

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**وزارة التعليم العالي و البحث العلمي**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل**

**École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer**

**et de l'Aménagement du Littoral**



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME  
D'INGENIEUR D'ETAT EN SCIENCES DE LA MER**

**Spécialité : Biotechnologie marine**

**Thème :**

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

Présenté par :

❖ **REKIK Maroua Nor El imane.**

Soutenu le 17/12/2020 devant le jury suivant :

Mme LAHMER N.	Maitre Assistante A	Présidente
Mr KADA M.	Maitre Assistant A	Examinateur
Mme DJAHNIT N.	Maitre Assistante B	Examinatrice
Mme CHAOU N.	Maitre Assistante A	Promotrice
Mme ALOUACHE.S.	Maître de Conférences A	Co-Promotrice

**Promotion : 2019/2020**

# *Remerciements*

## **Remerciements**

*On tient à adresser nos profondes gratitudee et nos vifs remerciements en premier lieu au **Bon Dieu**, le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*On tient à remercier tout particulièrement :*

*Madame **CHAOU Nadia**, Enseignante chercheur à l'Ecole National Supérieur des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL), d'avoir accepté de nous encadrer et Madame **ALOUACHE Souhila** Maitre de conférences A (ENSSMAL) qui à accepté de codiriger ce travail. On les remercie pour leurs précieux conseils, leurs diponibilités et leurs encouragements.*

*A madame **LAHMER N.** Maitre Assistante A à l'ENSSMAL, pour nous avoir fait honneur en acceptant de présider le jury.*

*A monsieur **KADA M.** Maitre Assistant A à l'ENSSMAL, et à Madame **DJAHNIT N.** Maitre de Conférences B à l'ENSSMAL, pour nous avoir honorés de leur présence en acceptant d'examiner ce modeste travail.*

*On exprime également nos remerciements à tout le personnel de laboratoire demicrobiologie, en particulier Madame **Nadia REFES** et Monsieur **Nouredine DJERRAI** qui nous ont facilité notre tâche ; et au personnels de la bibliothèque de l'ENSSMAL pour leurs aides.*

*Et enfin, on dit merci à tous ceux qui nous ont apporté leur aide de près ou de loin.*

## Liste des abréviations

**ADH** : Arginine.

**API** : Appareillage et Procédé d'identification.

**BEA** : Bile Esculin Agar.

**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth.

**BLBVB** : Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant.

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

**CEAEQ** : Centre d'Expertise en Analyse Environnemental du Québec, gouvernement du Québec.

**CIT** : Citrate.

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards for a Healthier World.

**CF** : Coliformes Fécaux.

**CT** : Coliformes Totaux.

**EDS** : Eau Distillée Stérile.

**EPE** : Eau Péptonée Exempte d'indole .

**ERG** : Enterocoque Résistante aux Glycopeptides.

**ERV** : Entérocoque Résistante à la Vancomycine .

**FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations.

**GEL** :Gélatine emprisonnant des particules de charbon .

**H<sub>2</sub>S** : Thiosulfate de sodium.

**IND** : Tryptophane .

**TDA** : Tryptophane .

**VP** : Pyruvate de sodium.

**WHO** : World Health Organization.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Arbre phylogénique du genre <i>Enterococcus</i> reposant sur le séquençage .....	7
<b>Figure 2:</b> Morphologie en microscope électronique à balayage d'une souche d'entérocoque. (www.alamy.com). .....	8
<b>Figure 3:</b> Morphologie en microscopie électronique à balayage d'une souche <i>E. coli</i> .....	14
<b>Figure 4:</b> Mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques (ARIAS C.A.et MURRAY B.E., 2012). .....	23
<b>Figure 5:</b> Localisation de la zone d'étude plage de Ain Taya. ....	31
<b>Figure 6:</b> Localisation de la zone d'étude plage bateau cassée.....	32
<b>Figure 7:</b> Localisation de la zone d'étude plage la Sirène. ....	33
<b>Figure 8:</b> Localisation de la zone d'étude plage de Sidi Fredj.....	34
<b>Figure 9:</b> Localisation de la zone d'étude Colonel Abbes (embouchure de Oued Mazafran) et plage Khaloufi 1. ....	35
<b>Figure 10:</b> Recherche des coliformes totaux. ....	37
<b>Figure 11:</b> Recherche des entérocoques. ....	39
<b>Figure 12:</b> la méthode de dilution NPP. ....	40
<b>Figure 13:</b> Galerie AP I 20E.....	47
<b>Figure 14:</b> Disposition des antibiotiques. ....	49
<b>Figure 15:</b> Aspect des coliformes sur milieu sélectif Tergitol. ....	54
<b>Figure 16:</b> Variation des charges des coliformes totaux et fécaux au niveau de six plages étudiées.....	54
<b>Figure17:</b> Résultat d'identification par galerie API 20 E.....	55
<b>Figure 18:</b> Aspect des entérocoques sur le milieu sélectif Slanetz.....	56
<b>Figure 19:</b> Aspect des entérocoques sur le milieu sélectif BEA après 2 heures d'incubation à 37°C.....	56
<b>Figure 20:</b> Variation des charges des entérocoques au niveau des six plages étudiées.....	57
<b>Figure21:</b> Variation des charges des coliformes totaux et fécaux au niveau du sédiment.....	58
<b>Figure 22:</b> Variation des charges des entérocoques au niveau de quatre stations étudiées.....	59
<b>Figure 23:</b> Aspect des entérocoques observés au microscope optique après la coloration de Gram(GrX100). ....	60

<b>Figure 24:</b> Résultat du test de la catalase .....	61
<b>Figure 25:</b> Résultats du test de croissance sur bouillon hyper salé .....	61
<b>Figure 26:</b> Résultats du test de résistance à la chaleur. ....	62
<b>Figure 27:</b> Profil de résistance aux antibiotiques d'une souche d'entérocoques isolée de l'eau de mer. ....	64
<b>Figure 28:</b> Profil de résistance aux antibiotiques d'une souche d'entérocoque isolée du sédiment. ....	64
<b>Figure 29:</b> Taux de résistance et de sensibilité des 18 souches d'entérocoques vis-à-vis des antibiotiques. ....	65

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Résumé des différentes résistances et effets des antibiotiques sur les entérocoques. .....	28
<b>Tableau 2:</b> Les différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme .....	50
<b>Tableau 3:</b> Résultats des paramètres physicochimiques. ....	52
<b>Tableau 4:</b> Tableau de synthèse des résultats des tests d'identification des entérocoques.....	63
<b>Tableau 5:</b> Profil de résistance aux antibiotiques pour chaque souche.....	69
<b>Tableau 6:</b> Résultats de la résistance des souches d'entérocoque isolées aux antibiotiques... ..	70

## Annexes

<b>Tableau 8:</b> Résultats du dénombrement des germes testés par méthode NPP.	
<b>Tableau 9:</b> Les résultats des entérocoques sur milieu Litsky.	
<b>Tableau 10:</b> Les résultats des coliformes sur milieu schuber.	
<b>Tableau 11:</b> Les normes de salubrité des plages, normes algériennes (Décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993).	
<b>Tableau 12:</b> Valeurs critiques des diamètres de zone d'inhibition.	
<b>Tableau 13:</b> La table de Mac Grady.	

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	2
---------------------------	---

## Généralités

I.1 ENTEROCOQUES .....	5
I.1.1 Historiques .....	5
I.1.2 Taxonomie .....	5
I.1.3 Caractères bactériologiques .....	8
I.1.4 Caractères culturaux.....	9
I.1.5 Caractères biochimiques .....	10
I.1.6 Pouvoir pathogène .....	11
I.1.7 Application biotechnologiques des entérocoques .....	12
I.2 LES COLIFORMES TOTAUX ET FECAUX .....	13
I.3 LES ANTIBIOTIQUES.....	14
I.3.1 Définition et historique .....	14
I.3.2 Origine .....	15
I.3.3 Spectre d'activité.....	16
I.3.4 Mode d'action .....	16
I.3.5 Famille et classification .....	17
I.3.6 Types de résistance .....	21
I.3.6.1 Résistance naturelle .....	21
I.3.6.2 Résistance acquise .....	22
I.4 LA RESISTANCE DES ENTEROCOQUES AUX ANTIBIOTIQUES.....	22
I.4.1 Résistance des entérocoques aux bêta-lactamines .....	23
I.4.2 Résistances des entérocoques aux aminosides.....	24
I.4.3 La résistance aux glycopeptides.....	25
I.4.4 La résistance aux autres antibiotiques.....	27

## Matériel et méthodes

II.1 ECHANTILLONNAGE.....	30
II.2 PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES .....	30

II.2.1	Plage Flots bleus (Ain Taya).....	30
II.2.2	Plage Bateau cassé .....	31
II.2.3	Plage la Sirène.....	32
II.2.4	Plage Hôtel Riadh (Sidi Fredj).....	33
II.2.5	Plage Khelloufi I.....	34
II.2.6	Plage Colonel Abes (Embouchure d'Oued Mazafran) .....	35
II.3	DETERMINATION DES PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES .....	36
II.3.1	Potentiel hydrogène et temperature.....	36
II.4	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE .....	36
II.4.1	L'eau de mer .....	36
II.4.1.1	Coliformes totaux .....	36
II.4.1.2	Coliformes fécaux.....	36
II.4.1.3	Les entérocoques .....	38
II.4.2	Sédiment .....	40
II.4.2.1	Coliformes totaux et fécaux.....	41
II.4.2.2	Les entérocoques .....	41
II.5	METHODES D'IDENTIFICATION DES ENTEROCOQUES.....	42
II.5.1	Coloration de Gram.....	43
II.5.2	Test de la catalase .....	44
II.5.3	La croissance sur bouillon hyper salé .....	44
II.5.4	Test de résistance à la chaleur.....	45
II.5.5	Résistance au Tellurite de Potassium ( $K_2TeO_3$ ).....	45
II.5.6	Identification des coliformes par la méthode des galeries API 20E .....	46
II.5.7	Etude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme .....	47

## Résultats et discussion

III.1	LES PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES .....	52
III.1.1	La température.....	52
III.1.2	Le potentiel hydrogène (pH) .....	53
III.2	ANALYSE MICROBIOLOGIQUE .....	53
III.2.1	Résultats des analyses bactériologiques des échantillons d'eau de mer .....	53
III.2.1.1	Les coliformes totaux et thermo tolérants .....	53
III.2.1.2	La galerie API 20E.....	55

III.2.1.3 Les entérocoques .....	56
III.2.2 Résultats des analyses bactériologiques du sédiment .....	58
III.2.2.1 Résultats de recherche des coliformes totaux et fécaux .....	58
III.2.2.2. Résultats de recherche des Entérocoques .....	59
III.2.3 Identification des entérocoques .....	60
III.2.3.1 Coloration de Gram .....	60
III.2.3.2 Test de la catalase .....	60
III.2.3.3 Croissance sur bouillon hypersalé .....	61
III.2.3.4 Test de résistance à la chaleur .....	61
III.2.3.5 Le test de tellurite de potassium .....	62
III.2.4 Résultats de l'antibiogramme .....	64
<b>CONCLUSION</b> .....	72
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	74
<b>ANNEXES</b> .....	85
<b>RESUME</b>	

# *Introduction*

## Introduction

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, lactiques, englobant des dizaines d'espèces qui ont longtemps été classés dans le genre des *Streptocoques* du groupe D. Les deux principales espèces sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. On les retrouve dans différentes niches écologiques, très réponsus dans l'intestin des animaux et des humains, ils peuvent se retrouver aussi dans le sol, sur les végétaux et dans les eaux usées douces et marines. Ces bactéries ont une grande adaptation à l'environnement car elles ont la capacité de survivre et de se développer dans des conditions hostiles. (LEBRETON F. *et al.*, 2014).

Ces bactéries sont impliquées dans la fermentation, la conservation des aliments, et sont utilisés aussi comme probiotiques (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).Elles ont également la capacité de produire des bactériocines qui inhibent la multiplication des autres bactéries pathogènes comme *Listeria*. (NAMI Y. *et al.*, 2019).

Elles sont responsables de quelques infections nosocomiales ou endocardites notamment par (*E. faecalis* et *E. faecium*) et sont utilisées comme des indicateurs des contaminations fécales des eaux. (BOEHM A.B., et SASSOUBRE L.M., 2014).De plus, les entérocoques ont la capacité de résister à une large gamme d'antibiotiques (multi-résistants) tels que les bétalactamines, les aminosides et les quinolones.Cette résistance crée un problème majeur qui s'étend à la résistance à la vancomycine et à d'autres familles d'antibiotiques. Ils présentent également divers phénotype de multi résistance vis-à-vis des glycopeptides et ont la capacité de transférer cette résistance aux autres espèces plus virulentes telles que *Staphylococcus aureus*. (LINA G. et CATTOIR V., 2014).

L'apparition de ce type de bactéries multirésistantes, notamment dans les eaux côtières, est due aux effluents d'élevages ou hospitaliers et aux eaux usées provenant d'activités humaines ou animales. (PARVEAU P., 2011). Ceci conduit à l'émergence et à la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques dans l'environnement marin. (DAUVERGNE E., 2018). En Algérie, peu d'étude ont été réalisées sur la résistance de ce genre bactérien.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques dans l'environnement marin côtier. Notre travail s'articule autour des parties suivantes:

- Première partie, consacrée à la recherche bibliographique sur les entérocoques et sur les antibiotiques.
- Deuxième partie, description de la zone d'étude et des différentes méthodes utilisées tout au long de ce travail.
- Troisième partie, présentation et discussion des résultats obtenus.
- Enfin, une conclusion qui synthétise notre travail et qui propose une ouverture vers de nouvelles perspectives d'études.

# *Généralités*

## I. Généralités

### I.1 Entérocoques

#### I.1.1 Historiques

Le terme « entérocoque » a été utilisé par THIERCELIN en 1899, quand il a décrit des bactéries commensales-intestinales capables de devenir pathogènes. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L. B., 2019). Et en 1906 ANDREWS et HORDER l'ont décrit sous le nom de *Streptococcus faecalis*, pour désigner des bactéries potentiellement pathogènes des patients souffrant d'endocardites. (DEVRIESE L. et al., 1995).

En 1919, ORLA-JENSEN décrit un deuxième organisme de ce groupe qui est : *Streptococcus faecium*. (DEVRIESE L et al., 1995).

Dans les années 1930 et sur base du système *Lancefield Serological Typing*, les Entérocoques étaient classés dans le genre *streptococcus* (groupe D), comme d'autres bactéries lactiques du genre *Lactococcus* et *Vagococcus*. (DEVRIESE L et al., 1995).

En 1938, SHERMAN a divisé les streptocoques en quatre groupes : entérocoques, streptocoques laitier, viridan et streptocoques pyogènes. Plus tard, les termes « viridans » et « entérocoques » ont été changé en streptocoques oraux et fécaux. (DEVRIESE L. et al., 1995).

En 1970, KALINA a proposé que *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium* devraient être transféré au genre *Enterococcus*. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019). Mais en 1984 le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus*. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019). Selon les résultats des techniques de chimio-taxonomie et de génétiques moléculaires : hybridation ADN-ADN ou ADN-ARNr, et séquençage des oligonucléotides de la sous unité 16S de l'ARN des ribosomes. (DEVRIESE L. et al., 1995). Schleifer et al., 1984 et Ludwig et al., 1985, ont reclassé les bactéries *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* comme *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, respectivement. (AGUILAR-GALVEZ et al., 2012).

#### I.1.2 Taxonomie

Les entérocoques sont des germes très similaires aux streptocoques. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019). Cette ressemblance permet de les classés comme streptocoques du groupe D jusqu'à 1984. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019).

Selon SVEC et DEVRIESE, (2009), le genre *Enterococcus* est classé comme suit : (AGUILAR-GALVEZ *et al.*, 2012) :

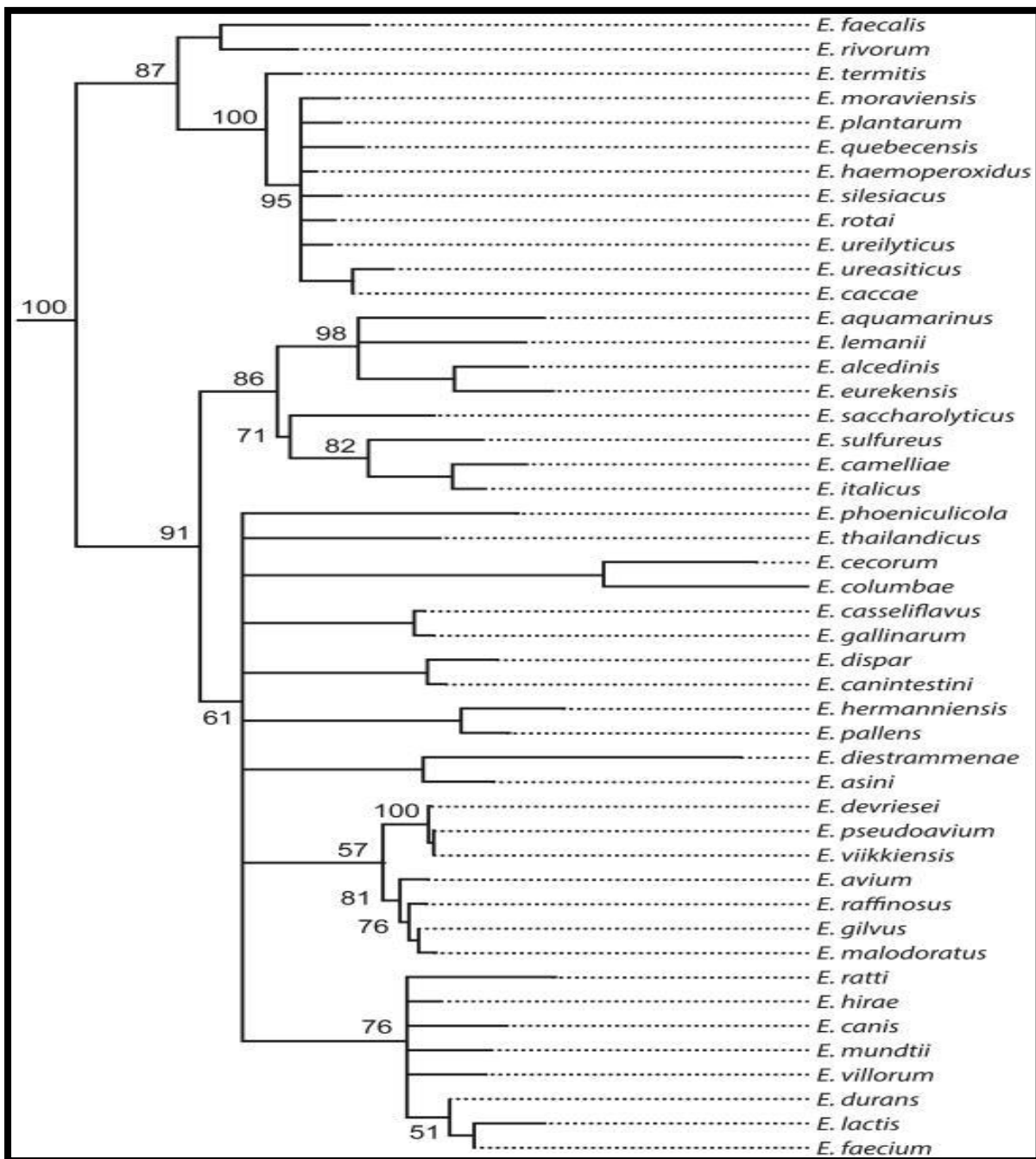
- **Domaine** : Bacteria ou Eubacteria.
- **Phylum** : Firmicutes.
- **Classe** : Bacilli.
- **Ordre** : Lactobacillales.
- **Famille** : *Enterococcaceae*.
- **Genre** : *Enterococcus*.

De point de vue phylogénétiques, les entérocoques appartiennent à la branche clostridiale des bactéries Gram positifs, avec un taux (G+C%) inférieur à 55%. (AGUILAR-GALVEZ *et al.*, 2012).

MONSTEIN *et al.*, (1998), ont proposé de subdiviser le genre *Enterococcus* en groupes d'espèces. En 2011, 35 espèces ont été déterminées sur la base d'ARNr 16S.(AGUILAR-GALVEZ *et al.*, 2012). Et en 2016 le genre *Enterococcus* comprend 54 espèces. (DENIS F.*et al.*, 2016).Les groupes d'entérocoques suivants sont recensés à la base de séquençage des gènes d'ARNr 16S : (SEPPO SALMINEN *et al.*, 2004).

- A. Le groupe *E. faecium*.
- B. Le groupe *E. avium*.
- C. Le groupe *E. gallinarum*.
- D. Le groupe *E. dispar*.
- E. Le groupe *E. saccharolyticus*.
- F. Le groupe *E. cecorum*.
- G. Le groupe *E. faecalis*.

Quelques espèces appartenant au genre *Enterococcus* ont été reclassées. Ainsi, *E. porcinus* a été reclassé comme *E. villorum* (DE GRAEF *et al.*, 2003) ; *E. flavescens* comme *E. casseliflavus* et *E. saccharominus* comme *E. italicus* (NASER *et al.*, 2006). Par ailleurs, quelques bactéries ont changé de genre *E. seriolicida* a été classé comme *Lactococcus garvieae* (ELDAR *et al.*, 1996), alors que *E. solitarius* est devenu *Tetragenococcus solitarius*. (ENNAHAR *et al.*, 2005).

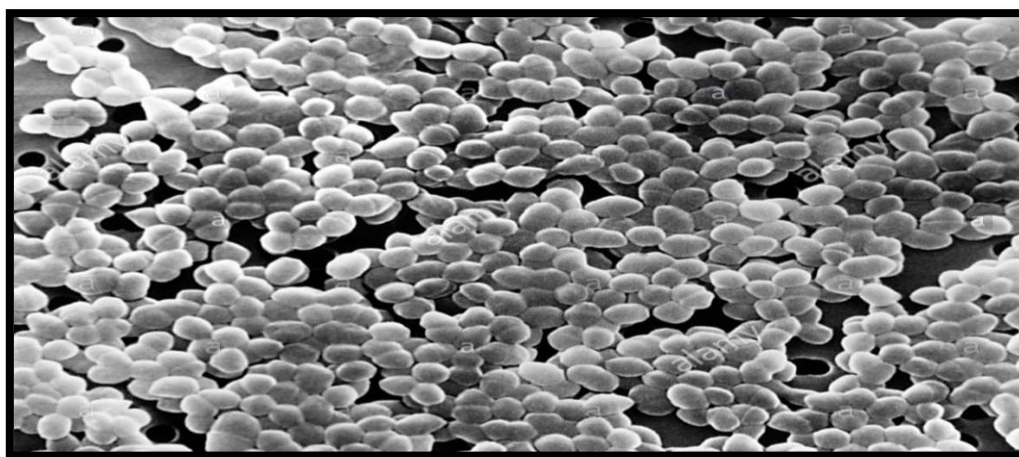


**Figure 1:** Arbre phylogénique du genre *Enterococcus* reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. (VAN TYNE et GILMORE, 2014).

