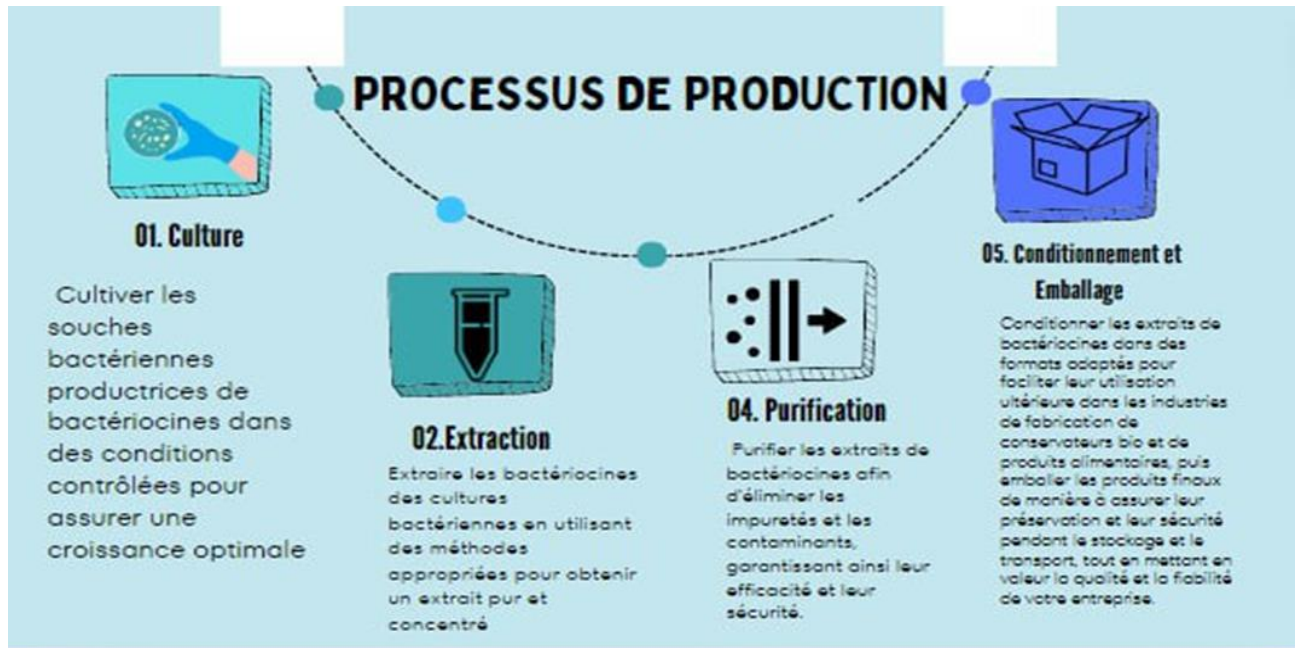


Figure 4 : le processus de production

2. L'approvisionnement

a) Déterminer la politique d'achat

Pour débiter la production dans notre SARL, il est essentiel de disposer d'un local adapté qui répondra aux exigences de notre activité.

Matières premières : Sélectionner des cultures bactériennes de haute qualité pour la production de bactériocines, en s'assurant qu'elles proviennent de sources fiables et conformes aux normes de qualité et de sécurité.

Matériaux et fournitures : Acquérir des milieux de culture, réactifs chimiques, et autres fournitures de laboratoire nécessaires à la culture, l'isolement, l'extraction et la purification des bactériocines.

b) Équipements

➤ Équipements de culture et isolement

- **Autoclaves :** Pour la stérilisation des milieux de culture et des instruments.
- **Microscopes optiques :** Pour l'observation et l'identification des cultures bactériennes.
- **Bioréacteur (PBR) :** Pour cultiver les bactéries.

➤ **Équipements d'Extraction**

- **Centrifugeuse** : à haute vitesse pour séparer les bactéries du milieu de culture.