## I.1.3 Caractères bactériologiques

Les entérocoques sont des bactéries Gram positif qui se présentent sous forme de diplocoques ou de coques en chaînettes et immobile. (STUCKI K. *et al.*, 2014) ; sauf *E. casseliflavus*, *E. flavescens* et *E. gallinarum* qui sont mobiles. La plupart des entérocoques sont oxydase négative (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019) ; et catalase négative, mais certaines souches révèlent une activité de pseudo-catalase lorsqu'elles sont cultivées sur milieu d'agar au sang. (BYAPPANAHALLI M-N. *etal.*, 2012); non sporulée. (CYBULSKA K. ET KRZYSKO-LUPICKA T. ,2020).

La morphologie des entérocoques peut varier selon les conditions de culture. (SISTEK V., 2010) ; où les entérocoques sont des cellules ovalaires, de taille variant de 0,6 à 1µm (DELARRAS D. ,2010). Sont anaérobies facultatifs avec un métabolisme homofermentaires ; en produisant essentiellement l'acide lactique à partir de la fermentation des glucides. (ŠVEC P. et FRANZ C., 2014 ; GARCIA-SOLACHE M.et RICE L.B., 2019). Ils produisent également en quantité moindre de l'acétate, du formiate et de l'éthanol. Les produits finaux du métabolisme peuvent changer en fonction de la présence ou non d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).



**Figure 2:** Morphologie en microscope électronique à balayage d'une souche d'*Enterococcus sp.* [www.alamy.com].

### I.1.4 Caractères cultureux

Les *Enterococcus* sont des *micro-organismes* mésophiles qui se développent dans une gamme de températures allant de 10 à 40°C, avec une température optimale de 35°C. Certaines espèces peuvent survivre à 60°C pendant 30min. Ils poussent dans des conditions hostiles de 6,5% de NaCl, de lait renfermant 0.1% de bleu de méthylène, de concentration en sels biliaires de 40% et dans une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).

L'isolement des entérocoques sur gélose bile-esculine et azide de sodium se traduit par des colonies présentant une coloration brune à noire (les colonies sont entourées par un halo noir. (DELARRAS C., 2014).

Les entérocoques sont aussi capables d'hydrolyser l'esculine (test bile-esculine positif), leucine- $\beta$ -naphthylamide, L-pyrrolidonyl  $\beta$ -naphthylamide et désaminé l'arginine. (SISTEK V., 2010).

En milieu de culture liquide, les entérocoques possèdent un aspect ovoïde, des cocci et une disposition préférentielle par paires ou courtes chainettes après 18 heures de culture (DENIS F. *et al.*, 2016) ; et sur gélose au sang de cheval, ils se cultivent facilement en donnant de petites colonies de 1 à 2  $\mu\text{m}$  d'aspect humide.(GARCIA-SOLACHE M. et RICE L. B., 2019). Alors que les entérocoques sont généralement  $\alpha$ -hémolytiques (hémolyse partielle associée à la réduction de l'hémoglobine dans les globules rouges), ou non hémolytiques, avec la présence de certaines souches d' *Enterococcus faecalis* qui sont  $\beta$ -hémolytiques (hémolyse complète des globules rouges ). (ISNARD C., 2017).

En outre , les entérocoques sont capables de métaboliser divers types de sucres comme le N-acétyl glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiose, le D-fructose, le galactose, le  $\beta$ -gentiobiose, le glucose, le lactose, le maltose, le D-mannose, le  $\beta$ -D-méthyle glucopyranoside, le ribose, la salicine et le tréhalose. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).

*Enterococcus faecalis* se caractérise par sa capacité de résister au tellurite de potassium, d'hydrolyser de l'arginine et certaines fermentations (mannitol, sorbitol, L-arabinose, D-raffinose, saccharose et lactose). (LECLERCQ R. *et al.* 2001).

De plus, la majorité des entérocoques sont positifs au test de Voges-Proskauer qui relie la production d'acétone à la fermentation du ribose. Ce test est largement utilisé dans la discrimination entre *Enterococcus* et *Streptococcus*. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).

Enfin la classification et l'identification des entérocoques dans ces dernières années sont basées sur des systèmes plus développés. Tels que : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique et la distance parcourue en un temps donné est en fonction du rapport masse sur charge (MALDI-TOF-MS), tests d'amplification (par PCR) d'acide nucléique (NAATs), hybridation in situ par fluorescence d'acide nucléique peptidique (PNA-FISH) et (MLST) qui consiste à séquencer un ensemble de fragments d'ADN amplifiés par PCR. (GARCÍA-SOLACHE M. et RICE L. B., 2019).

### I.1.5 Caractères biochimiques

- **Habitat**

Les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques, ubiquitaires, trouvées fréquemment dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, ainsi que dans une variété de produits alimentaires. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012). Mais ils sont très répandus dans le sol, les eaux de surface, sur les plantes et les légumes. (TATSING FOKA et ATEB F.E., 2019). Ils peuvent être retrouvés chez les oiseaux, les insectes et les reptiles. (VAN TYNE D. et GILMORE M.S., 2014). Grâce à leur capacité d'adaptation et de développement dans des conditions défavorables. (LEBRETON *et al.*, 2014 ; MARTINO G. P. *et al.*, 2018).

*E. faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées dans l'intestin humain, mais parfois, elles colonisent la cavité buccale, les voies respiratoires supérieures, et le tractus vaginal...etc. (GODREUIL *et al.*, 2007). Les deux espèces précédentes avec *E. durans* sont les plus isolées dans les fèces. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).

La présence des entérocoques a été démontrée chez certaines espèces animales préhistoriques auxquelles ils ont su s'adapter en évoluant avec les habitudes de vie tout au long des âges. (VAN TYNE D. et GILMORE M.S., 2014 ; LEBRETON *et al.*, 2017).

Et les espèces *E. munditii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus* sont les plus isolées concernant les végétaux. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).

Dans l'environnement, la survie des bactéries du genre *Enterococcus* est plus élevée comparée à celle d'*E. coli*. Ceci s'explique par leur meilleure aptitude à surmonter des stress environnementaux (oligotrophie, salinité, température). (ELSAS J.D.V. *et al.*, 2011).

Plusieurs nouvelles espèces d'entérocoques ont été détectées dans l'eau. Trois de ces nouvelles espèces ont été isolées à partir d'eau douce en République Tchèque, *E. silesiacus*, *E. haemoperoxidus* et *E. moraviensis*. Une autre nouvelle espèce (*E. aquimarinus*) a cette fois-ci été isolée à partir d'échantillons d'eau de mer. (SISTEK V., 2010).

Du fait de leur résistance aux températures de pasteurisation basse et leur grande adaptabilité aux conditions environnementales, ils sont retrouvés à la fois dans les produits crus mais aussi dans les produits finis issues de l'industrie agro-alimentaire (FOULQUIE MORENO *et al.*, 2006) ; et rentrent dans la composition de certains probiotiques du fait de la production de bactériocines par certaines espèces. (CELIBERTO *et al.*, 2017).

Les deux principales espèces importantes en clinique sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, le premier se retrouvant plus fréquemment que le second (90% vs 10% environ). (STUCKI K. *et al.*, 2014).

### I.1.6 Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène d'une bactérie est sa capacité à provoquer une maladie. Il dépend de son pouvoir invasif, de son pouvoir toxique et de résistance de l'hôte. [[www.studylibfr.com](http://www.studylibfr.com)].

Alors que, les facteurs de virulence sont définis comme des éléments qui augmentent la capacité du microorganisme à provoquer la maladie, ils ne sont pas indispensables à la survie de la bactérie, mais diminuent son potentiel pathogène lorsqu'ils sont absents (CASADEVALL A. et PIROFSKI L., 2001).

Les entérocoques sont considérés comme des organismes commensaux du tractus gastro-intestinal humains. Ils causent des infections des voies urinaires, bactériémie, brûlure et plaie du site opératoire (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019). Le risque des entérocoques est relié à leur origine gastro-intestinale, l'entrée dans la chaîne alimentaire, la résistance aux antibiotiques ainsi que leur capacité à échanger du matériel génétique ou

encore, pour quelques souches, à produire de grandes quantité d'amine biogéniques associées à la fermentation. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).

Par contre, les entérocoques ne sont pas très virulents de nature par rapport à d'autres bactéries Gram positif puisque la dose létale, c'est-à-dire la quantité de bactéries qui tue 50% des animaux, est nettement plus élevée. Ils font tous deux partie de la flore commensale de nos intestins et se comportent comme des germes opportunistes. (STUCKI K. *et al.*, 2014).

Ce qui fait d'eux des indicateurs privilégiés pour évaluer l'efficacité du traitement de l'eau (OMS, 2000). Leur détection témoigne généralement d'une pollution fécale et sont considéré comme indicateurs de contamination d'origine fécale. (BENHEDANE NEE BACHTARZI N., 2012 ; DROMIGNY E., 2012).

Généralement l'espèce *E. faecium* est responsable des infections humaines contrairement aux *E. hirae*, *E. mundtii* et *E. durans*. (MARTINO G. P. *et al.*, 2018).

Les premières souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG) ont été décrites à la fin des années 1980 en France et en Angleterre. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010). Depuis, ces souches sont largement diffusées, notamment aux Etats-Unis où elles représentent un sérieux problème de santé publique. (WILLEMS R.J. et BONTEN M., 2007).

Les facteurs de virulence retrouvés chez les entérocoques sont répartis en 5 grandes fonctions : les facteurs permettant l'adhésion, les facteurs participants à la formation de biofilm, les régulateurs de l'expression de certains gènes, les enzymes lytiques et les facteurs antiphagocytaires. (WILLEMS R.J. et BONTEN M., 2007).

Selon SAVA *et al.* (2010), deux facteurs de virulence ont été isolés et caractérisés. Le premier type: facteurs de virulence influant sur 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.

### **I.1.7 Application biotechnologiques des entérocoques**

Les entérocoques sont utilisés dans les aliments comme agents antimicrobiens. Ce genre bactérien produit une grande diversité de bactériocines, considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et

nutritionnelles. Elles constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012). Spécialement le groupe *E. faecium*, possédant des caractéristiques bénéfiques concernant la fermentation et la conservation des produits alimentaires et leur contribution dans la santé humaine. (MARTINO G. P. *et al.*, 2018).

Le terme probiotique a été défini comme des préparations de micro-organisme viables en quantités suffisantes qui peuvent moduler la flore de l'organisme hôte, exerçant ainsi des effets bénéfiques pour la santé. (FAO/WHO, 2006).

La plupart des souches utilisées comme probiotiques sont des bactéries lactiques provenant du tractus gastro-intestinal humain telles qu'*E. faecium* et *E. durans*. (FRANZ C. *et al.*, 2011; NATARAJAN P. et PARANI M., 2015).

### I.2 Les coliformes totaux et fécaux

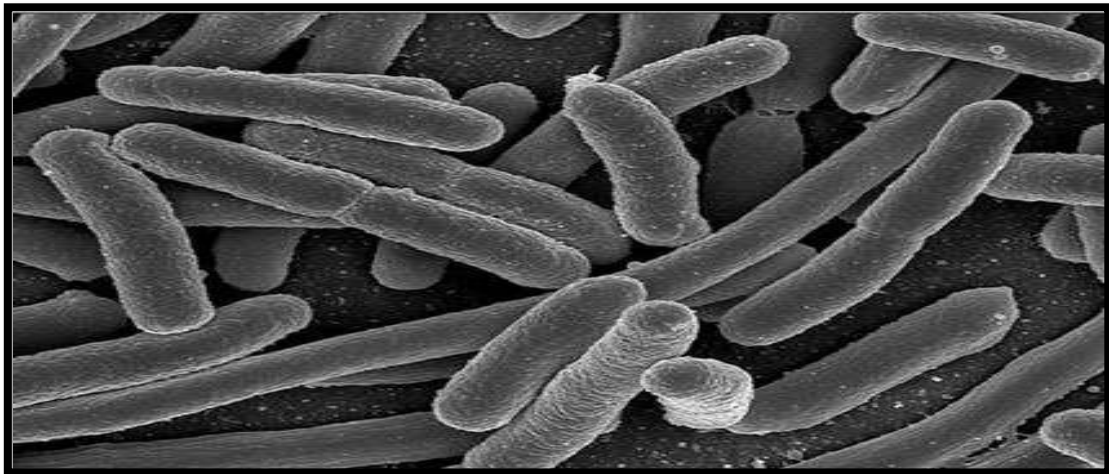
Les coliformes totaux regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des Entérobactéries qui sont anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées en forme de bâtonnet. (CEAEQ, 2016). Ils sont des indicateurs dont le dénombrement permet de déceler le niveau de pollution d'origine organique dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable. (CEAEQ, 2016).

Les principaux genres bactériens inclus dans le groupe des coliformes sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia*. (WHO, 2011 ; CEAEQ, 2015).

Selon Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2014) : Les coliformes thermotolérants (fécaux) se définissent comme des bactéries anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées, en forme de bâtonnet et produisant des colonies bleues en moins de 24 heures à 44,5 °C sur un milieu de type m-FC contenant du lactose ; et sont capables de fermenter le lactose à une température de 44°C. (EDBERG S.C. *et al.*, 2000).

Tel qu'*E. coli*, l'espèce la plus fréquemment associée aux coliformes fécaux. Elle représente toutefois 80 à 90% des coliformes thermo-tolérants détectés, qui sont toujours présents dans l'intestin des humains et des animaux à sang chaud et ils sont éliminés en grande quantité dans les matières fécales. (CEAEQ, 2014).

Les coliformes thermotolérants de même que *E. coli* sont des indicateurs d'une contamination récente ou constante, d'origine fécale humaine ou animale. *E. coli* est un indicateur plus spécifique d'une contamination fécale que le groupe des coliformes thermotolérants. Les principales sources environnementales de coliformes thermotolérants et de *E. coli* sont les rejets d'eaux usées domestiques et municipales et parfois industrielles. (CEAEQ, 2014).



[ [www.nationalgeographic.org](http://www.nationalgeographic.org) ]

**Figure 3:** Morphologie en microscopie électronique à balayage d'une souche *E. coli*.

## I.3 Les antibiotiques

### I.3.1 Définition et historique

Dès 1877, Pasteur et Joubert avaient remarqué que certaines moisissures élaboraient des substances empêchant le développement d'autres champignons. En 1928, Alexander Fleming montre que le champignon *Penicillium notatum* produisait une substance bactériostatique agissant sur nombreux microbes et inhibait le développement des bactéries (*Staphylococcus aureus*). Il venait de découvrir la pénicilline. Les applications de la pénicilline et sa préparation industrielle ont été étudiées par Chain et Florey entre 1939 et 1945. Ils mirent en valeur son action antibiotique. À la suite de la découverte de Fleming, de nombreux chercheurs étudièrent les produits de sécrétion d'un grand nombre de champignons, obtenant ainsi des nouveaux antibiotiques. (DENIS S., 2013), tels que G. Domagk en 1939 (découverte du protosil) et S. Waksman en 1952 (découverte de la streptomycine). (TREMOLIERES F., 2010). Puis, la constitution chimique des antibiotiques ayant été définie, en remplaçant certains atomes dans les formules par des radicaux plus ou moins complexes. On constitua

ainsi les antibiotiques hémi-synthétiques. (DENIS S., 2013). En 1947 le chloramphénicol a été produit et un an plus tard l'oxytétracycline. Ils furent les premiers antibiotiques à large spectre. Puis vinrent la polymyxine, l'érythromycine, l'isoniazide, la vancomycine, la rifampicine, l'acide nalidixique, et bien d'autres. Au début des années 1960, plus des trois quarts des familles d'antibiotiques d'aujourd'hui avaient déjà un ou plusieurs représentants. (TREMOLIERES F., 2010).

Ultérieurement, on a obtenu des antibiotiques de synthèse totale. Enfin, on peut fabriquer des antibiotiques par certaines bactéries après modifications génétiques. (DENIS S., 2013).

Les « antibiotiques » au sens large sont des substances naturelles produites par un micro-organisme qui inhibent les fonctions ou présentent une activité létale contre des cellules vivantes que ce soit des micro-organismes, des champignons, mais aussi d'autres types de cellules tels que des cellules cancéreuses. On peut distinguer :

Les antibiotiques anti-infectieux (antibactériens, antifongiques); antitumoraux et les antiviraux. (BOUTEFNOUCHET S. *et al.*, 2020).

D'un point de vue médical, on appelle antibiotique toute substance chimique, quelle que soit son origine, agissant de manière spécifique sur une étape du métabolisme des bactéries (antibiotiques antimicrobiens) ou des champignons (antibiotiques antifongiques); ces substances sont d'origines naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques. (DELARRAS C., 2014).

Ces antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le spectre d'activité et le mécanisme d'action. (YALA D. *et al.*, 2001).

### I.3.2 Origine

Ces substances sont d'origine naturelle, semi synthétique ou synthétique.

- ❖ **Naturel** : des substances produites par des micro-organismes et agissant sur d'autre micro-organisme (la pénicilline synthétisée par *Penicillium.sp.*). (YVON MICHEL-BRIAND., 2009).
- ❖ **Synthétique** : des substances produites par synthèse chimique tels les sulfamides. (YVON MICHEL-BRIAND., 2009).
- ❖ **Semi-synthétique** : ce sont des antibiotiques naturels ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017).

### I.3.3 Spectre d'activité

C'est la liste bactérienne pouvant être inhibées (effet bactériostatique) ou détruites (effet bactéricide) par les concentrations d'un antibiotique donné. (DELARRAS C., 2014). Le spectre d'un antibiotique est destiné à caractériser l'activité microbiologique d'un antibiotique sur une espèce bactérienne en tenant compte des résistances naturelles et acquises (CAVALLO J.D. et MERENS A., 2007). Où les antibiotiques ne sont pas actifs sur toutes les espèces bactériennes. Il existe donc un spectre d'activité pour chaque antibiotique, on distingue : (DELARRAS C., 2014).

- ❖ **Les antibiotiques à spectre large** : agissant sur la majorité des bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif.
- ❖ **Les antibiotiques à spectre limité** : ayant une action sur un groupe de germe limité (par exemple antibiotiques des bactéries à Gram positif).
- ❖ **Les antibiotiques à spectre étroit** : ayant une efficacité sur un nombre très limitée (par exemple l'antibiotique anti-staphylococcique).

### I.3.4 Mode d'action

Ils sont capables de détruire (bactéricide) ou d'inhiber la croissance bactérienne (bactériostatique). (PEBRET F., 2003).

Un antibiotique peut agir à différents niveaux :( PEBRET F., 2003).

- 1- Au niveau de la paroi en inhibant la synthèse du peptidoglycane.
- 2- Au niveau cytoplasmique.
- 3- En inhibant la synthèse de l'ADN bactérien par l'intermédiaire de l'inhibition de la synthèse de l'acide folique.
- 4- En agissant sur la synthèse des ARN des ribosomes.

## ❖ Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'un antibiotique donné pouvant arrêter, dans un milieu et à des concentrations déterminées, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée. (DELARRAS C., 2014).

## ❖ Concentration minimale bactéricide(CMB)

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique ne laissant survivre qu'un nombre inférieur ou égale à  $10^4$  bactéries de l'inoculum, après incubation de culture pendant 18 heures à 37°C. (DELARRAS C., 2014).

### I.3.5 Famille et classification

Selon leur mode d'action les antibiotiques sont classés en 5 groupes :

#### a) Antibiotiques agissant sur la paroi

- Famille des  $\beta$ -lactamines

La famille des bêta-lactamines sont des molécules naturelles ou hémi-synthétiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. (KOHANSKI M.A. *et al.*, 2010).

La famille des bêta-lactamines regroupe :

- Les pénicillines

Des molécules produites naturellement par *Penicillium notatum*, à large spectre d'activité (Gram<sup>+</sup> quelques Gram<sup>-</sup>) pour l'ampicilline et carbénicilline et étroit pour pénicilline G, Pénicilline V, et méthicilline. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017). Ils inhibent les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017).

- Les Céphalosporines

Tous les produits de cette série dérivent de la céphalosporine C, molécule naturelle élaborée par un champignon (*Cephalosporium acromurium*), a désormais consacré la classification en trois générations : première, deuxième et troisième génération. (KACIMI A. et OUAZZI T., 2017). Ce sont des produits à large spectre, et notamment sur les bacilles à Gram négatif.

- **Famille des Glycopeptides**

Comme les  $\beta$ -lactamines et la fosfomycine, les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne, plus précisément du constituant majeur de celle-ci, le polymère peptidoglycane. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

Le mode d'action de ces antibiotiques repose sur leur forte affinité pour l'extrémité des précurseurs monomériques de la paroi se terminant par un dipeptide D-alanyl - D-alanine à laquelle il se fixe par l'intermédiaire de cinq liaisons hydrogène. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

La famille des glycopeptides regroupe :

- **La teicoplanine**

Est un antibiotique glycopeptidique produit par *Actinoplanes teichomycetus*. (WILLEY J.M. et al., 2017). Constitué de six composants principaux nommés TA2-1, TA2-2, TA2-3, TA2-4, TA2-5 et TA3. Ils sont des antibiotiques agissant principalement sur la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ce sont des antibiotiques d'action bactéricide lente. (KACIMI A. et OUAZZI T., 2017).

- **La vancomycine**

La vancomycine a été isolée en 1953 par Dr. Edmund Carl Kornfeld ; Cette découverte est survenue dans une période où la résistance à la pénicilline du staphylocoque doré représentait un défi de grande taille en pathologie infectieuse. *Streptomyces orientalis* (actuellement nommé *Amycolatopsis orientalis*), produisait un composé avec une forte activité bactéricide contre le staphylocoque. Ce composé a été nommé vancomycine. (LUQUE Y. et MESNARD L., 2018).