➤ **Équipements de Purification**

- **Systèmes de Chromatographie** : Chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour la purification des bactériocines.
- Chromatographie d'échange ionique et de gelfiltration.
- **Filtres et systèmes de filtration** : Filtres stériles pour la clarification et la stérilisation des solutions.

➤ **Équipements de Conditionnement et Emballage**

- **Machines de remplissage** : Automatiques ou semi-automatiques pour remplir les contenants avec les extraits purifiés.
- **Équipements de scellage** : pour sécuriser les emballages des produits.
- **Étiqueteuse** : Pour apposer des étiquettes sur les produits finis.
- **Réfrigérateurs, Congélateurs et chambre froide** : Pour la conservation des cultures et des extraits.

➤ **Informatique et logiciels**

- **Systèmes de gestion de laboratoire (LIMS)** : Pour suivre les échantillons, les résultats des tests et la gestion des stocks.
- **Ordinateurs et logiciels de traitement de données** : Pour analyser les données de purification et de production.

➤ **Sécurité et Ergonomie**

- **Équipements de protection individuelle (EPI)** : Gants, blouses de laboratoire, lunettes de protection, etc.

c) Les fournisseurs principaux

Notre entreprise bénéficie de partenariats stratégiques avec plusieurs fournisseurs de premier plan. Pour les milieux de culture, nous collaborons avec l'Institut Pasteur d'Algérie, reconnu pour son expertise et la qualité de ses produits. En ce qui concerne les équipements de laboratoire, nous faisons confiance à Labomaster Stidia, Algérie, qui fournit des instruments de haute précision. Pour les machines industrielles, Ginindex, situé à Hussein Dey, Alger, nous fournira des bioréacteurs performants. IMS (International Mechanical Supply), basé à Bejaia, est notre fournisseur principal pour les centrifugeuses de pointe. Enfin, pour nos besoins en produits d'emballage, nous nous appuyons sur Eurl NBC NEWPACK, situé à Boudouaou El Bahri, reconnu pour la qualité et la fiabilité de ses solutions d'emballage.

Ces partenariats nous permettent de garantir des standards élevés de qualité et d'efficacité dans notre production.

d) Politique de paiement pour notre entreprise :

- **Modalités de paiement acceptées :** Virement bancaire préférentiellement, chèque ou espèces.
- **Délais de paiement :** Payer les factures dans un délai de 30 jours à compter de la réception des produits, sauf accord contraire avec le fournisseur.
- **Remises pour paiements anticipés :** Rechercher des opportunités de remises pour les paiements anticipés, en négociant des conditions favorables avec les fournisseurs.
- **Suivi des paiements :** Tenir un registre précis des paiements effectués à chaque fournisseur pour assurer le respect des délais de paiement convenus.
- **Évaluation régulière :** Réviser la politique de paiement périodiquement pour s'assurer qu'elle reste alignée sur les besoins financiers de l'entreprise et les attentes des fournisseurs.

3. Main-d'œuvre

- **Nombre et nature de postes :** Notre entreprise renforce son équipe de main d'œuvre en intégrant deux nouveaux techniciens. Un technicien sera chargé du suivi de la production pour garantir une efficacité optimale, tandis que l'autre se concentrera sur la maintenance afin d'assurer la pérennité et la performance de nos équipements.
- **Emplacement de la main-d'œuvre :** La main-d'œuvre sera basée dans les installations de de l'entreprise, où les bioréacteurs et autres équipements seront situés.

Si le besoin se présente à l'avenir, il est peut être envisagé d'embaucher du personnel supplémentaire pour des tâches de manutention ou de contrôle, en fonction de la croissance et des besoins de l'entreprise.

IV- Le plan Financier

1. Les coûts et les charges

- **Tableau 01: Les charges des équipements (avec un amortissement pour les machines) :**

Equipements	1 439 790,79
Bioreacteur	100 848,75
Camionette frigo	2 160 000,00
chambre froide	38 422,22
Milieu de culture +consommables	768 444,40
Laboratoire	
ance de platine	1 800,00
BOITE Pétrie (cartons)	18 000,00
bec benzène	25 615,00
ETUVE	317 935,00
LA BLOUSE	1 500,00
AUTRE CHARGES	15 000,00
Thermomethre	16 000,00
pH-mètre	29 700,00
autoclave	129 900,00
microscope	12 646,00
centrefugeuse	351 258,00
filtration	20 402,64
chramatographie	56 291,00
Amortissement	1 105 710,76 DA

Fonds de roulement

Loyer	750 000,00
Notaire	15 000,00
Salaires	1 800 000,00
Énergie	221 312,00
Emballage	50 000,00
Marketing	100 000,00
Totale en DA	2 936 312,00

Tableau 02 : Les charges fixes et variable de projet

Coûts fixe	
Loyer	750 000,00
Salaires	2 280 000,00
Marketing	100 000,00
Amortissements	1 105 710,76
Coûts variable	
Énergie	221 312,00
Emballage	50 000,00
Total coûts variables	271 312,00

Tableau 3 : Le coût du projet, coûts total, quantité de vente coûts unitaire et le prix de vente unitaire

Le coût de projet en DA	8 919 865,80 DA
Coût total	4 507 022,76
Quantité vente	1720
Prix unitaire	2 620,36
Prix de vente DA	3000 ,00

2. Les ventes prévisionnelles, Chiffre d'affaire annuel et les dépenses annuelles,

Mois	janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	septembre	octobre	novembre	décembre	TOTAL
Qty (carton)	80	90	100	110	120	140	150	160	170	200	200	200	1720
CA	240000	270000	300000	330000	360000	420000	450000	480000	510000	600000	600000	600000	5160000
Coût	209629	235833	262036	288240	314443	366851	393054	419258	445462	524072	524072	524072	4507023
Résultat	30371	34167	37964	41760	45557	53149	56946	60742	64538	75928	75928	75928	652977

3. La Rentabilité

La rentabilité financière nette est égale à la capacité d'autofinancement. Pour être rentable, il faut avoir un chiffre d'affaires.

Seuil de rentabilité (en CA) /année	4470783,88
Seuil de rentabilité (Carton)/ année	1490,26

V- Le prototype expérimental

1. Culture des bactéries *Enterococcus* :

- **Préparation du milieu de culture** : Stérilisation et préparation du milieu de culture en fermenteurs industriels.

- **Inoculation et conditions de culture** : Inoculation avec *Enterococcus spp.* et maintien des conditions optimales (température, pH, aération).

2. Extraction de la bactériocine par centrifugation

- **Centrifugation** : Séparation des cellules bactériennes du milieu de culture à l'aide d'une centrifugeuse industrielle.

3. Purification de la bactériocine

- **Chromatographie** : Purification de la bactériocine avec des colonnes de chromatographie industrielles.

- **Ultrafiltration** : Concentration du produit et élimination des impuretés.

4. Contrôle de qualité

Tests de pureté et de stabilité : Réalisation de tests pour garantir la pureté et la stabilité du produit.

5. Mise en flacons

- **Stérilisation et remplissage** : Stérilisation des flacons, remplissage avec la bactériocine purifiée et scellage.

6. Emballage

Étiquetage et conditionnement : Étiquetage des flacons et mise en cartons.

7. Distribution

Stockage et logistique : Stockage dans un environnement contrôlé et planification de la distribution.