### b) Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

- **Famille des Aminosides**

Ces antibiotiques à large spectre (Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>), typiquement bactéricides (WILLEY J.M. et al., 2017), incluent l'amikacine, la gentamicine, la kanamycine, la tobramycine, la plazomicine et la streptomycine. (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016). Leur effet

principal vient de leur fixation à la sous-unité 30S du ribosome pour inhiber directement la synthèse protéique et provoquer des erreurs de lecture de l'ARNm. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017).

Chez les aminoglycosides existent trois principales mécanismes de résistance : diminution de la perméabilité cellulaires ; altérations des sites de liaison ribosomale ; et production d'enzymes. Alors que la résistance causée par la mutation ribosomale interfère avec la sous unité 30S. (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016).

- **Famille des Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS)**

Les macrolides sont des molécules naturelles et hémi-synthétiques (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016) ; à un spectre d'activité relativement large (Gram<sup>+</sup> aérobies et anaérobies, quelques Gram<sup>-</sup>) (WILLEY J.M. *et al.*, 2017 ), qui inhibent l'élongation de la chaîne peptidique en se liant à l'ARN 23S de la grande sous unité 50S du ribosome.( FERNANDES P. et MARTENS E., 2016).

- **Famille des Tétracyclines**

Les tetracyclines sont des molécules naturelles et hémi-synthétiques, bactériostatiques à large spectre d'activité, pour Gram-positif, Gram-négatif, aérobies, anaérobies et les bactéries atypiques qui inhibent la synthèse des protéines par l'inhibition de l'acyl-ARNt qui transfert sur le ribosome 30S. (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016).

- **Famille des Oxazolidinones**

Cette famille n'a pas d'origine naturel mais a été découverte pour la première fois à Du Pont et à cause de sa toxicité inacceptable, elle n'a pas été développée. (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016).Le linézolide est le premier oxazolidinones fabriqué.C'est un inhibiteur de la synthèse des protéines par sa liaison au site de la peptidyl transférase (ARN mitochondrial). (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016).

### c) Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

- **Famille des Polymyxines**

La fixation des polymyxines au niveau des composés lipidiques des membranes (membrane externe, puis membrane cytoplasmique) désorganise la structure de ces dernières, aboutissant à la mort bactérienne. Parmi les nombreuses polymyxines, seules la polymyxine B et la polymyxine E (colistine) sont utilisées. (**BUXERAUD J. et FAURE S., 2016**).

### d) Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques

- **Famille des Quinolones et Fluoroquinolones**

Les quinolones (1ère génération) et fluoroquinolones (quinolones de 2ème et 3ème génération), à large spectre d'activité (**WILLEY J.M. et al., 2017**), sont des molécules synthétiques qui se fixent sur l'ADN gyrase, enzyme essentielle pour la synthèse de l'ADN. (**KOHNISKI M.A. et al., 2010 ; WILLEY J.M. et al., 2017**).

L'acide nalidixique a été la première quinolone d'origine indirecte des produits naturels, qui elle-même est un analogue de la quinine extraite de l'écorce de l'arbre Cinchona. Il a été nommé Negram, car son activité était limitée aux bactéries à gram négatif. (**FERNANDES P. et MARTENS E., 2016**).

- **Famille des Rifamycines**

La rifampicine est une classe dans la famille des rifamycines, elle inhibe la croissance bactérienne en se liant à la sous unité beta de l'ARN polymérase et empêchant l'initiation de la transcription. (**KRISTICH C.J. et al., 2014**).

- **Famille des Nitrofuranes**

Elles agissent directement sur l'ADN provoquant diverses lésions (coupures et substitution de bases). (**MAMERI N., 2012**).

## e) Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique

- **Famille des Sulfamides**

Ce sont des molécules synthétiques, des analogues de p-aminobenzoïque (PABA), avec un large spectre d'activité. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017), qui inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, molécule précurseur de la synthèse de l'ADN. (KOHANSKI *et al.*, 2010). Elles inhibent la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque (PABA). (WILLEY J.M. *et al.*, 2017).

- **Famille des 2-4 diaminoptéridine (Triméthoprime)**

Se lie à la dihydrofolate réductase et inhibe la réduction de l'acide dihydrofolique (DHF) en acide tétrahydrofolique (THF) et possède une sélectivité pour l'enzyme bactérienne, et connu par sa capacité de baisser le taux de l'acide folique. (FERNANDES P. et MARTENS E., 2016). Avec un large spectre d'activité. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017).

### I.3.6 Types de résistance

Selon SYLVIE CARLE (2009) ; Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

On distingue deux types de résistance aux antibiotiques :

#### I.3.6.1 Résistance naturelle

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribuer à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible.

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre. (SYLVIE CARLE, 2009).

### I.3.6.2 Résistance acquise

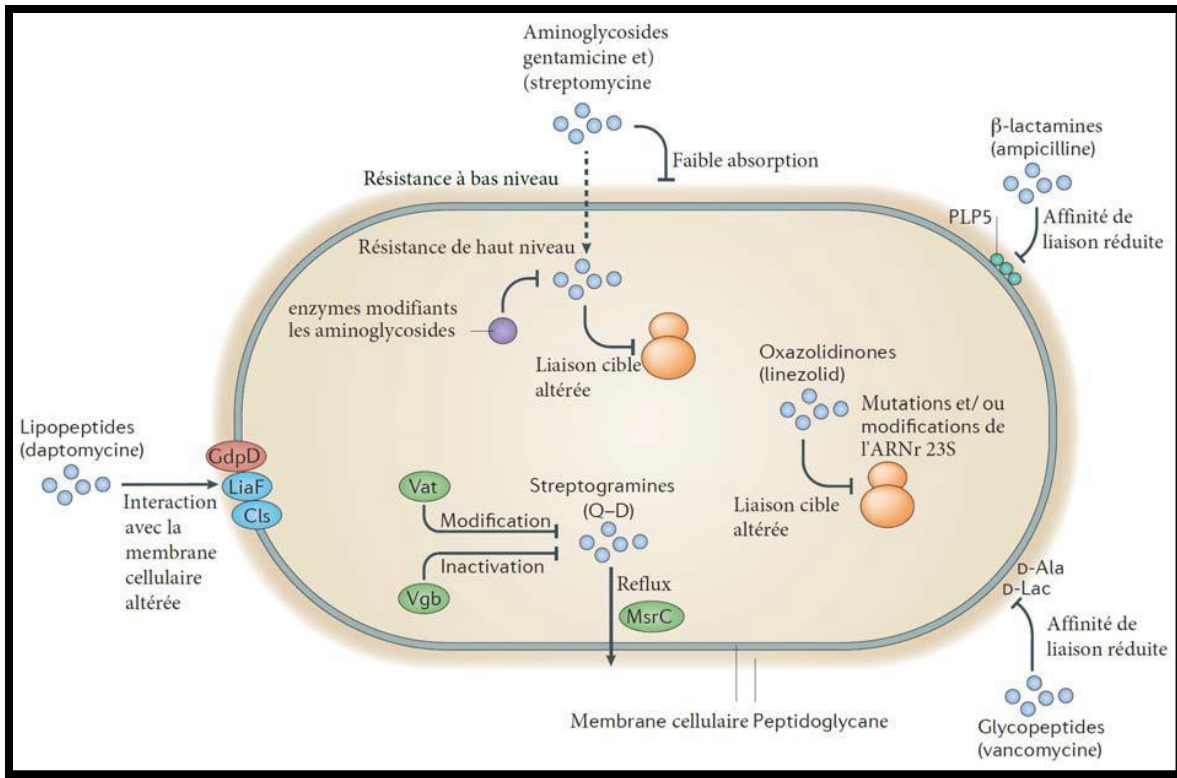
La résistance acquise se définit comme une caractéristique propre à quelques souches bactériennes d'un genre ou d'une espèce particulière, provoquant l'émergence et la diffusion de résistances au sein de populations de germes normalement sensibles. On décrit deux phénomènes majeurs à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. (MUYLAERT A.M.J.G., 2012).

### I.4 La résistance des entérocoques aux antibiotiques

Les entérocoques résistants aux antibiotiques sont sélectionnés à la fois chez l'homme et chez l'animal, en raison de l'utilisation d'agents antimicrobiens dans les deux milieux (HAMMERUM, 2012). Cette propriété de résistance est due à la présence de gènes de résistance principalement acquis par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons). (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012). La plasticité du génome des entérocoques leur permet de s'adapter, de survivre à leur environnement et de résister naturellement aux substances antimicrobiennes. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L. B., 2019). Alors que leur multi résistance aux antibiotiques représente le principal problème en pratique clinique ; c'est particulièrement vrai lors des infections dues à *E. faecium*, souvent résistant à toutes les  $\beta$ -lactamines. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

CARON et al. et BROWN et al., ont montré que les entérocoques sont naturellement résistants aux céphalosporines, aminoglycosides, clindamycines, tetracyclines, erythromycines et intermédiairement sensibles aux penicillines, ampicillines et glycopeptides. (CYBULSKA K. et KRZYSKO-LUPICKA T., 2020). Alors que *E. faecalis* et *E. faecium* isolés chez l'homme, la chair des poulets et les porcs étaient résistants aux chloramphénicoles, macrolides, kanamycines, streptomycines, tetracyclines et vancomycines. (CYBULSKA K. et KRZYSKO-LUPICKA T., 2020).

Les entérocoques sont poursuivis plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques (figure4), soit naturels ou acquis.



**Figure 4:** Mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques. (ARIAS C.A.et MURRAY B.E., 2012).

### I.4.1 Résistance des entérocoques aux bêta-lactamines

#### a. Résistance naturelle

Les entérocoques sont naturellement résistants à la plupart des β-lactamines. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019 ; CASFM, 2020).

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

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des pénicillines et carbapénèmes est 10 à 100 fois plus élevée pour les entérocoques que pour les autres streptocoques, en raison d'une plus faible affinité de la PLP pour ces β-lactamines (pénicillines). De plus, les entérocoques sont considérés comme étant tolérants aux β-lactamines, car ces germes ne sont tués que par des concentrations minimales bactéricides (CMB) d'antibiotiques nettement supérieures à la CMI (CMB/CMI > 32). (STUCKI K. et al., 2014).

Parmi les souches fréquemment isolées en clinique en France, *E. faecium* possède des CMI50 égales à 8 µg/mL pour la pénicilline G, tandis que pour *E. faecalis*, 100 % des souches ont une CMI < 4 µg/mL (QUINCAMPOIX J. C. et MAINARDI J.L., 2001).

### b. Résistance acquise

#### ❖ Production de β-lactamases

La résistance par production de la bêta lactamase (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019) ; tels que la pénicillinase d'origine plasmidique décrite principalement chez *E. faecalis* aux Etats-Unis, en Argentine et au Liban. (BERTRAND *et al.*, 2005). Cette bêtalactamase est très proche de celle de *Staphylococcus aureus*. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L.B., 2019). A noter que cette activité des pénicillines sur ces souches est restaurée en présence d'un inhibiteur de β-lactamases. Lorsqu'il existe, ce gène se trouve fréquemment associé à un haut niveau de résistance à la gentamicine. (QUINCAMPOIX J.C. et MAINARDI J.L., 2001).

#### ❖ Mutation de la PLP5

La résistance est due à des modifications de la PLP5 qui présente une affinité diminuée pour les β-lactamines. (CASFM, 2020).

## I.4.2 Résistances des entérocoques aux aminosides

### A. Résistance naturelle

Les entérocoques présentent une résistance de bas niveau aux aminosides. (CASFM ; 2020). Chez *E. faecium*, la production naturelle d'une enzyme, la 6-N'acétyl transférase, confère un phénotype de résistance de type K (kanamycine), T (tobramycine), N (nétilmicine) épargnant la gentamicine. La synergie entre la gentamicine (CMI = 4–16 µg/mL) et les β-lactamines, permettant une action bactéricide. (QUINCAMPOIX J. C. et MAINARDI J.L., 2001).

### B. Résistance acquise

La résistance se fait par deux mécanismes : (QUINCAMPOIX J.C. et MAINARDI J.L., 2001).

### ➤ Mécanisme enzymatique

Chez *E. faecium*, la résistance à haut niveau aux aminosides est le fait des enzymes plasmidiques qui sont retrouvées chez les staphylocoques et conférant les mêmes phénotypes de résistance.

### ➤ Mutations chromosomiques

Chez *E. faecalis*, le haut niveau de résistance à la streptomycine résulte de mutations ribosomales. Dans chaque cas, il en résulte une abolition de la synergie avec les pénicillines.

### I.4.3 La résistance aux glycopeptides

Neuf types de résistance aux glycopeptides ont été décrits, sur des critères phénotypiques et génotypiques. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010). Huit correspondent à un mécanisme de résistance acquise (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM et VanN) tandis qu'un seul a une caractéristique intrinsèque d'espèce (VanC chez *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*). (COURVALIN P., 2006 ; CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

Les types VanA et VanB sont les phénotypes les plus fréquemment retrouvés chez les entérocoques (surtout *E. faecium*) alors que seul VanA a diffusé chez une dizaine de souches de *S. aureus* rapportées aux États-Unis. (COURVALIN P., 2006).

Les espèces *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* présentent une résistance de bas niveau à la vancomycine. Le phénotype «résistant» à la téicoplanine et «sensible» à la vancomycine est exceptionnel. (CASFM, 2020).

#### a. Résistance naturelle

Les entérocoques sont naturellement sensibles à la vancomycine (CMI modale de 1 mg/l) et à la téicoplanine (CMI modale de 0,5 mg/l), à l'exception des deux espèces naturellement résistantes à la vancomycine, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

Le phénotype VanC est caractérisé par la résistance naturelle de bas niveau à la vancomycine non transférable et probablement chromosomique associée à une sensibilité conservée à la téicoplanine et observée chez *E. casseliflavus* et *E. gallinarum*. (COURVALIN P., 2006).

Ce bas niveau de résistance permet cependant une action synergique dans le traitement d'infections sévères à entérocoques avec la pénicilline ou glycopeptides obtenue grâce à

l'action préalable des bêta lactamines ou des glycopeptides sur la paroi. (BERTRAND *et al.*, 2005).

### b. Résistance acquise

Actuellement cinq phénotypes de résistance aux glycopeptides sont décrits. Cette résistance observée surtout chez *E. faecium* et apparue en 1987 s'explique par une modification de la structure du peptidoglycane. Les souches VanA sont hautement résistantes à la vancomycine et à la téicoplanine de façon inductible alors que les souches VanB présentent des niveaux variables de résistance uniquement à la vancomycine, seule inductrice. (COURVALIN P., 2006 ; CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010). Tels que le phénotype VanA d'origine plasmidique, le gène *vanA* code pour une enzyme (ligase) permettant la naissance d'un dipeptide terminal anormal (D-alanyl-D-lactate) de faible affinité pour les glycopeptides (QUINCAMPOIX J.C. et MAINARDI J.L., 2001). VanB d'origine chromosomique est retrouvé chez *E. faecium* et chez *E. faecalis*. (QUINCAMPOIX J.C. et MAINARDI J.L., 2001). Le phénotype VanD, décrit uniquement chez une souche de *E. faecium*. le gène *vanD* code pour une enzyme (ligase) permettant la naissance d'un dipeptide terminal anormal (D-alanyl-D-lactate). Et finalement le phénotype VanE : ce déterminant a été impliqué chez *E. faecalis* dans la formation d'un dipeptide terminal de forme D-ala-D-serine. (QUINCAMPOIX J.C. et MAINARDI J. L., 2001).

Le mécanisme de la résistance est le même pour les types de résistance VanA et VanB qui sont inductibles. Les gènes nécessaires à l'expression de la résistance sont portés par les transposons Tn1546 (VanA) et Tn1547 (VanB). L'expression inductible est liée à la synthèse de deux protéines, partenaires dans un système régulateur à deux composants. Un des précurseurs essentiels de la paroi bactérienne est un dérivé pentapeptidique. Il constitue un monomère de la paroi à laquelle il est branché au cours de son élongation et terminé par un dipeptide D-alanyl-D-alanine, qui est le site de fixation des glycopeptides. Cette fixation empêche en conséquence le branchement du précurseur et donc l'élongation de la paroi ; les souches résistantes synthétisent des précurseurs terminés par un dipeptide D-alanyl-D-lactate et qui est de faible affinité pour la vancomycine et la téicoplanine. Expliquant ainsi la résistance. Cette résistance est donc une résistance par modification de la cible. (COURVALIN P., 2006 ; CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

### I.4.4 La résistance aux autres antibiotiques

Les espèces *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. avium* sont naturellement résistantes aux lincosamides. (CASFM, 2020).

Les entérocoques résistent également à d'autres familles d'antibiotiques ; ainsi ils ont acquis des facteurs de résistance aux tétracyclines et macrolides (50% des *E. faecalis* et 70% des *E. faecium* sont résistants à ces deux familles), aux chloramphénicol, aux fluoroquinolones, aux lincosamides. (BERTRAND *et al.*, 2005).

**Tableau 1:** Résumé des différentes résistances et effets des antibiotiques sur les entérocoques.

Antibiotiques	Résistance naturelle	Résistance acquise	Effet
Béta lactamines	PLPs de faible affinité (CASFM, 2020).	Altération de PLP, hyperproduction de B-lactamase (KRISTICH C.J. et al., 2014).	Bactéricide (WILLEY J.M. et al., 2017).
Aminoglycosides	Niveau modéré de résistance due à l'imperméabilité (faible absorption). (KRISTICH C.J. et al., 2014).	Haut niveau (KRISTICH C.J. et al., 2014).	Bactéricide (WILLEY J.M. et al., 2017).
Trimethoprim	Résistance <i>in vivo</i> due à la capacité des organismes à utiliser des folates exogènes		Bactériostatique (WILLEY J.M. et al., 2017).
Quinolones	Perméabilité (MADJMAA O. et BOULMAIZE H., 2016).	Haut niveau due à mutation de la gyrase (KRISTICH C.J. et al., 2014).	Bactéricide (WILLEY J.M. et al., 2017).
Glycopeptides	Bas niveau chez <i>E.casseliflavus</i> et <i>E.gallinarum</i> (CASFM, 2020).		Bactéricide
MLS		Méthylation de 23S rARN (KRISTICH C.J. et al., 2014).	Bactériostatique (WILLEY J.M. et al., 2017).
Tétracyclines		Efflux de l'antibiotique (GARCIA-SOLACHE M et RICE L.B., 2019).	Bactériostatique (WILLEY J.M. et al., 2017).
Chloramphénicol		Chloramphénicol acetyltransferase (MADJMAA O. et BOULMAIZE H., 2016).	Bactériostatique (WILLEY J.M. et al., 2017).

*Matériel  
et méthodes*

## II. Materiel et methodes

### II.1 Echantillonnage

Tous les prélèvements ont été effectués le 9 mars 2020 et vue la situation sanitaire on n'a pas pu réaliser d'autres sorties sur le terrain. On a pu récolter 6 échantillons d'eau et 4 de sédiment

Les échantillons d'eau de mer ont été collectée dans des flacons stériles de 500ml à 20cm de profondeur et à une distance de 1m du bord de mer.

Les flacons sont tenus à la main près des points de prélèvement puis plongés dans l'eau et refermé sous l'eau, après le remplissage, afin d'éviter toute contamination.

Alors que les sédiments ont été prélevés manuellement dans des flacons en verre stériles.

Un étiquetage précis a été élaboré pour la reconnaissance des stations de prélèvements.

*In situ*, des mesures physicochimiques ont été réalisées : température et pH.

Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière et les analyses ont été effectuées dans les 6 heures qui ont suivi le prélèvement.

### II.2 Présentation des zones d'études

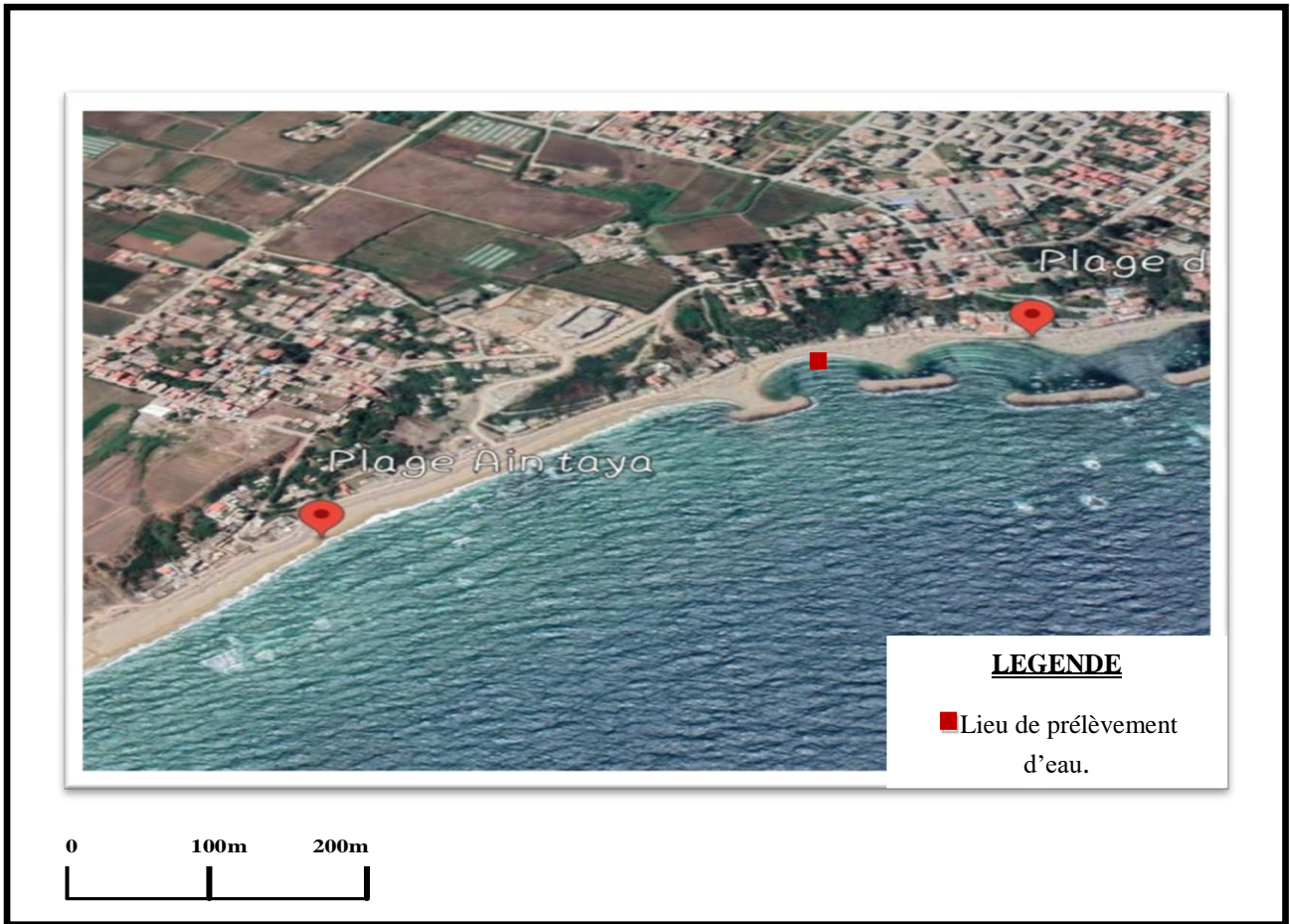
Au cours de notre travail nous avons effectué plusieurs prélèvements d'eau et de sédiment au niveau de la côte algéroise d'Est en Ouest. De ce fait le choix s'est porté sur les six plages citées ci-dessous :

#### II.2.1 Plage Flots bleus (Ain Taya)

La plage flots bleus se trouve dans la commune d'Ain Taya à 30 Km à l'est d'Alger (wilaya d'Alger).

La plage de type sableuse, s'étale sur une longueur de 600 mètres et 10 mètres de largeur. La baignade y est autorisée. Les coordonnées géographiques sont :

(3°18'23.526'' et 3°18'39.8988'' Nord. 36°47'36.2328'' et 36°47'426.0304'' Est). (Figure 05 )



**Figure 5:** Localisation de la zone d'étude plage de Ain Taya.

## II.2.2 Plage Bateau cassé

Cette plage est située dans la commune de Bordj EL Kiffan dans la wilaya d'Alger ; elle est de type sableuse et rocheuse, elle s'étale sur une longueur de 575m et sur une largeur de 50 ,5m où la baignade est autorisée.

Les coordonnées géographiques sont : (3°13'1.4376''et 3°13' 27.3036''N ord.36°46' 7.5 216''et 36°45'47.1644''Est). (Figure 06)



**Figure 6:** Localisation de la zone d'étude plage bateau cassée.

### II.2.3 Plage la Sirène

Cette plage se trouve également dans la commune de Bordj EL Kiffan. Elle est de type sableuse et rocheuse et s'étale sur une superficie de 325m<sup>2</sup>, dans cette plage t la baignade y est autorisée.

Les coordonnées géographiques sont :

(3°10'37.74''et 3°10'52.2876''Nord.36°44'52.4112''et 36°44'44.6424''Est.) .(Figure 07)



[www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)

**Figure 7:** Localisation de la zone d'étude plage la Sirène.

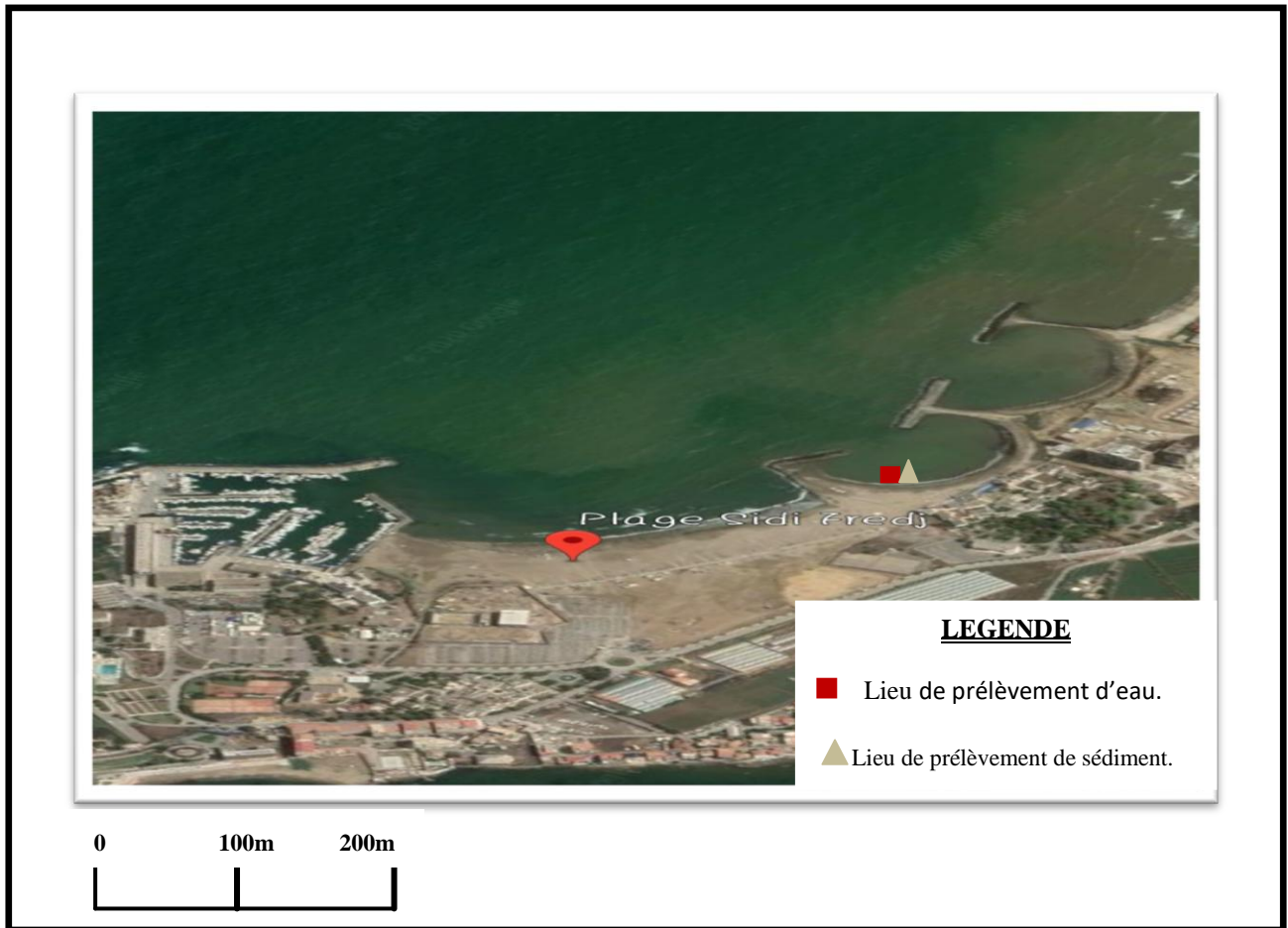
### II.2.4 Plage Hôtel Riadh (Sidi Fredj)

C'est la plage privée de l'hôtel Riadh dans la commune de Staoueli à l'ouest d'Alger (Wilaya d'Alger).

La plage est constituée de sable fin, elle s'étale sur une longueur de 100 mètres et sur une largeur de 30 mètres où la baignade est autorisée. (Figure08)

Les coordonnées géographiques sont :

(2°51'4.5324'' et 2°51'14.2308''Nord.36°45'39.024''et 36°45'32.5548''Est.)

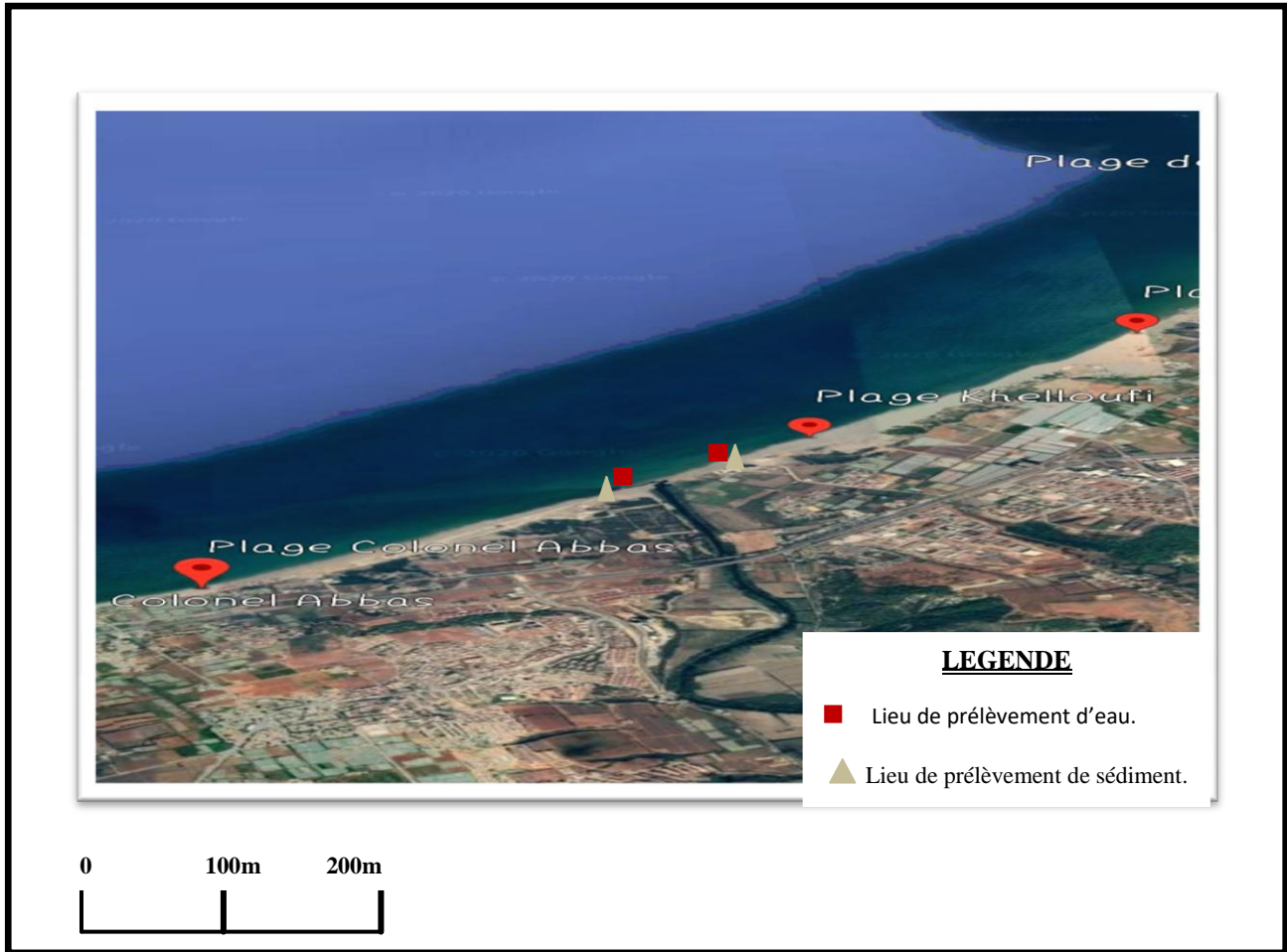


[www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)

**Figure 8:** Localisation de la zone d'étude plage de Sidi Fredj.

### II.2.5 Plage Khelloufi I

Elle est située dans la commune de Zeralda à 29Km à l'ouest d'Alger (wilaya d'Alger) ; la longueur de cette plage est de 800m, la plage est constituée de sable fin à grossier et de galets par endroits. La baignade est autorisée. Elle reçoit les déversements d'Oued Mazafran qui se trouve à environ 300 mètres du point de prélèvement. Les coordonnées géographiques sont : (2°48'28.76868''Nord et 36°41'24.050184''Est). (Figure 09)



[www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)

**Figure 9:** Localisation de la zone d'étude Colonel Abes (embouchure de Oued Mazafran) et plage Khelloufi 1.

## II.2.6 Plage Colonel Abes (Embouchure d'Oued Mazafran)

Cette plage se trouve à environ 33Km à l'ouest d'Alger et 36Km à l'est de Tipaza. Le prélèvement a été effectué au niveau de l'embouchure d'Oued Mazafran qui se trouve au niveau de cette plage d'où sa particularité (à environ 5 mètres de l'embouchure). Elle est de type sableuse (sable fin à grossier) avec des galets. C'est une plage autorisée à la baignade. Les coordonnées géographiques sont : (2°47'22.263828Nord et 36°42'2.993688''Est). (Figure 09)

## II.3 Détermination des paramètres physicochimiques

### II.3.1 Potentiel hydrogène et température

Le pH est mesuré par une électrode (méthode électrochimique.). Un pH-mètre portable a été utilisé. L'électrode est plongée directement dans l'eau de mer. Après chaque utilisation l'électrode est rincée à l'eau distillée.

## II.4 Analyse microbiologique

### II.4.1 L'eau de mer

L'analyse de l'eau de mer a été réalisée par la méthode de filtration sur membrane, c'est la méthode la plus utilisée au laboratoire, pour sa facilité de dénombrement et sa reproductibilité. L'échantillon à analyser est filtré à travers une membrane stérile quadrillée avec un diamètre de pores  $0.45\mu\text{m}$  ; qui retient les microorganismes recherchés. (**RODIER J. et al., 2009**).

La membrane est ensuite placée sur un milieu gélosé selon les bactéries recherchées ; cette méthode nous a permis le dénombrement des coliformes totaux, des coliformes thermotolérants, et les entérocoques. Durant l'incubation, des colonies se forment à la surface de la membrane, donc le nombre de colonies trouvées sera exprimé par Unité Formant Colonie dans 100ml d'eau (UFC/100ml). (**RODIER J. et al., 2009**).

#### Mode opératoire :

On a raccordé les différents composants de la rampe de filtration puis désinfecté avec de l'alcool et flambée la plaque poreuse et l'entonnoir de la rampe.

On a placé une membrane stérile de  $0.45\mu\text{m}$ , côté quadrillée vers le haut ; sur le disque poreux on ne saisissant que le bord extérieur de la membrane à l'aide d'une pince stérile puis bien placée l'entonnoir stérile.

Un volume de 100ml de l'échantillon (et ou dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) est filtré. Après filtration la membrane est transférée dans une boîte de pétri contenant le milieu adéquat selon le germe recherché :

#### II.4.1.1 Coliformes totaux

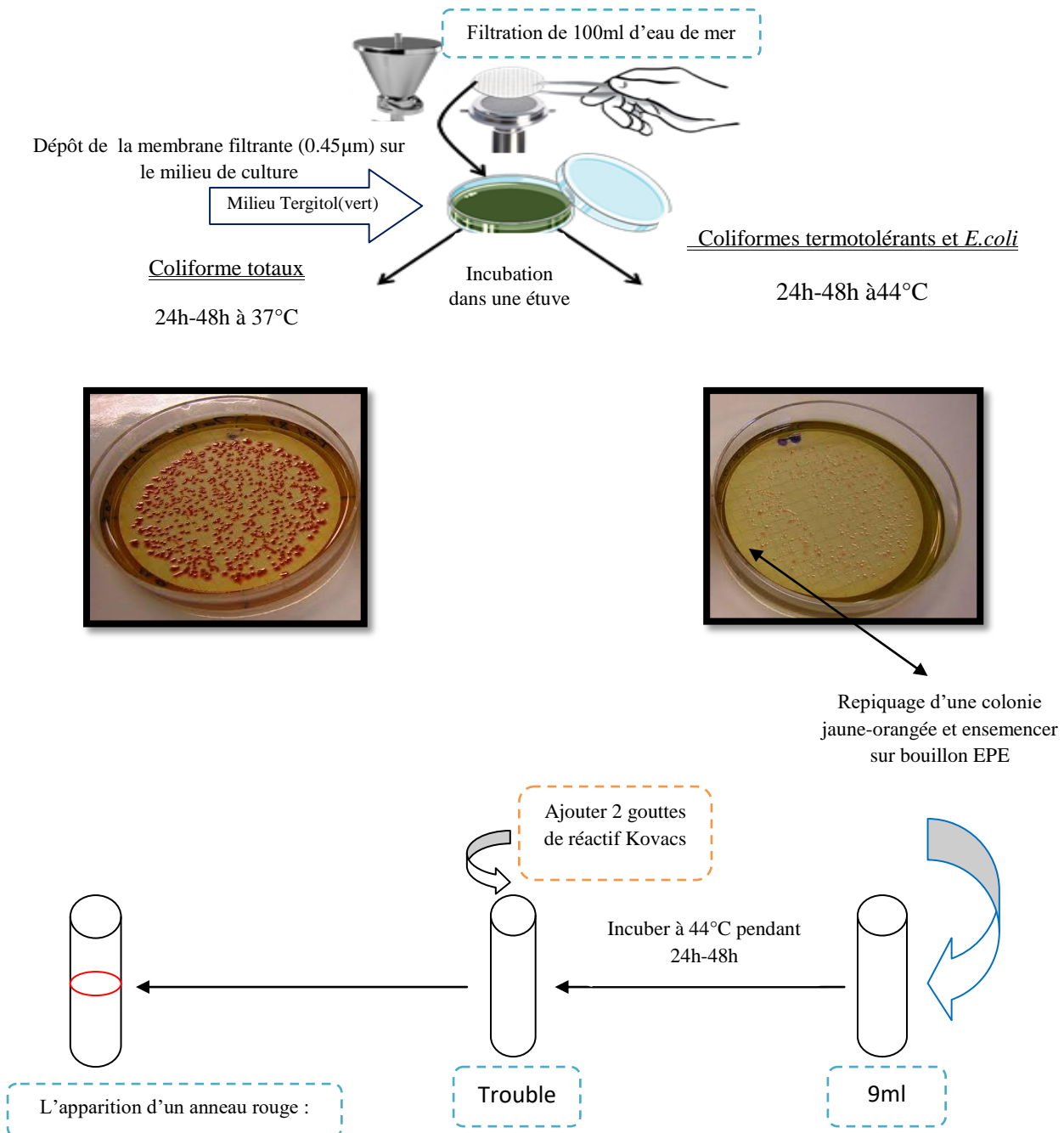
La membrane est incubée dans le milieu Tergitol à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24-48h.

#### II.4.1.2 Coliformes fécaux

La membrane est incubé dans le milieu Tergitol à  $44^{\circ}\text{C}$  pendent 24-48h.

# Matériel et méthodes

La recherche *d'Escherichia coli* a été effectuée parmi les colonies des coliformes fécaux, par la mise en évidence de la production d'indole à 44°C dans des tubes contenant de l'eau peptonée exempte d'indole (EPE) et ceci après une incubation de 24 h et l'ajout du réactif de Kovacs.



**Figure 10:** Recherche des coliformes totaux.

### II.4.1.3 Les entérocoques

La recherche des entérocoques se fait par un test présomptif puis un test confirmatif.

#### **a-Test présomptif :**

La membrane de filtration est incubée directement dans le milieu Slanetz à 37°C pendant 24-48h. La présence des entérocoques est caractérisée par des colonies rouge marron.

#### **b-Test confirmatif :**

Pour la confirmation on prend la même membrane et on la met dans le milieu BEA (gélose Bile Esculine Azide) à 37°C pendant 2h.

Si les colonies deviennent noires : on est en présence des entérocoques.

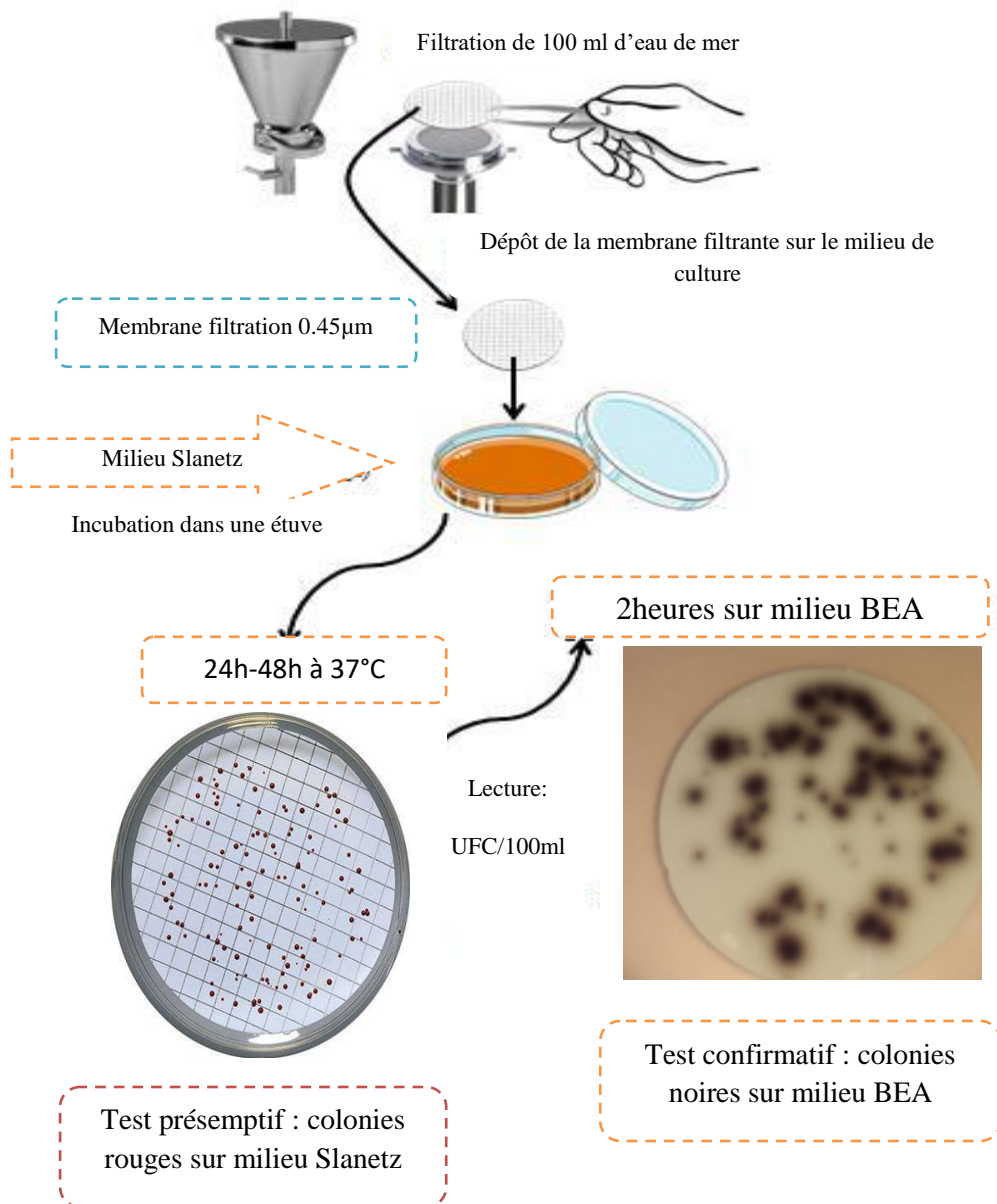
La gélose Bile Esculine Azide est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et numération des entérocoques et des streptocoques fécaux dans les produits alimentaires ainsi que dans les eaux.