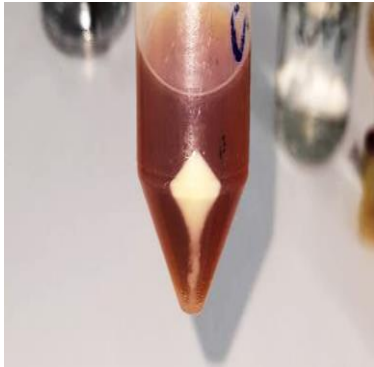


Figure 5 : L'inoculum après centrifugation

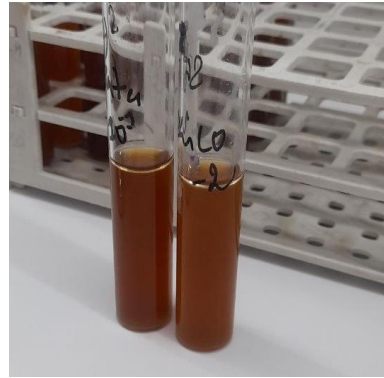


Figure 6 : Extrait de Bactériocine



Figure 7 : Le produit final



Figure 8 : Etiquette de l'extrait de bactériocine de Bio Entéro Conserve

Business Model Canvas :

<p>Partenaires Clés</p> <ul style="list-style-type: none"> • Institut Pasteur d'Algérie : Fournisseur de milieux de culture • Labomaster Stidia, Algérie : Fournisseur d'équipements de laboratoire • Ginidex (Fournisseurs de machines industrielles), Hussein Dey, Alger : Fournisseur du bioréacteur • IMS : International Mechanical Supply, Bejaia : Fournisseur de la centrifugeuse • Eurl NBC NEWPACK, Boudouaou El Bahri : Fournisseur de produits d'emballage 	<p>Activités Clés</p> <ul style="list-style-type: none"> • Production et Fabrication • Qualité et Conformité • Conditionnement et Emballage • Marketing et Ventes 	<p>Proposition de Valeur</p> <p>Extraits Naturels et Efficaces</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fournir des extraits de bactériocines naturels et puissants pour la conservation des produits agroalimentaires. <p>Prolongation de la Durée de Vie des Produits</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Améliorer la durée de conservation des aliments tout en maintenant leur qualité et sécurité. <p>Support Technique et Formation</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Offrir un support technique complet et des formations pour optimiser l'utilisation des bactériocines par les clients. <p>Engagement Environnemental</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Promouvoir des solutions durables et respectueuses de l'environnement en réduisant l'utilisation de conservateurs chimiques. 	<p>Relation Client</p> <ul style="list-style-type: none"> • Programmes de Fidélité : <p>Mettre en place des programmes de fidélité offrant des promotions et des réductions pour les achats récurrents. À partir de 50 cartons de 10 flacons, les clients bénéficient de promotions spéciales, et à partir de 80 cartons, des réductions allant jusqu'à 40-50%.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abonnement : les clients reçoivent une livraison mensuelle ou une livraison tous les trois mois, idéale pour les entreprises ayant une demande fluctuante.. • Service Après-Vente: <p>Offrir un service après-vente réactif pour assurer la satisfaction continue des clients et traiter rapidement toute réclamation ou demande.</p>	<p>Segments Clients</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les entreprises laitières: pour leur besoin important de solutions de conservation naturelles et durables pour leurs produits laitiers. <ul style="list-style-type: none"> ➤ Mekla Lait ➤ Cevital ➤ Soummam ➤ Tifra lait ➤ Laiterie DBK • Les entreprises productrices de conservateurs : <ul style="list-style-type: none"> ➤ NCA Rouïba ➤ Fresh Food Company
<p>Structure de Coûts</p> <p>Equipements : Bioréacteurs, centrifugeuses, filtration, chromatographie échangeuse d'ions (avec amortissements) /autoclave, milieu de culture , microscope ... 1 105 710,76 DA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Notaire : 15 000 DA /Local : 760 000DA /Salariés : 2280000 DA / Energie : 221 312 DA / Emballage : 50 000 DA / Marketing : 100 000 DA, <p>Coût total :4 507 022,76 DA</p>		<p>Sources de revenus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Revenus générés par la commercialisation directe des extraits de bactériocines.. • Abonnements : source de revenus stable et prévisible 		