La sélection des entérocoques se fait grâce à la composition de ce milieu :

**Bile** : favorise la croissance des entérocoques par l'inhibition des autres bactéries Gram positif. (BIOREFINE ,2015).

**Azide de sodium** : inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif. (BIOREFINE ,2015).

**Esculine** : l'hydrolyse de l'esculine par les entérocoques va induire la formation de glucose et d'esculétine, cette dernière va former un complexe noir de par la présence des ions ferriques présents dans le milieu. Les colonies d'entérocoques apparaitront alors incolores entourée d'un halo noir (complexe esculétine-ions ferriques). (BIOREFINE ,2015).



**Figure 11:** Recherche des entérocoques.

## II.4.2 Sédiment

Pour le sédiment on a utilisé la méthode du nombre le plus probable (NPP) pour le dénombrement des coliformes selon la norme NF T90-413. Cette méthode est basée sur la propriété commune des coliformes à fermenter le lactose dans une période de 24-48h ainsi qu'à la production de gaz dans les cloches de Durham. L'existence des germes recherchés se traduit par un trouble de liquide et un dégagement de gaz dans les cloches.

### Préparation de la solution mère :

On pèse 1g de sédiment et on le dissout dans 9ml d'eau distillée stérile.

### Préparation des dilutions :

On a préparé 3 séries de tubes contenant du bouillon lactosé bilié au vert brillant (BVBL) muni de cloche de Durham. Chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  (solution mère). Les tubes de la deuxième, troisième, et quatrième série reçoivent 1ml de la dilution  $10^{-2}$  et 1ml de la solution  $10^{-3}$  (pour la dernière dilution on jette 1ml).

L'ensemble des tubes ainsi préparé est incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24-48 h. Le nombre caractéristique formé sera lu dans la table de Mc Grady. (**Annexes**).

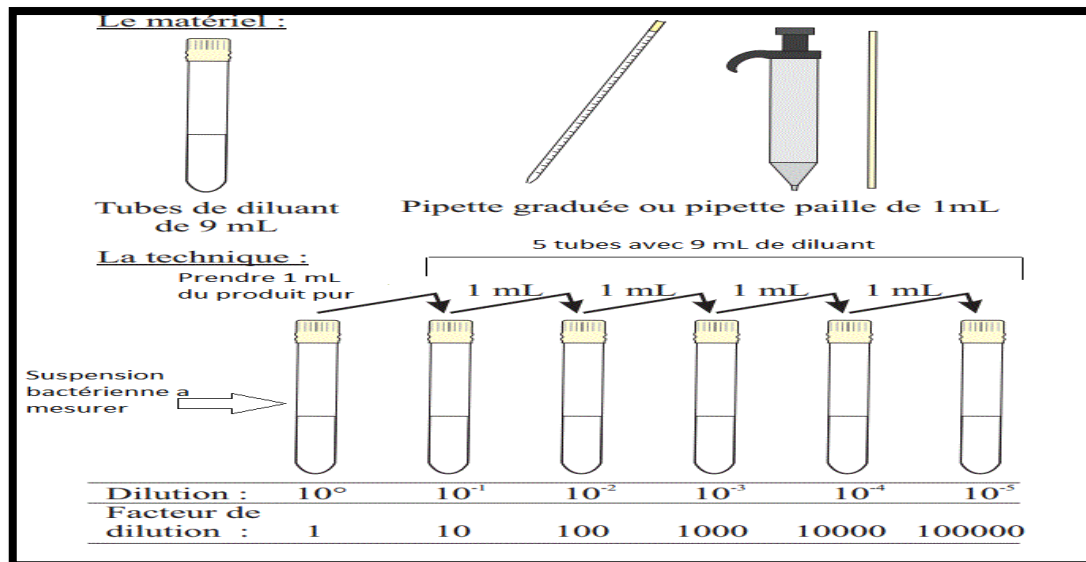


Figure 12: la méthode de dilution NPP.

Les germes recherchés :

## II.4.2.1 Coliformes totaux et fécaux

On aensemencée 4 séries de 3 tubes contenant le BLBVB de coloration verte et la cloche de Durham avec 1ml de la solution mère et des différentes dilutions ( $10^{-2}$  à  $10^{-4}$ ). Les tubes ont été incubés à 44°C pendant 24à 48h.

On a répété cette opération pour chaque station.

Les résultats positifs correspondent à la présence de trouble et la production du gaz dans les cloches de Durham (>1 /10 de volume).

Enfin on compte le nombre des tubes positifs pour chaque dilution et on fait la lecture du NPP correspondant en utilisant la table de Mc Grady(**Annexe**).

Pour rechercher *Escherichia Coli* :

On prend les tubes positifs de bouillon BLBVB et repiquer 1ml dans un bouillon Schuber puis on rajoute 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs. L'apparition d'un anneau rouge est synonyme de présence d'*E. coli*.

## II.4.2.2 Les entérocoques

### Test présomptif :

On aensemencé 4 séries de 3 tubes contenant bouillon Rothe avec 1ml de la solution mère et de ces dilutions ( $10^{-2}$  à  $10^{-4}$ ) incubé à 37°C pendant 24h. On a répété cette opération pour chaque station.

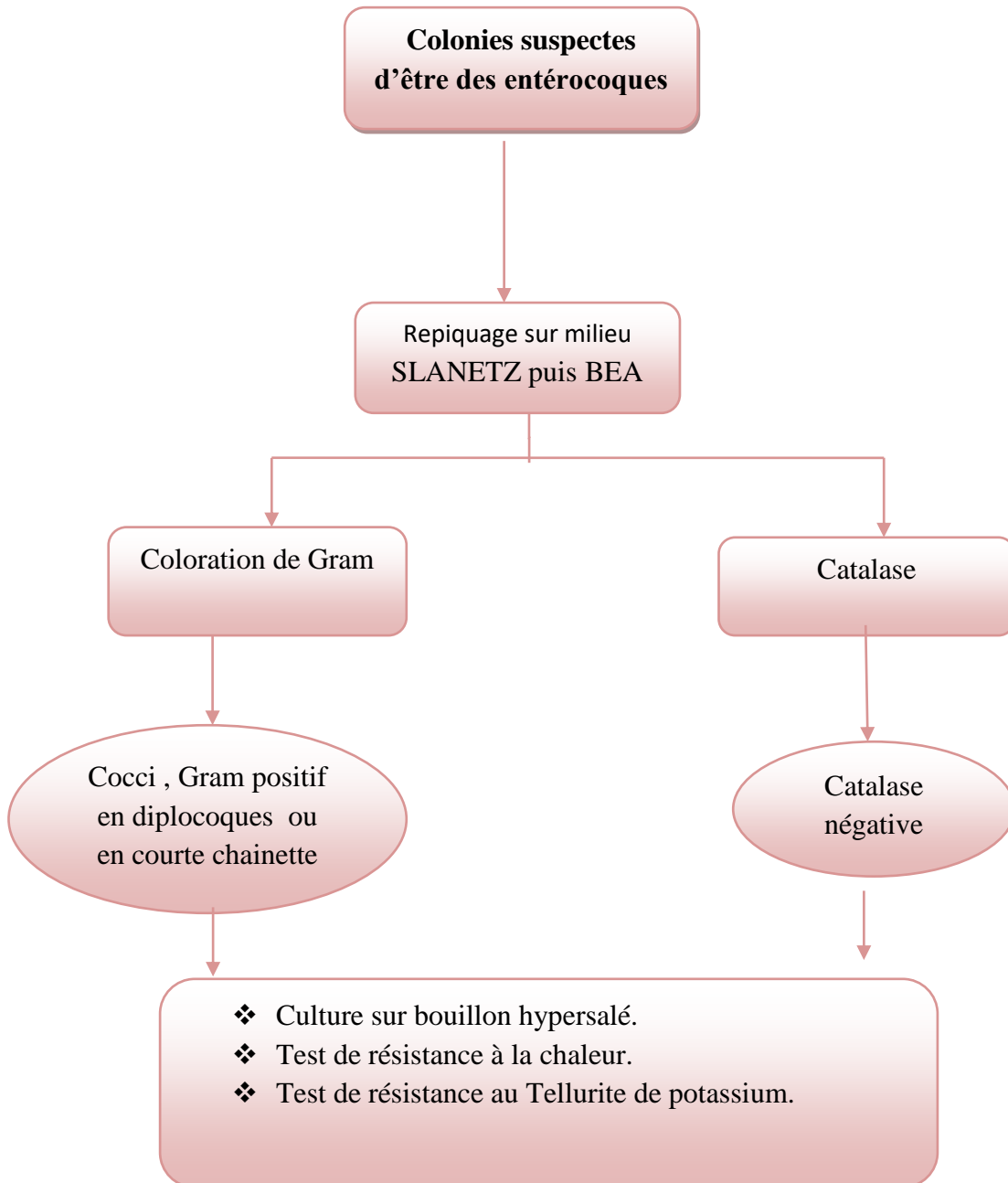
Les résultats positifs se traduisent par l'apparition de trouble.

### Test confirmatif :

On prend 1ml de chaque tube positif et on l'ensemence dans 5ml de bouillon Litsky ; l'incubation se fait à 37°C pendant 24H. Les résultats positifs se traduisent par l'apparition d'un trouble.

## II.5 Méthodes d'identification des entérocoques

Ont été fait plusieurs réisolment à partir des colonies d'entérocoques de milieu BEA pour avoir des colonies pure et afin d'identifier ces bactéries cinq tests ont été réalisés comme indiqué dans le diagramme ci-dessous.



## II.5.1 Coloration de Gram

### Principe :

La coloration de Gram est une coloration différentielle, qui permet de diviser les bactéries en deux classes : les Gram-négatifs et les Gram-positifs. (WILLEY J.M. *et al.*, 2017). Elle est principalement liée à une différence de structure chimique des parois cellulaires des bactéries. (DENIS F. *et al.*, 2012 ; WILLEY J.M. *et al.*, 2017 ).

### Technique :

#### 1. Préparation du frottis :

- Placer une goutte d'eau distillée stérile sur la lame.
- Prélever stérilement les bactéries à partir des boîtes de pétri.
- Emulsionner et étaler sur la lame avec l'anse de platine.
- Sécher la lame en dessus de 20 à 30cm de la flamme du bec Bunsen.
- Fixer à la chaleur et passer la lame 3 fois dans la flamme du bec puis laisser refroidir.

#### 2. La coloration :

- Recouvrir le frottis fixé de violet de gentiane, laisser agir 1 min.
- Rincer la lame avec l'eau distillée.
- Recouvrir avec solution de lugol, laisser agir 1 min.
- Rincer la lame avec l'eau distillée.
- Décolorer le frottis avec l'alcool à 95° pendant 30sec.
- Rincer la lame avec l'eau distillée.
- Recouvrir avec la solution de fushine et laisser agir 1 min.
- Laver à l'eau distillée. Sécher la lame avec du papier.

#### 3. Observation :

Observer à l'objectif x40 et x100 (plus une goutte de l'huile à immersion).

### Lecture :

- Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet au microscope optique.
- Les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose au microscope.

### II.5.2 Test de la catalase

#### Principe :

La catalase est une enzyme qui décompose les peroxydes toxiques pour les bactéries ; selon la réaction suivant :



Elle catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en eau avec libération d'O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O.

#### Technique :

Déposer une goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur une lame, puis mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement à partir d'une gélose avec une anse de platine.

#### Lecture :

Une catalase positive se traduit par le dégagement des bulles d'air contrairement à une catalase négative ou il ne se passe rien sur la lame.

### II.5.3 La croissance sur bouillon hyper salé

#### Principe :

La croissance en présence de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les entérocoques sont capables de croître à 6,5% de chlorure de sodium (milieu hyper salé) contrairement aux streptocoques (DA SILVA M. *et al.*, 2013).

#### Technique :

On a préparé l'eau peptonée à 6,5% de NaCl et on dépose 5ml dans chaque tube à essai. Ensemencement de 2 à 3 colonies dans ce bouillon hyper salé, l'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

#### Lecture :

La croissance bactérienne se traduit par l'apparition de trouble.

### II.5.4 Test de résistance à la chaleur

#### Principe :

La plupart des entérocoques sont résistants et capables de pousser à des températures allant de 10 à 45°C et peuvent survivent à une température de 60°C pendant 30min.

#### Technique :

Ensemencer des tubes de bouillon BHIB avec 2 à 3 colonies bactériennes. Placer les tubes dans un bain marie à 60°C pendant 30min.

Après 30 min d'incubation, refroidir immédiatement avec de l'eau du robinet puis incuber à 37°C pendant 24h. (MADJMAA O. et BOULMAIZE H., 2016).

#### Lecture :

L'apparition d'un trouble dans les tubes est synonyme de la présence d'une croissance bactérienne (résistance au traitement par la chaleur).

### II.5.5 Résistance au Tellurite de Potassium ( $K_2TeO_3$ )

#### Principe :

*Enterococcus faecalis* se différencie de la plupart des espèces d'entérocoques par la réduction du tellurite de potassium. (GROSJEAN J. *et al.*, 2017).

#### Technique :

Ensemencement des souches dans un volume de 4,5ml de bouillon BHIB additionné à 0,5ml de Tellurite de Potassium dilué au 1/250.

#### Lecture :

L'apparition d'un trouble dans les tubes indique la présence des *E. faecalis*.

## II.5.6 Identification des coliformes par la méthode des galeries API 20E

### Principe :

La galerie API 20E est un système d'identification des bacilles à gram négatif, elle comporte 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés qui sont inoculés avec une suspension bactérienne à identifier. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Biomérieux).

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.

### Technique :

#### 1. Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage et placer stérilement dans la boîte d'incubation.

#### 2. Préparation de l'inoculum :

A l'aide de l'anse de platine, une colonie bien isolée sur milieu gélosé est prélevée et mise en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

#### 3. Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes et les cupules des tests (CIT, VP, et GEL) avec la suspension bactérienne en utilisant la micropipette.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LDH, ODC, H<sub>2</sub>S et UREE en remplissant la cupule par l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 24h à 48h.

## Lecture :

Ajouter les réactifs des tests VP, TDA et IND.



**Figure 13:** Galerie API 20E.

Après codification des réactions on a un profil numérique, l'identification est obtenue on se référant à un catalogue analytique fourni par Biomérieux où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation (Biomérieux).

## II.5.7 Etude de la résistance aux antibiotiques par Antibiogramme

### Principe :

Afin de mettre en évidence la résistance bactérienne aux antibiotiques, des antibiogrammes ont été effectués sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CASFM, 2020**).

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir de colonies isolées sur milieu sélectif, avec une dilution calibrée de la bactérie à tester,ensemencées par écouvillonnage sur des boites de gélose Mueller Hinton. Cette technique consiste à déposer des disques imprégnés d'antibiotiques à la surface des boites ensemencées.

La croissance des bactéries dessine des halos d'inhibition au tour du disque d'antibiotique. La croissance bactérienne s'arrête en présence de la concentration minimale d'inhibition autour du disque d'antibiotique.

## Technique :

### 1. Préparation de l'inoculum :

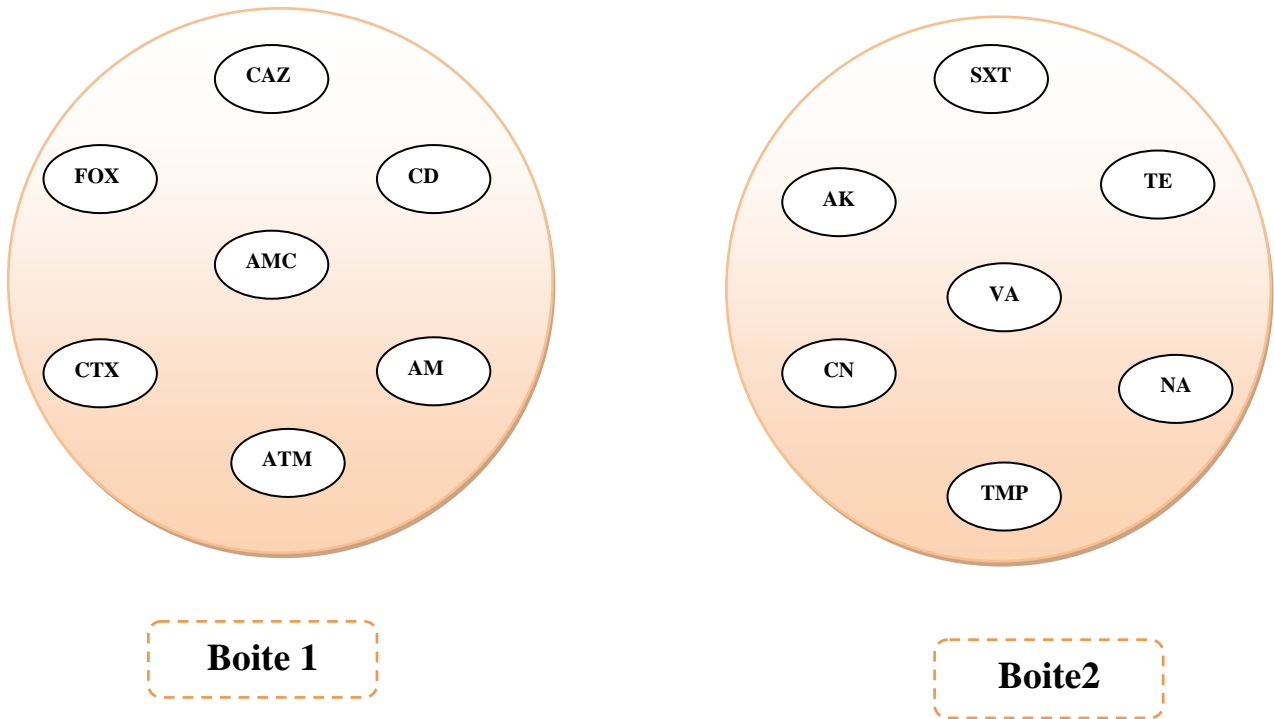
- A partir d'une culture jeune (18h-24h) sur milieu d'isolement approprié, on prélève 2 à 3 colonies bien isolées à l'aide d'une anse de platine.
- Décharger bien l'anse dans un tube contenant 5ml de l'eau physiologique stérile afin de préparer une solution bactérienne de 0,5 Mc Farland ( $10^8$  cellules /ml)
- L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

### 2. Ensemencement :

- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide.
- Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ( $60^\circ$ ), sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.

### 3. Le dépôt des disques :

- Déposer les disques d'antibiotiques (Tableau 2) à la surface de la gélose inoculée. Le contact avec la surface doit être étroit, à l'aide d'une pince stérile selon la figure (14).
- Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.
- Incuber les boîtes dans les 15min qui suivent le dépôt des disques à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18-24h.



**Figure 14:** Disposition des antibiotiques.

Les différents antibiotiques utilisés au cours de cette étude sont résumés dans le tableau(2) ci-dessous.

**Tableau 2:** les différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

La famille		Antibiotique	Abréviation	Charge du disque (mcg)
<b>B-lactamines</b>	Pénicillines	Ampicilline	AM	10
		Amoxicilline+acide clavulanique	ATM	20/10
	Céphalosporines	Céfoxime	FOX	30
		Céfotaxime	CTX	30
		Ceftazidime	CAZ	30
	Monobactame	Aztréonam	ATM	30
	<b>Glycopeptides</b>		Vancomycine	VA
<b>Macrolides</b>	Lincosamides	Clindamycine	CD	2
<b>Aminosides</b>		Amikacine	AK	30
		Gentamicine	CN	10
<b>Quinolones</b>		Acide nalidixique	NA	30
<b>Tetracyclines</b>		Tétracycline	TE	30
<b>Sulfamides</b>		Triméthoprime	TMP	5
		Triméthoprime-Sulfaméthazol	SXT	1.25/23.75

**Lecture :**

Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'une règle graduée et classer les bactéries dans l'une des catégories : sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante (R) selon les valeurs critiques. (CASFM, 2020).

# *Résultats et discussion*

## III. Résultats et discussion

Au cours de notre étude, 6 échantillons d'eau de mer et 4 échantillons de sédiments ont été prélevés et analysés. Les résultats obtenus des différentes analyses physico-chimiques et bactériologiques (eau et sédiment) sont cités ci-dessous.

### III.1 Les paramètres physicochimiques

Afin de déterminer la qualité de l'eau de mer dans les stations sélectionnées, une étude des paramètres physicochimiques a été réalisée. Les données recueillies sont résumées dans le tableau 03.

Les conditions météorologiques et hydroclimatiques ont une influence directe sur les valeurs des paramètres physicochimiques des eaux. (Le Grand H. *et al.*, 2014).

**Tableau 3:** Résultats des paramètres physicochimiques.

Stations	Heure du prélèvement	Température (°C)	pH	Vent (km/h)
S1 : Bateau Cassé	9 :20	15,7	8,07	21
S2 : Ain Taya	10 :00	15,5	8,14	21
S3 : Sirène	11 :20	16,9	8,10	34
S4 : Sidi Fredj (Riadh)	12 :30	16,6	8,14	35
S5 : Khelloufi	12 :45	15,4	8,10	34
S6 : Colonel Abes	13 :00	15,8	8,16	36

#### III.1.1 La température

La température de l'eau de surface est un paramètre saisonnier, qui joue un rôle dans la solubilité des sels et agit par des modifications légères sur le pH.

Les valeurs de la température (Tableau 03) mesurées au cours de notre étude varient entre 15.4°C à 16.7°C. Dans l'ensemble, les températures relevées sont saisonnières.

### III.1.2 Le potentiel hydrogène (pH)

Le pH est un paramètre important pour la qualité de l'eau, car il peut influencer sur les caractéristiques physico-chimiques et même bactériologiques.

Pour tous les prélèvements les valeurs du pH (Tableau 03) sont proches entre elles (de 8.07 à 8.16) et proches des valeurs des eaux méditerranéennes qui avoisinent les 8.2 -8.3.

### III.2 Analyse microbiologique

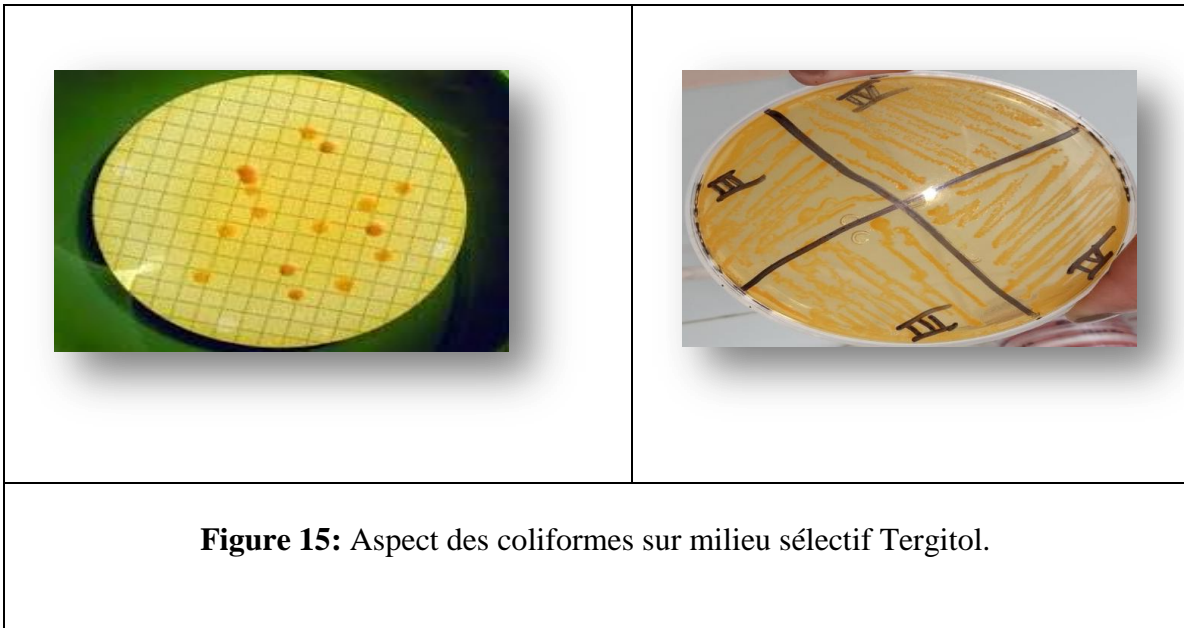
En une première étape, la qualité microbiologique des sites étudiés a été estimée par la recherche des coliformes totaux, fécaux et Entérocoques dans les échantillons d'eau et de sédiments prélevés et en deuxième étape, une collection d'entérocoques a été établie à partir des deux matrices (eau et sédiment). Elle a servi pour l'identification des souches et l'étude de leur antibiorésistance.

#### III.2.1 Résultats des analyses bactériologiques des échantillons d'eau de mer

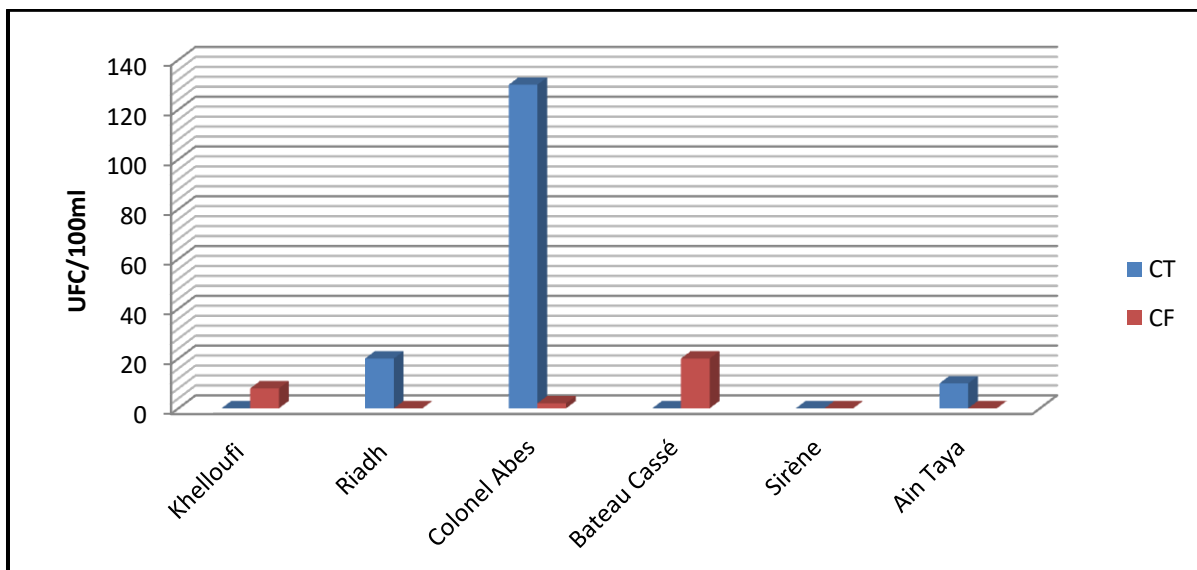
##### III.2.1.1 Les coliformes totaux et thermo tolérants

Afin de connaître la qualité de l'eau de mer des six sites étudiés, on a recherché la présence des coliformes totaux, fécaux.

Les coliformes sur milieu Tergitol apparaissent sous forme de petites colonies jaunes orangées. (Figure 15)



A partir de la (figure16), on remarque que le taux le plus élevé a été retrouvé à l'embouchure de oued Mazafran (plage Colonel Abes) avec un maximum de 130UFC/100ml tout de même ce taux est faible et ceci est probablement dû à la pluviométrie qui a exercé un effet de dilution sur l'oued mazafran qui se déverse directement et sans aucun prétraitement dans cette plage.



**Figure 16:** Variation des charges des coliformes totaux et fécaux au niveau de six plages étudiées.

Dans l'ensemble les valeurs des coliformes totaux et fécaux sont assez faibles et ne dépassent pas les valeurs guide (500 CT/100ml et 100 CF/100ml).

*E. coli* est un bon indicateur de contamination fécale des eaux, les résultats ont montré sa présence dans les plages la Sirène et Khelloufi. Ceci pourrait s'expliquer par les forts apports anthropiques durant cette période.

### III.2.1.2 La galerie API 20 E

Afin d'identifier quelques espèces des coliformes totaux et fécaux on a utilisé le système de galerie API 20E.

Les résultats ont permis d'identifier deux souches comme étant *Escherichia coli* (figure 17). L'une des souches a été retrouvée au niveau de la plage la Sirène et l'autre à la plage Khelloufi.



I : *E. coli* (99.8%)

plage Sirène



II : *E. coli* (97.9%)

plage Khelloufi

**Figure17:** Résultat d'identification par galerie API 20E.

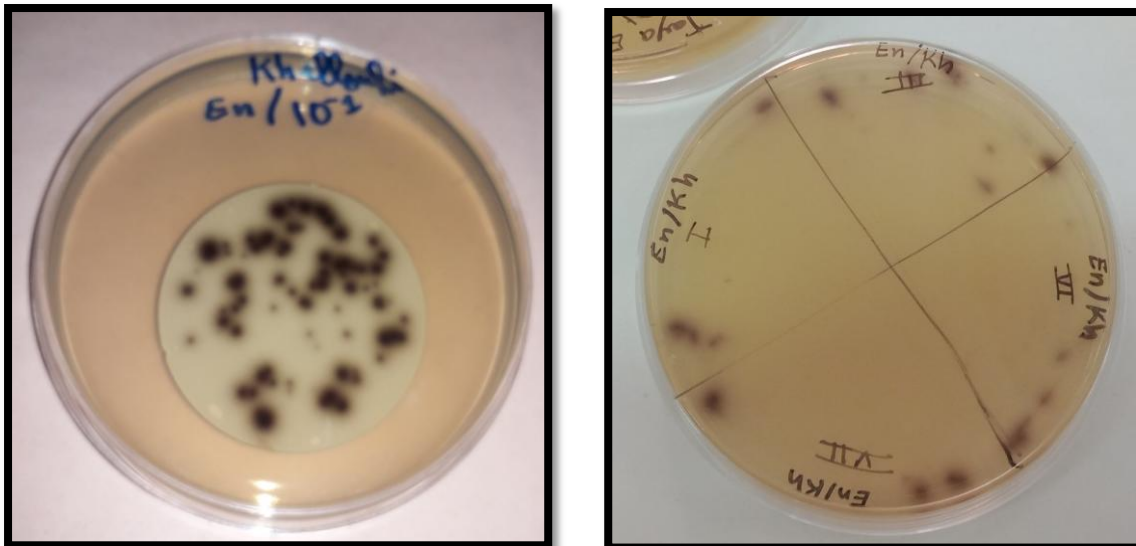
### III.2.1.3 Les entérocoques

La méthode de filtration sur membrane a été utilisée pour rechercher les entérocoques.

Les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies entourées d'un halo noir, ceci est dû à leur capacité à hydrolyser l'esculine. (Figure19)



**Figure 18:** Aspect des entérocoques sur le milieu sélectif Slanetz.



**Figure 19:** Aspect des entérocoques sur le milieu sélectif BEA après 2 heures d'incubation à 37°C.

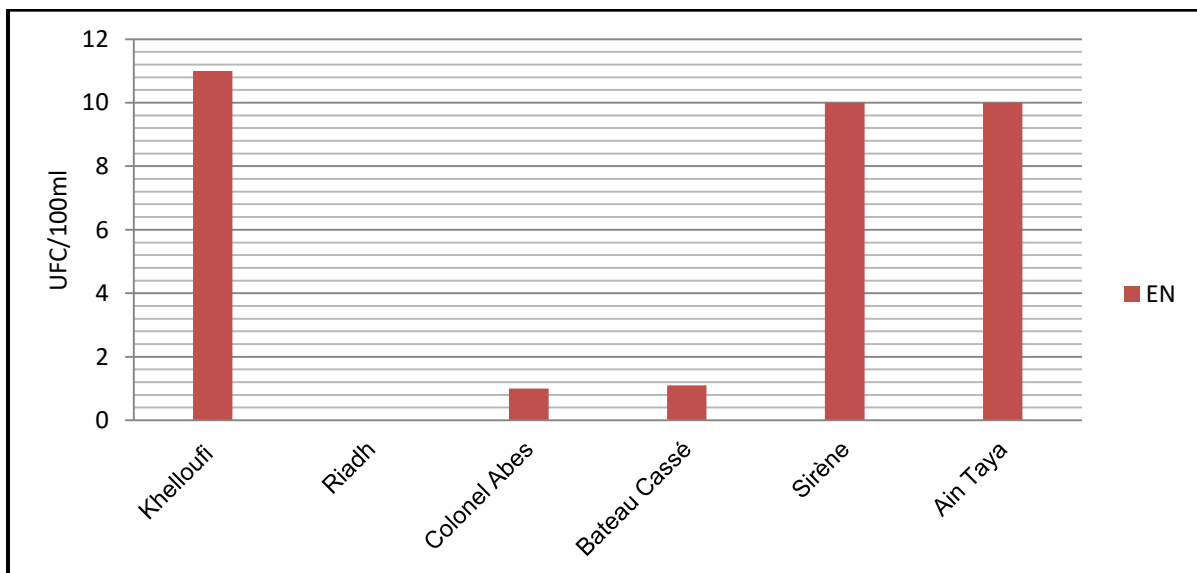
## Résultats et discussion

La figure (20) montre les résultats du dénombrement des entérocoques exprimé en Unité Formant Colonie dans 100ml d'eau analysée (UFC/100ml).

Les valeurs obtenues montrent que :

La plage Khelloufi enregistre le taux le plus élevé (11UFC/100ml), suivi par les plages de Ain Taya et la Sirène avec un taux de (10UFC/100ml). Les plages de Colonel Abes et Bateau cassé ont enregistré un taux très faibles de l'ordre (1UFC/100ml). On note l'absence totale des entérocoques au niveau de la plage Riadh (sidi fredj).

D'après les résultats obtenus, la teneur des eaux de mer en entérocoques au niveau des différentes plages est inférieure à la valeur guide ( $\leq 100$ UFC/100ml).



**Figure 20:** Variation des charges des entérocoques au niveau des six plages étudiées.

## III.2.2 Résultats des analyses bactériologiques du sédiment

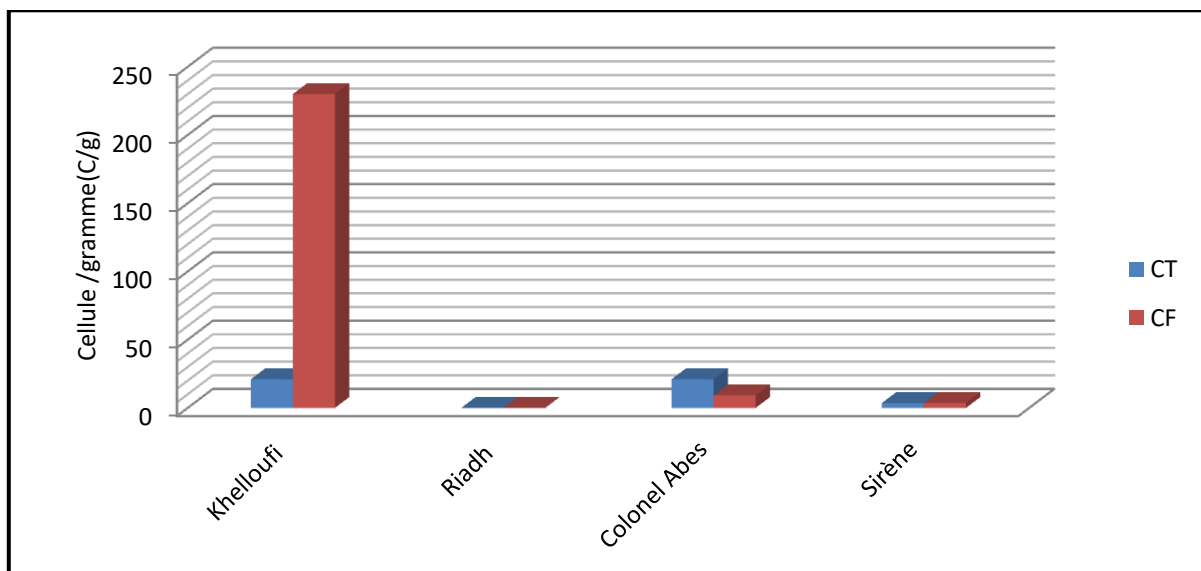
Le dénombrement des germes indicateurs au niveau du sédiment a été réalisé par la méthode du nombre le plus probable (NPP).

### III.2.2.1 Résultats de recherche des coliformes totaux et fécaux

D'après l'histogramme (figure 21), on remarque des teneurs faibles en coliformes totaux dans toutes les stations de prélèvement du sédiment. Les plus grandes concentrations ont été enregistrées au niveau des plages Colonel Abes et Khelloufi (21 CT/g) pour chacune des stations mais ces valeurs sont dans les normes (de 1 à 100 CT/g).

On note l'absence des CT dans les deux autres sites.

Concernant les coliformes fécaux on a remarqué une variation des valeurs en fonction des stations de prélèvements des sédiments ; avec (230CF/g) au niveau de la station Khelloufi (la station n'est pas loin de l'embouchure de oued Mazafran) et des valeurs de 9.6CF/g et 3.6CF/g pour les stations Colonel Abes et la Sirène respectivement. Par contre on a noté une absence totale des CF au niveau de la plage de l'hôtel Riadh, ainsi qu'une absence d'*E. coli* dans tous les échantillons de sédiment étudiés.



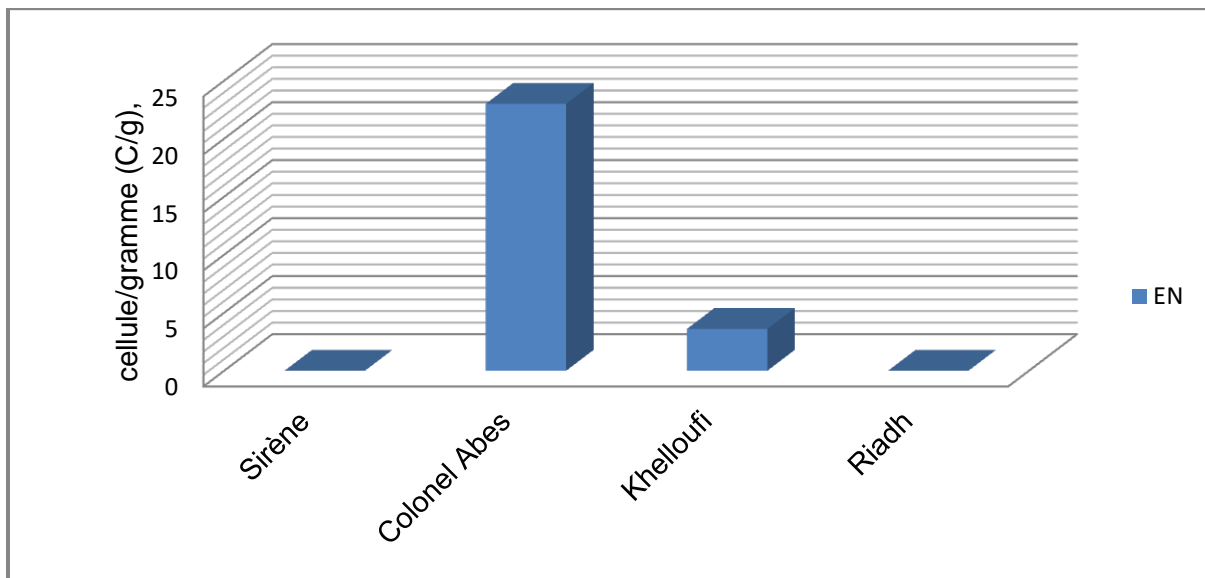
**Figure21:** Variation des charges des coliformes totaux et fécaux au niveau du sédiment.

### III.2.2.2. Résultats de recherche des Entérocoques

Le dénombrement des entérocoques au niveau du sédiment a été réalisé par la méthode du nombre le plus probable (NPP).

Les résultats obtenus (figure 22) montrent qu'il existe une variation des valeurs des entérocoques en fonction du site de prélèvement. La plus grande concentration a été retrouvée au niveau de Colonel Abes (23 EN /g) suivi par (3.6 EN/g) au niveau de la plage Khelloufi.

On note l'absence des entérocoques aux niveaux des stations la Sirène et Riadh. En effet ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les courants de sable et eaux usées apportées par Oued Mazafran sont très chargés en différents germes et ces germes se retrouvent beaucoup plus dans la colonne d'eau que dans le sédiment.



**Figure 22:** Variation des charges des entérocoques au niveau de quatre stations étudiées.

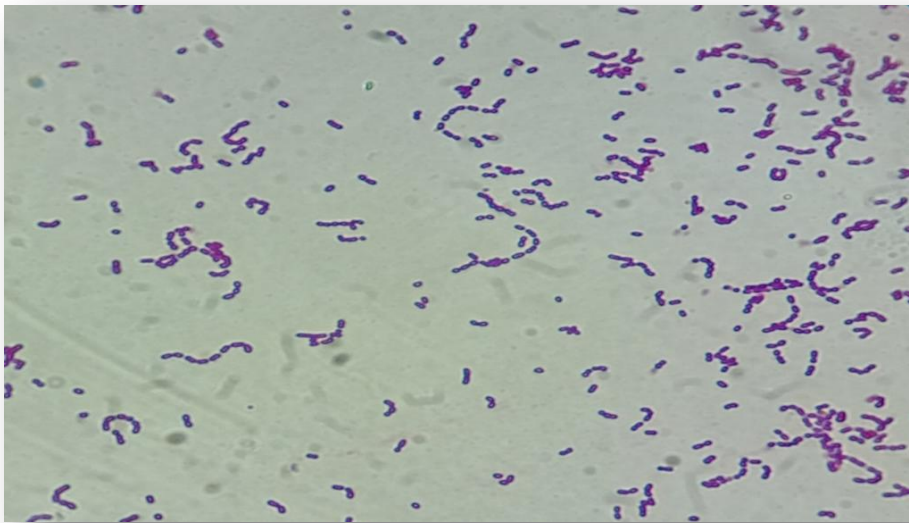
Les résultats des analyses microbiologiques des coliformes totaux, fécaux et entérocoques, ont révélés que les plages sont de bonnes qualités microbiologiques car toutes les valeurs sont inférieures à la norme Algérienne ; tout de même il faudra rechercher d'autres germes tels que les salmonelles pour une meilleure appréciation de la qualité microbiologique d'un site donné.

## III.2.3 Identification des entérocoques

Après avoir effectué les différents tests cités ci-dessous, 23 souches ont été identifiées comme étant des entérocoques.

### III.2.3.1 Coloration de Gram

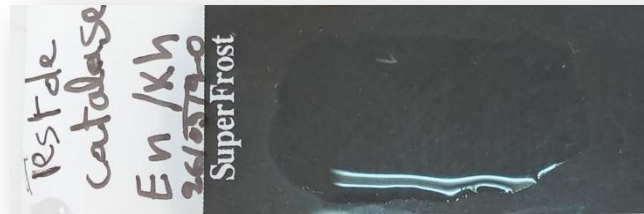
Les entérocoques apparaissent sous forme de cocci disposées en paires (diplocoque) ou en courtes chainettes de couleur violette. (Figure 23).



**Figure 23:** Aspect des entérocoques observés au microscope optique après la coloration de Gram(GrX100).

### III.2.3.2 Test de la catalase

Les résultats du test de la catalase obtenus indiquent l'absence de dégagement de gaz donc la catalase est négatif (figure 24) pour toutes les souches. Ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont soit des streptocoques soit des entérocoques fécaux.



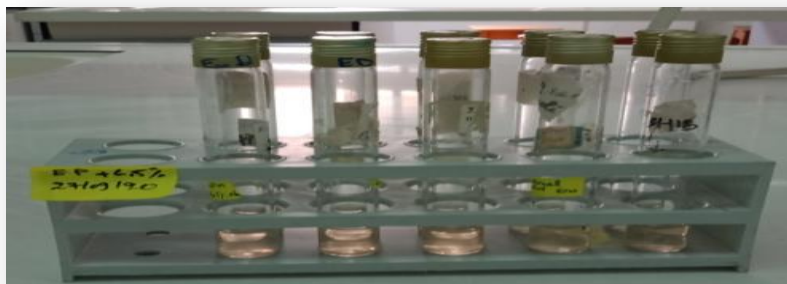
**Figure 24:** Résultat du test de la catalase.

Les streptocoques et les entérocoques possèdent les mêmes critères macroscopiques et microscopiques. Afin de distinguer entre ces deux genres, les tests suivants ont été réalisés :

### III.2.3.3 Croissance sur bouillon hypersalé

Les entérocoques sont tous capables de se développer en milieu hypersalé (6.5% NaCl) contrairement aux streptocoques. (Figure 25).

Les résultats ont montré la présence des entérocoques au niveau : Colonel Abes, Khelloufi, Ain Taya et Bateau cassé.



**Figure 25:** Résultats du test de croissance sur bouillon hyper salé.

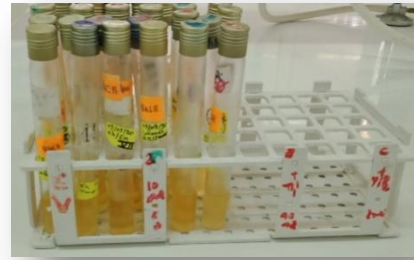
### III.2.3.4 Test de résistance à la chaleur

La plupart des entérocoques sont résistants à un traitement à la température à 60°C pendant 30min.

Les résultats montrent des troubles dans certains tubes, ceci s'explique par la présence et la croissance des entérocoques (Figure 26). Les entérocoques ont été retrouvés dans les sites suivants : Colonel Abes, Khelloufi, Ain Taya et Bateau Cassé.



Avant le test



Après le test

**Figure 26:** Résultats du test de résistance à la chaleur.

### III.2.3.5 Le test de tellurite de potassium

Le test de tellurite de potassium, permet l'identification spécifique d' *Enterococcus faecalis* car uniquement les *E. faecalis*, sont capables de se multiplier en présence de tellurite de potassium.

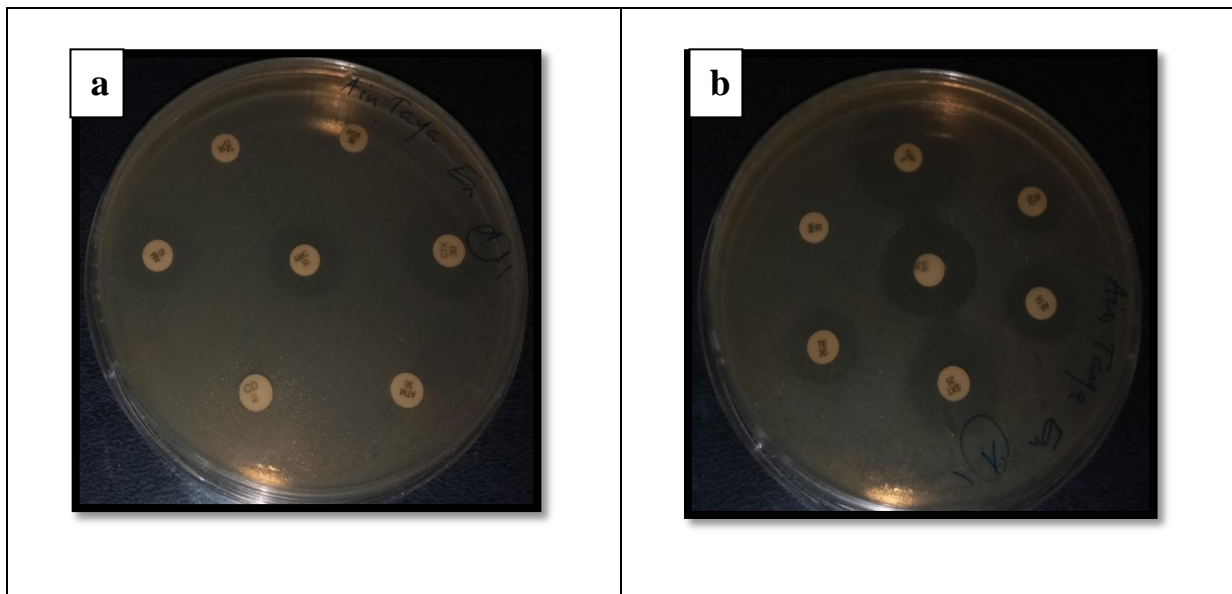
Parmi les 23 souches d'entérocoques collectées, trois souches seulement semblent être *Enterococcus faecalis*. Les trois souches ont été retrouvées au niveau de Colonel Abes et de Khelloufi.

**Tableau 4:** Tableau de synthèse des différents résultats des tests d'identification des entérocoques.

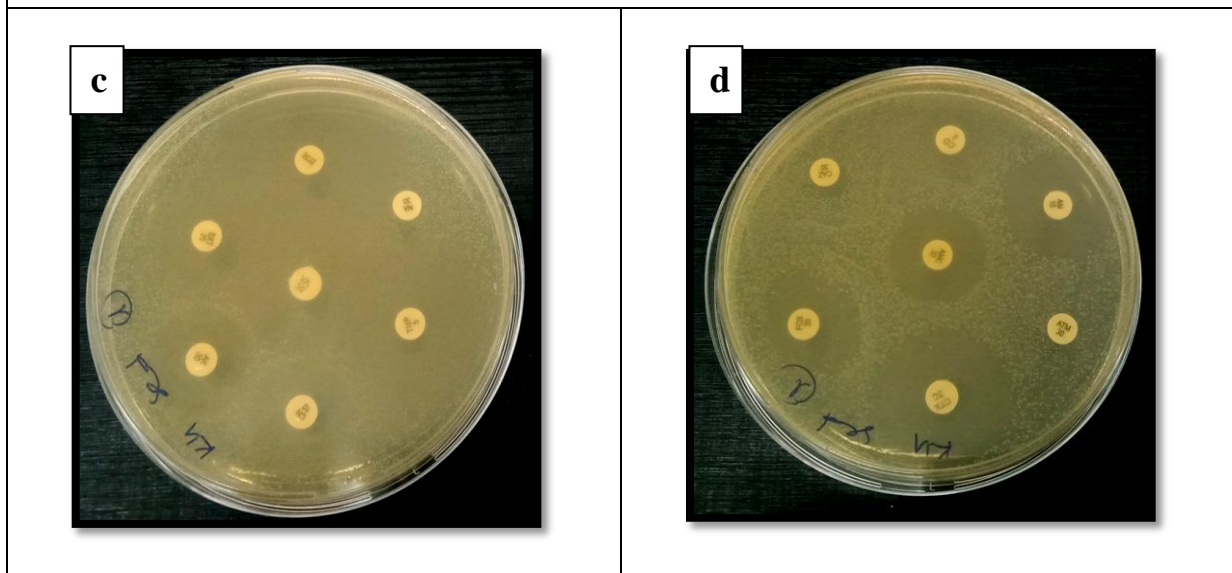
SOUCHES	Code	Coloration de Gram	Test de catalase	Test de chaleur (60°C/24h)	Test de salinité (NaCl 6.5%)	Test de Tellurite de Potassium
Khelloufi EN-Séd	E1	+	-	+	+	-
Khelloufi EN 1	E2	+	-	+	+	-
Colonel Abes Séd 1	E3	+	-	+	+	+
Khelloufi EN-Séd1	E4	+	-	+	+	-
Khelloufi EN 2'	E5	+	-	+	+	+
Khelloufi EN VI	E6	+	-	+	+	+
Colonel Abes EN3	E7	+	-	+	+	-
Bateau Cassé/EN2	E8	+	-	+	+	-
Ain Taya 2'	E9	+	-	+	+	-
Ain Taya 2''	E10	+	-	+	+	-
Colonel Abes Séd 2	E11	+	-	+	+	-
Colonel Abes EN(T)	E12	+	-	+	+	-
Ain Taya EN 1'	E13	+	-	+	+	-
Khelloufi EN II	E14	+	-	+	+	-
Khelloufi Séd 2	E15	+	-	+	+	-
Bateau Cassé/ EN 1	E16	+	-	+	+	-
Ain Taya 1''	E17	+	-	+	+	-
Colonel Abes 3	E18	+	-	+	+	-
Khelloufi III	E19	+	-	+	+	-
Khelloufi II	E20	+	-	+	+	-
Colonel Abes En4	E21	+	-	+	+	-
Colonel Abes séd2	E22	+	-	+	+	-
Khelloufi V	E23	+	-	+	+	-

## III.2.4 Résultats de l'antibiogramme

Une collection de 18 entérocoques isolés à partir de l'eau et du sédiment, a été mise en place pour l'évaluation de l'état de la résistance aux antibiotiques dans ces plages. La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats sont représentés dans les figures 27 et 28.



**Figure 27:** Profil de résistance aux antibiotiques d'une souche d'entérocoques isolée de l'eau de mer.



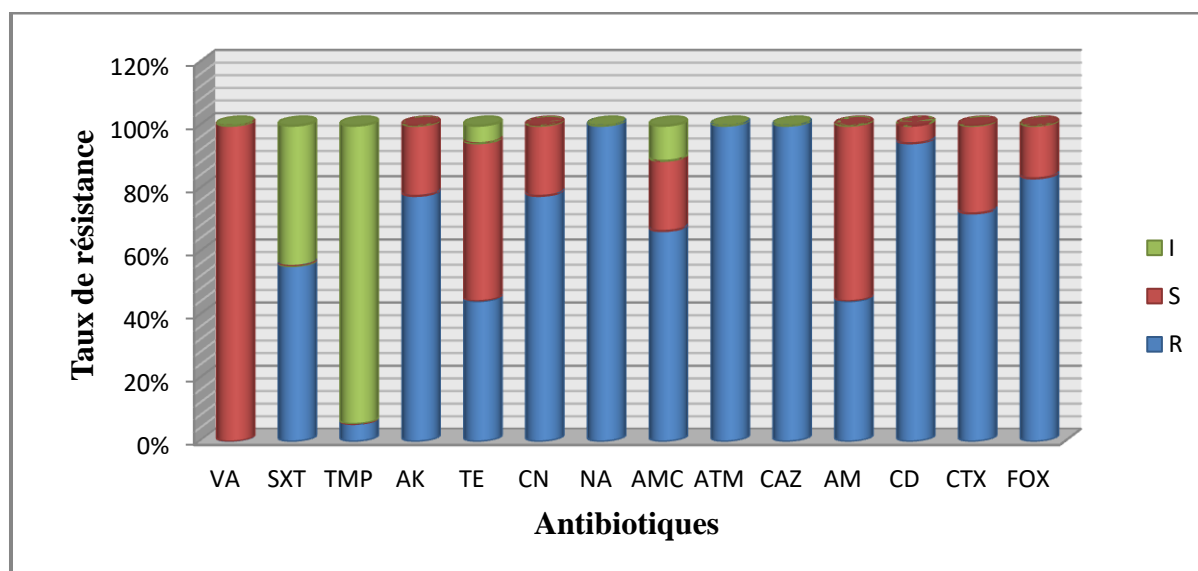
**Figure 28:** Profil de résistance aux antibiotiques d'une souche d'entérocoque isolée du sédiment.

Les résultats de la figure 29, montre une résistance totale (100%) pour l'acide nalidixique (NA) ; aztréonam (ATM) et ceftazidime (CAZ). Quant à la clindamycine (CD) et la céfoxine (FOX) les taux de résistance sont élevés et varient entre 94% et 83% respectivement. Suivi mais à un degré moindre par la gentamicine (CN) et l'amikacine (AK) avec un taux avoisinant les 78%. Le céfotaxime (CTX), amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et triméthoprimé-sulfaméthoxazole (SXT), présentent des taux de résistances de 72%, 67% et 56%, respectivement.

Une résistance relativement faible pour l'ampicilline (AM) et tetracycline (TE) avec un taux de 44%. Le taux de résistance le plus bas a été observé vis-à-vis de la triméthoprimé (TMP) (6%).

D'après la lecture de l'antibiogramme, nous avons constaté que toutes les souches d'entérocoques testées étaient sensibles à la vancomycine (VA) à 100%.

Dix-sept souches sur dix-huit présentaient un diamètre d'inhibition réduit correspondant à une résistance intermédiaire à la triméthoprimé (TMP). Huit souches à la triméthoprimé-sulfaméthoxazole (SXT), deux pour l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et une à la tetracycline (TE).



**Figure 17:** Taux de résistance et de sensibilité des 18 souches d'entérocoques vis-à-vis des antibiotiques.

Les antibiotiques aux quelles les entérocoques sont naturellement résistants ont été testées dans cette étude. Ils appartiennent aux classes des céphalosporines, macrolides, et apparentés aux inhibiteurs de synthèse des folates. (LELERCQ R.*et al.*, 2011). Il y a également les aminoglycosides (à faible concentration), les quinolones, les tétracyclines, les glycopeptides et l'ampicilline. (REHAIEM A. *et al.*, 2016).

Dans le référentiel CLSI les *Enterococcus* sont considérées comme naturellement résistants au triméthoprime (inhibiteur de la synthèse des folates) et classé dans la catégorie intermédiaire (modérément résistant), dans le référentiel CASFM, et selon ce dernier l'activité du triméthoprime n'est pas certaine sur les souches d'*Enterococcus*. (CASFM, 2017).

La triméthoprime –sulfaméthoxazole peut être actif contre les entérocoques lors de tests in vitro sur des milieux déficients en folates. Les entérocoques sont capables d'absorber le folate de l'environnement. (KRISTICHET J. C. *et al.*, 2014).

Concernant les quinolones, le taux de résistance à cette famille a connu une importante augmentation dans le milieu hospitalier en Europe (EL AMIN *et al.*, 1999). Les bactéries à Gram positif sont résistantes aux quinolones de première génération (exemple acide nalidixique). (BOURDON N., 2011). Dans notre étude, les entérocoques présentent une résistance à 100% vis-à-vis de l'acide nalidixique comme la majorité des bactéries à Gram positif.

La résistance à haut niveau aux fluoroquinolones est principalement due à différentes mutations dans les gènes *parC* et *gyr A*. (CATTOIR V., 2012). Cependant la prévalence de la résistance aux quinolones pour les souches d'*Enterococcus* est peu étudiée.

Les résistances aux macrolides sont souvent causées par des souches cliniques par l'acquisition des gènes *erm B* et *mefA*; le phénotype de résistance à cette famille d'antibiotique est beaucoup plus élevé en clinique (50-60% des souches). (LELERCQ R. *et al.*, 2011).

Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à la clindamycine bien que le mécanisme restent mal défini (KRISTICHET J.C.*et al.*, 2014). En revanche un profil de résistance indique que les isolats possèdent une résistance totale à la clindamycine, (RICE L.B. 2001). Nos résultats sont relativement similaires avec un taux de résistance avoisinant les 94%, qui

sont proches aux resultants de résistance des isolats cliniques à la clindamycine qui présente un taux de 96,29% et ces résultats sont similaires à ceux de RICE, (2001) qui rapporte un taux 95% de clindamycine. Cette résistance montre une activité médiocre des macrolides. (HAMCHACHE Z. et OUGHLICI B., 2015).

La résistance à la tétracycline chez les entérocoques est assez répandue, elle s'acquiert par un mécanisme de protection de la cible ribosomale par le gène *tet M* ou par un efflux. (GARCIA-SOLACHE M. et RICE L. B., 2014). Nos résultats indiquent une résistance chez la moitié des bactéries testées.

Les entérocoques ont un niveau modéré de résistance intrinsèque aux concentrations d'aminosides. (KRISTICHET J. C. *et al.*, 2014). Ces derniers ne sont pas efficaces sur les streptocoques et les entérocoques, mais en cas de bas niveau de résistance, il existe une synergie avec les bêtalactamines. (CHAUSSADE H. *et al.*, 2013). Les résultats montrent une résistance à la gentamicine et à l'amikacine de (78%). Dans notre étude, nous n'avons remarqué aucune synergie.

Les bêtalactamines sont des antibiotiques bactéricides. (CHAUSSADE H. *et al.*, 2013). Les entérocoques sont intrinsèquement résistants aux bêtalactamines mais l'étendue de cette résistance varie parmi les différentes classes de bêtalactamines et entre les espèces des entérocoques. (KRISTICH C.J. *et al.*, 2014).

En revanche, nos isolats étaient relativement sensibles à l'ampicilline (56%) et à Amoxicilline+ acide clavulanique (22%).

Nous n'avons retrouvé aucun cas de résistance aux glycopeptides (vancomycine) au niveau des souches d'entérocoques étudiées. Ce constat est différent de celui rapporté dans la littérature où la résistance aux glycopeptides des souches a été décrite pour la première fois en 1988. (BEN LAHLOU Y. *et al.*, 2020). Tandis que les entérocoques sont naturellement sensibles à la vancomycine et à la teicoplanine, si on excepte les deux espèces naturellement résistantes à la vancomycine *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*. (CATTOIR V. et LECLERCQ R., 2010).

En Suisse, en 2010, pratiquement 100% des *E. faecalis* isolés chez des patients hospitalisés étaient sensible à l'ampicilline et à la vancomycine. (WEISSER M. et WIDMER A.F., 2012). La résistance à la vancomycine est due à l'acquisition de la souche de l'opéron Van,

codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de précurseurs du peptidoglycane de faible affinité pour la vancomycine. (CATTOIRE V. et LECLERQ R., 2010).

*Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*, sont intrinsèquement résistants à bas niveau à cet antibiotique et portent le génotype *VanE*. (GARNIER F. *et al.*, 2002). Alors que la résistance des staphylocoques, des streptocoques et des entérocoques est rare aux glycopeptides. (CHAUSSADE H. *et al.*, 2013). Sachant que l'essentiel des espèces d'entérocoques sont résistantes à la vancomycine. (KRISTICH C.J. *et al.*, 2014). Mais cette résistance peut également se manifester dans d'autres espèces (par ex. *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*). Plusieurs gènes (*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD* et *VanE*) peuvent intervenir dans la résistance à la vancomycine. Les phénotypes *VanA* et *VanB* sont plus fréquents aux Etats Unis et le phénotype *VanC* en Europe. (WEISSER M. et WIDMER A.F., 2012).

Parmi les espèces d' *Enterococcus sp.* : *E. faecalis* est sensible aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine), pénicilline G et Amoxicilline et il est résistant aux céphalosporines, résistance de bas niveaux aux aminosides, clindamycine et fluoroquinolones. (STUKI K. *et al.* 2014).

Concernant les trois souches *E. faecalis* ; que nous avons identifié deux parmi elles sont résistantes aux aminosides (CN, AK) ; ampicillines (AM, AMC), monabactame (ATM), céphalosporines (CTX, FOX, CAZ), macrolides (CD), tetracycline (TE) et quinolone (NA) avec profil de résistances différent pour chacune d'elle. La troisième souche résiste seulement aux aminosides, quinolone, macrolides et ceftazidime.

L'accumulation de mécanismes de résistance naturelle et acquise peut rendre certaines souches de bactéries sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont alors appelées bactéries multi-résistantes. (LINA G. et CATTOIR V., 2014).

Dans notre étude nous avons trouvé que nos souches sont multi résistantes ; chaque souches avec un profil de résistance différent. En effet les souches avaient accumulé des résistances de 3 à 5 classes d'antibiotiques.

Alors que les entérocoques peuvent par ailleurs facilement acquérir des résistances supplémentaires par mutations ( $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones, rifampicine, acide fusidique, linezolide) ou transferts de gènes (aminosides, glycopeptides, macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, linezolide). (LINA G. et CATTOIR V., 2014).

**Tableau 5:** Profil de résistance aux antibiotiques pour chaque souche.

Code Souches	Profil de résistance
E1	SXT-TMP-AK-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E2	SXT-AK-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-CD-CTX-FOX
E3	AK-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E4	NA-ATM-CAZ-CD
E5	SXT-AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E6	SXT-AK-CN-NA-ATM-CAZ-CD
E7	NA-ATM-CAZ-CD-FOX
E8	SXT-AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E9	AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CTX-FOX
E10	AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-CD-CTX-FOX
E11	AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-CD-CTX-FOX
E12	NA-ATM-CAZ-CD-FOX
E13	STX-AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E14	SXT-AK-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E15	NA-ATM-CAZ-CD
E16	SXT-AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-CD-CTX-FOX
E17	SXT-AK-TE-CN-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX
E18	SXT-AK-NA-AMC-ATM-CAZ-AM-CD-CTX-FOX

## Résultats et discussion

**Tableau 6:** Résultats de la résistance des souches d'entérocoque isolées aux différents antibiotiques. (R: résistant, I: intermédiaire, S: sensible, m: mutants, le diamètre est en mm)

SOUCHE S	VA	SXT	TMP	AK	TE	CN	NA	AMC	ATM	CAZ	AM	CD	CTX	FOX
E1	20	0	20+m	8	27	8	0	14	0	0	16	12	18	8
	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E2	23	19	21	10	32	9	0	13	0	0	17	0	13	8
	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
E3	22	24	30	9	16	11	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	I	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E4	26	22	25	18	36	20	0	20	0	0	22	0	27	24
	S	I	I	S	S	S	R	I	R	R	S	R	S	S
E5	20	20	26	10	12	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E6	23	20+m	26+m	11	36	10	0	20	0	0	22	0	24	23
	S	R	I	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S	S
E7	25	26	29	20	30	20	0	21	0	9+m	25	13	28	18
	S	I	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R
E8	18	16+m	22+m	7	10	8	0	16	0	0	14	11	20	0
	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E9	26	25	30	14	10	8	0	15+m	0	0	16+m	40	13	17+m
	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
E10	26	23	25	12	8	9	0	10	0	0	36	18+m	11	0
	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
E11	26	21	28	12	12	10	0	0	0	0	20+m	0	0	0
	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
E12	24	23	32	21	40	20	0	23	0	0	27	12	30	16
	S	I	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R
E13	20	18	24	13	13	12	0	13	0	0	12	18+m	18	0
	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E14	20	16	20	8	25	9	0	10	0	0	13	8	14	10
	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E15	26	22+m	28	20+m	35+m	20+m	0	24+m	0	0	26+m	15+m	30+m	23+m
	S	I	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S
E16	20	18+m	22+m	9	12+m	8	0	12	0	0	16	12+m	16	18+m
	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
E17	20	15	23	11	11	12	0	13	0	0	13	0	18	0
	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E18	18	15	23	24	26	20	0	16	0	0	17	8	19	11
	S	R	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R

# *Conclusion*

## Conclusion

L'objectif du travail a été l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques isolés du milieu marin à partir de plusieurs plages dont certaines sont exposées à d'importants apports anthropiques.

Pour l'analyse de l'eau, 6 stations ont été choisies contre 4 stations pour l'analyse du sédiment. Tous nos résultats ont été comparés aux normes Algériennes en vigueur. Les résultats des analyses microbiologiques des coliformes totaux et fécaux et entérocoques, ont révélé que les plages étudiées sont relativement de bonnes qualités.

Concernant l'analyse de l'antibiorésistance chez des souches d'entérocoques isolées à partir de ces sites d'études. Les résultats ont montré:

- Des taux de résistance relativement élevés aux différents antibiotiques testés. Cette résistance est intrinsèque vis-à-vis de certains antibiotiques comme les céphalosporines, les aminosides, la clindamycine, la triméthoprim - sulfaméthozole et peut être acquise pour d'autre antibiotiques. Ceci est probablement dû à la flexibilité de leur génome ainsi que leur capacité d'échange de matériel génétique. (AGUILAR-GALVEZ A. *et al.*, 2012).
- Presque toutes les souches testées révèlent des multi résistance aux antibiotiques.
- Par ailleurs, toutes les souches ont présenté une sensibilité à une molécule très importante en clinique : la vancomycine. Donc on note l'absence de (ERV): entérocoque résistant à la vancomycine.

Au vue de ces résultats, nous pouvons dire que les apports anthropiques ont un rôle dans le maintien et la dissémination de la résistance aux antibiotiques des bactéries dans l'environnement marin.

En perspective et en continuité de ce travail il serait intéressant d' :

- ✓ Augmenter le nombre de prélèvement afin de constituer une importante collection bactérienne d'entérocoques.
- ✓ Etudier les profils d'antibio-résistances d'un nombre important de souches.
- ✓ Caractériser les mécanismes de résistance chez ces souches.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

**AGUILAR-GALVEZ A., DUBIO-DAUPHIN R., DESTAIN J.,CAMPOS D., THONART P,(2012)** .Les entérocoques :avantages et incovénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*p 67-76.

**AMINOT A. ,KEROUEL R,(2004)**.Hydrologie des écosystèmes marins :paramètres et analyses(méthodesd'anlyseenmilieumarin).France:EdutionQUAE ,2007,Cemagref,Cirad,Ifremer,Intra .[enligne].[consultéle22/06/2020].disponible sur le web : [http ://ww w.lesenfants .fr/livre/499220](http://www.lesenfants.fr/livre/499220) . 188 p .

**ARIAS C.A., MURRAY B.E, (2012)**. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *microbiology*, vol 10 , avril 2012.266-278 p.

**AYAD A, (2016)**. Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien.Thèse de doctorat.Microbiologie. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid ,139 p.

### B

**BEN LAHLOU Y., GILDAS COMLAN A. , MALEB A., et al., (2020)**.Epidemiologie et profil de resistance des bacteries a gram positif a l'hopital militaire d'instruction mohammed v de rabat, maroc. *Journal marocain des sciences médicales* 2020, tome 22 ; n°2.p 20-24.

**BENHEDANE NÉE BACHTARZI N, (2012)**. Qualite microbiologique du lait cru destine a la fabrication d'un type de camembert dans une unite de l'est algerien.Mémoire de Majistere.Biotechnologie alimentaires.Constantine : Université Mentouri, 123 p.

**BERTRAND B., HUYS G., YDE M., et al., (2005)**. Detection and characterization of tet(M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. *Journal of Medical Microbiology* (2005), 54.p 1151–1156.

**BIOREFINE ,(2015)** . Optimisation du dénombrement des entérocoques intestinaux dans les matières fertilisantes et les supports de culture ou leurs matières premières.Document non publié.France : BIOREFINE.

**BOEHM A.B., SASSOUBRE L.M, (2014)**. Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. *enterococci : from commensals to leading causes of drug resistant infection* 2014.p 101-121.

## Références bibliographiques

---

**BOURDON N, (2010).** Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques en France. *Infections bactériennes –antibiotiques. Journal des Anti-infectieux* (2011) ,vol 13.p 2-11.

**BOUTEFNOUCHET S.,CHAMPY P.,GIRARD C., et al.,(2020).** Pharmacognosie : Obtention et propriétés des substances actives médicamenteuses d'origine naturelle :Le cour, Exercices courgite). France :Elsevier Health Sciences,18 aout 2020.[en ligne].[consulté le 13/07/2020].Disponible sur le web : <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/les-cours-de-l2-m2-pharma-pharmacognosie> . 504 p.

**BROWN D.F.J.,et al.,(2008).** Non-susceptibility trends among enterococci and non-pneumococcal streptococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008).vol 62, Suppl. 2.p ii75–ii85. doi:10.1093/jac/dkn354.

**BUXERAUD J., FAURE S, (2016).** Les antibiotiques divers ; Actualités pharmaceutiques. Supplément formation au n° 558, 3eme trimestre 2016.

**BYAPPANAHALLI M.N., NEVERS M.V., KORAJKIC A.,et al., (2012).** Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.p 685–706. <http://mmb.asm.org/>

### C

**CARON W.P.,MOUSA S.A,(2010).** Prevention strategies for antimicrobial resistance: a systematic review of the literature. *Infection and Drug Resistance* 2010.vol 3. 25–33 p.

**CASADEVALL A., PIROFSKI L,(2001).** Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 2001.vol 184.p 337–344.

**CASFM ,(2013).**Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.Document non publié.France :CASFM.

**CASFM ,(2020).**Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.Document non publié.France :CASFM. [www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org).

**CATTOIR V., LECLERCQ R,(2010).**Les entérocoques résistants aux glycopeptides.*MEDCINESCIENCES* 2010.vol 26.p 936-942.

**CATTOIR V, (2012).**Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance.L'antibiogramme et son interpretation phenotypique en 2012.*Revue Francophone des Laboratoires* 2012,n°445.p 79-87.

**CAVALLO J.D., FABRE R., JEHL F.,et al.,(2004).** Bêtalactamines. *EMC-Maladies Infectieuses* 1 (2004) .p 129–202.

## Références bibliographiques

---

**CAVALLO J.D., MERENS A, (2007).** Spectre d'activité antibactérien d'un antibiotique et catégorisation clinique. *Pathologie Biologie* 56(2008).p 300-304.

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

**CEAEQ, (2015).** Centre d'expertise en Analyse Environnementale du Québec : Recherche des coliformes totaux et de *Escherichia coli* avec le milieu de culture Colilert . Document non publié. Québec :CEAEQ.

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

**CELIBERTO L.S., BEDANI R., DEJANI N.N., et al.,(2017).** Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175935>.

**CHAUSSADE H., SUNDER S., BERNARD L.,et al.,(2013).** Les médicaments antibiotiques en urologie. *Progrès en urologie*(2013).vol23.p 1327-1341.

**CLSI, (2017).** Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document non publié. USA : CLSI. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).

**COURVALIN P,(2006) .** Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases* 2006, vol 42.p 25-34.

**CYBULSKA K., KRZYŚKO-LUPICKA T, (2020).** Antibiotics resistance in *enterococcus* isolates from poultry waste. *ecol chem eng s.* 2020.Vol 27(2). p 305-316.

### D

**DA SILVA N., TANIWAKI M-H., JUNQUEIRA V-C.A., et al.,(2013).** Microbiological Examination Methods of food and water. New York(USA):CRC Press.[en ligne].[consulté le 07/10/2020]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/330421759\\_Microbiological\\_Examination\\_Methods\\_of\\_Food\\_and\\_Water\\_A\\_Laboratory\\_Manual\\_2nd\\_Edition](https://www.researchgate.net/publication/330421759_Microbiological_Examination_Methods_of_Food_and_Water_A_Laboratory_Manual_2nd_Edition) .484 p.

**DAUVERGNE E,(2018).** Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer (France). Mémoire de Master. Microbiologie Environnementale et sanitaire. France : Université de Lorraine, 56 p.

## Références bibliographiques

---

**D'ELBEE J,(2016).**Memento de planctonologie marine.Propriétés physico-chimiques de l'eau de mer. France :Edition Quae2016.[en ligne].[consulté le 09/10/2020].Disponible sur le web : <https://www.quae.com/produit/1395/9782759224159/memento-de-planctonologie-marine> .528 p.

**DELARRAS C,(2010).** Surveillance Sanitaire et microbiologique des eaux .2<sup>o</sup>édition.Paris (France) : Lavoisier .[en ligne].[consulté le 25/09/2020]. Disponible sur le web : <https://www.lavoisier.fr/livre/environnement/surveillance-sanitaire-et-microbiologique-des-eaux-2-ed/delarras/descriptif-9782743012113>. 588 p.

**DELARRAS C ,(2014).**Pratique en microbiologie de laboratoire :Recherche de bactéries et de levures moisissures. Paris (France) : Lavoisier .[en ligne].[consulté le 26/09/2020]. Disponible sur le web : <http://www.lavoisier.eu/books/life-sciences/pratique-de-microbiologie-de-laboratoire/delarras/description-9782743015657> .800 p.

**DENIS F.,et al.,(2011).**Bacteriologie Medicale :techniques usuelles.2<sup>o</sup>Edition.France : Elsevier Masson,30janv.2012.[en ligne].[consulté le 18/08/2020] disponible sur le web : <https://www.elsevier.com/books/bacteriologie-medicale/9782294096686> . 640 p.

**DENIS F.,et al.,(2016).**Bactériologie médicale.3<sup>o</sup> édition.France :Elsevier Masson.[en ligne].[consulté le 19/08/2020].Disponible sur le web : [https:// www .unitheque .com / bacteriologie-medicale/elsevier-masson/Livre/98438](https://www.unitheque.com/bacteriologie-medicale/elsevier-masson/Livre/98438). 592 p.

**DEVRIESE L.A., Pot B., VAN DAMME L., et al.,(1995).** Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. International Journal of Food Microbiology 26 (1995) .187-197 p.

**DINOS G.P,(2017).** The macrolide antibiotic renaissance.British Journal of Pharmacology (2017),vol :174.p 2967-2983.

**DROMIGNY E,(2011).**Les critères microbiologiques des denrées alimentaires:Réglementation-Agents microbiens-Autocontrôle.France :Lavoisier (2011).[en ligne].[consulté le 11/08/2020]. Disponible sur le web : <http://www.lavoisier.eu/books/food-science/les-criteres-microbiologiques-des-denrees-alimentaires/dromigny/description-9782743013974> . 509 p.

### E

**EDBERG S.C., RICE E., et al., (2000).** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology 2000, vol 88. p 106-116.

## Références bibliographiques

---

**EL AMIN N. ,JALAL S., WRETLIND B,(1999).**Alterations in GyrA and ParC Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecium*.Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr.1999.p 947-949.

**ELDAR A. , GHITTINO C., ASANTA L.,et al.,(1996).** *Enterococcus seriolicida* Is a Junior Synonym of *Lactococcus garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. Current microbiology. vol. 32 (1996). p 85–88.

**ELSAS J.D.V., SEMENOV A.V., et al.,(2011).** Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. International Society for Microbial Ecology 2011) 5.p 173–183.

**ENNAHAR S., YIMIN C,(2005).** Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2005), vol 55.589–592 p.

### F

**FÀBREGA A., MADURGA S.,et al.,(2009).** Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microbial Biotechnology (2009).vol 2(1), p 40–61.

**FERNANDES P., MARTENS E,(2016).**Antibiotics in Late Clinical Development.Biochemical Pharmacology (2016).

**FOULQUIE MORENO M.R. , SARANTINOPOULOS P. ,et al.,(2005).** The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology 106 (2006), p 1 – 24.

**FRANZ C. , HOLZAPFEL W.H., STILES M.E,(1999).** Enterococci at the crossroads of food safety? . International Journal of Food Microbiology 47 (1999) .1–24 p.

**FRANZ C.,HUCH M., ABRIOUEL H.,et al.,(2011).**Enterococci as probiotics and their implications in food safety.International Journal of Food Microbiology.vol 151(2011).p 125-140.

**FURLANETO-MAIA L. et al., (2014).**Antimicrobial Resistance in *Enterococcus sp* Isolated from Soft Cheese in Southern Brazil.Advances in Microbiology,2014.p 175-181.

### G

**GARCIA-SOLACHE M., RICE L.B,(2019).** The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. Clinical Microbiology Reviews 2019.Vol 32.p 1-28.

**GARNIER F. , MARIANI-KURKDJIAN P. , NORDMANN P.,et al.,(2002).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylocoques et d'entérocoques isolées en pédiatrie. Médecine et maladies infectieuses, vol 32 (2002). p 432–438.

## Références bibliographiques

---

**GODREUIL S., MARCHANDIN H., BOULIER A., et al.,(2007).** Dépistage des entérocoques résistants aux glycopeptides : six ans d'étude dans trois services de réanimation au CHU de Montpellier. *Pathologie Biologie*.vol 55 (2007).p 418–423.

**GROSJEAN J., et al.,(2017).** Bactériologie et Virologie pratique.3<sup>e</sup>édition révisée .Paris(France) :De boeck Supérieur. [en ligne].[consulté le 08/10/2020]. Disponible sur le web :<https://www.unitheque.com/bacteriologie-virologie-pratique/de-boeck-superieur/Livre/103839.292> p.

### H

**HAMCHACHE Z., OUGHLICI B, (2015).** Isolement, identification et caractérisation des entérocoques multirésistants isolés au CHU de Bejaia(Bejaia).Mémoire de master.pharmacologie moléculaire.Bejaia : Université A. MIRA.p 48.

**HAMMERUM A.M, (2012).**Enterococci of animal origin and significance for public health.*Clinical Microbiology and Infection* 2012.

**HEBERT M. L, (2008).** Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*.Thèse de doctorat. Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.France : Université de Caen/basse-Normandie.158 p.

**HOOPER D.C., ACOBY G.A,(2015).**Mechanisms of drug resistance : quinolone resistance. *Ann .N. Y. Acad Sci.* vol 1354(2015),p 12-31.

### I

**ISNARD C,(2017).***Enterococcus spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques.* Thèse de doctorat.Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.France : Université de Caen/basse- Normandie .297 p.

### K

**KACIMI A., OUAZZI T, (2017).**Caractérisation phénotypique des souches d'entérocoques isolées à partir des produits alimentaires.Mémoire de Master. Microbiologie appliquée.Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri. 88 p.

**KATEETE D.P., EDOLU M., KIGOZI E., et al.,(2019).** Species, antibiotic susceptibility profiles and van gene frequencies amongenterococci isolated from patients at Mulago National Referral Hospital in Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases* 2019.vol 19. 9 p.

**KOHANSKI M.A.,DWYER D.J., COLLINS J.J,(2010).**How antibiotics kill bacteria : from targets to networks.*Microbiology* (2010).volume 8.p 423-435.

**KRISTICH C.J., RICE L.B., ARIAS C.A,(2014).** Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. *Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance*(2014). p 1-62.

## Références bibliographiques

---

### L

**LANOTTE .P, MEREGHETTI P.,QUENTIN R,(2012).** Démarche de l'examen bactériologique. Bactériologie médicale Techniques usuelles (2012).p 5-33.

**LEBRETON F., WILLEMS R., GILMORE M.S,(2014).** *Enterococcus* Diversity,Origins in Nature ,and Gut Colonization.Enterococci : From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection 2014.p 1-59.

**LEBRETON F.,MANSON A.L.,SAAVEDRA J.T.,et al.,(2017).**Tracing the Enterococci from Paleozic Origins to the Hospital Cell.vol 169.p 849-861.

**LECLERCQ\* R,(2001)** .Faut-il identifier les entérocoques,et comment ?. La lettre de l'infectiologie-Tome XVI-n°7-septembre2001.p 217-222.

**LECLERCQ R., CANTON R. , BROWN D. F. J.,et al.,(2011).**EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clinical Microbiology and Infection 2011.

**LE GRAND H., et al.,(2014).**Suivi de la qualite physico-chimique de l'eau de mer de la zone sud du lagon de Nouvelle-Caledonie.Document non publié. Nouvelle-Caledonie :suivi physico-chimique.

**LINA G., CATTOIR V,(2014).**Les bactéries à Gram positives multirésistantes : probabilités de résistance ? Que craindre ?.*Bull.Acad.Natle Méd.*,2014. vol198,n°3.p 427-438.

**LUQUE Y., MESNARD L,(2018).** Néphrotoxicité de la vancomycine : fréquence et mécanismes. Néphrologie et Thérapeutique.vol 14 (2018). p 133–138.

### M

**MADJMAA O., BOULMAIZE H, (2016).**Isolement et caractérisation des souches d'entérocoques multirésistantes en clinique au niveau de CHU Khellil Amrane.Mémoire de master. Microbiologie en Secteur Biomédical et Vétérinaire.Bejaia : Université A. MIRA. 57 p.

**MANNU L., PABA A., DAGA E., et al.,(2003).** Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy,animal and clinical origin. International Journal of Food Microbiology.vol 88 (2003). 291– 304 p.

**MAMERI N, (2012).** Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolés au niveau de l'EPSP de Boghni, Tizi Ouzou.Mémoire de Master.Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédicale et à l'environnement.Bejaia :Université Abderrahmane MIRA.46 p.

**MARTINO G.P., ESPARIZ M., NIZO G.G.,et al.,(2018).** Safety assessment and functional properties of four enterococci strains isolated from regional Argentinean cheese. International Journal of Food Microbiology.vol 277 (2018).p 1-9.

## Références bibliographiques

---

**MONSTEIN H-J., et al.,(1998).** Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology* (1998).vol 144. p 1171-1 179.

**MUYLAERT A., MAINIL J.G, (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques :les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.*, 2012.vol 156. p 109- 123.

### N

**NAMI Y., BAKHSHAYESH R-V.,et al.,(2019).** Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*,2019. Vol 10 ( Article 300). p 13.

**NASER S.M., VANCANNEYT M., HOSTE B.,et al.,(2006).** Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al.2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006).vol56. p 413–416.

**NATARAJAN P., PARANI M,(2014).** First Complete Genome Sequence of a Probiotic *Enterococcus faecium* Strain T-110 and Its Comparative Genome Analysis with Pathogenic and Non-pathogenic *Enterococcus faecium* Genomes. *Journal of Genetics and Genomics* xx (2014) .p 1-4.

### P

**PARVEAU P, (2011).** Bactéries multirésistantes dans l'environnement :recherche dans les effluents de la ville de Toulouse.Thèse de doctorat.Pharmacie spécialisée.France : universite de Limoges ,faculte de pharmacie.153 p.

**PEBRET F,(2003).** Maladies infectieuses :Toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. France : Heures de France. [en ligne].[consulté le 05/09/2020]. Disponible sur le web : <https://www.unitheque.com/maladies-infectieuses/heures-france/Livre/3233.592> p.

### Q

**QUINCAMPOIX J.C.,MAINARDI J.L,(2001).** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimatio* 2001.vol :10 .p 267-275.

### R

**REHAIEM A. , FHOULA I., SLIM A.F.,et al.,(2015).** Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteriocin production of *Enterococcus* spp. isolated from tunisian fermented food products. *Food Control*.vol 63 (2016).p 259-266.

**RICE L.B,(2001).** Emergence of Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Emerging Infectious Diseases*.vol 7, p 183-187.

## Références bibliographiques

---

**RODIER J., et al., (2005).**L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer.Ed.DUNOD, 1383 p.

**RUPPE E,(2010).** Epidémiologie des beta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M.Infections Bactériennes : Antibiotiques (2010).vol 12. p 3-16.

S

**SAVA L.G., HEIKENS E.,HUEBNER J,(2010).**Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clinical Microbiology and Infection.vol 16 (2010). p 533-540.

**SCHLEIFER\* K- H.,KILPPER-BALZ R,(1984).** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov.and *Enterococcus faecium* comb. nov.International Journal Of Systematic Bacteriology ,Jan, 1984. vol 34.p 31-34.

**SEPPO SALMINEN P.,et al.,(2004).**Lactic Acid Bacteria:microbiological and functional aspects .3° Edition. New York (USA):Marcel Dekker,Inc. [en ligne].[consulté le 29/07/2020]. Disponible sur le web : <https://www.taylorfrancis.com/books/lactic-acid-bacteria-seppo-salminen-atte-von-wright/10.1201/9780824752033> . 656 p. [https://doi.org/ 10.1201/9780824752033](https://doi.org/10.1201/9780824752033).

**SISTEK V,(2010).** Identification des Staphylocoques, Streptocoques et Entérocoques par des méthodes génotypiques.Thèse de doctorat. Microbiologie et immunologie.QUEBEC : université Laval , 292 p.

**STORA D,(2013).**Pharmacologie et thérapeutiques :validation des UE.2°édition. France :Lamarre.[en ligne].[consulté le 26/09/2020]. Disponible sur le web : [https://www.unitheque.com/pharmacologie-amp;-therapeutiques-2.11/etudiants\\_ifsi/\\_lamarre/Livre/66756](https://www.unitheque.com/pharmacologie-amp;-therapeutiques-2.11/etudiants_ifsi/_lamarre/Livre/66756). 240 p.

**STUCKI K.et al., (2014) .** Infections à entérocoques : du plus simple au plus complexe.... Rev Med Suisse .vol :10. p 1918-1923.

**ŠVEC P.,FRANZ C,(2010).** The genus *Enterococcus*.Lactic Acid Bacteria :Biodiversity and Taxonomy2014. p 175-211.

**SYLVIE CARLE, (2009).**La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !.Pharmactuel. vol.42Supplément2 ; article 1. p 6-21.

T

**TATSING FOKA F.E., ATEBA C.N,(2019).** Detection of Virulence Genes in Multidrug Resistant Enterococci Isolated from Feedlots Dairy and Beef Cattle: Implications for Human Health and Food Safety. BioMed. vol 2019, Article ID 5921840. 13 p.

## Références bibliographiques

---

**TREMOLIERES F,(2010).** Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. *Medecine/Sciences* 2010. vol :26 . p 925-929.

V

**VAN TYNE D., GILMORE M.S,(2014).** Friend Turned Foe: Evolution of Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance. *Annu Rev Microbiol.* 2014. vol 68. p 337–356. doi:10.1146.

W

**WEISSER M., WIDMER A.F,(2012).** Entérocoques multirésistants. *Forum Med Suisse* 2012.vol 12(42). p 805–807.

**WILLEMS R.J.,BONTEN M,(2007).** Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2007.vol 20. p 384–390.

**WILLEY J.M., et al.,(2017).** Prescott's Microbiology, 10<sup>e</sup> édition. Traduction de **COYETTE J.,et al.,2018.** 5<sup>e</sup> édition. France :de Boeck Supérieur.[en ligne].[consulté le 02/06/2020]. Disponiblesurleweb : [https://www.livres-medicaux.com/microbiologie-5e-edition\\_978\\_28073\\_08022\\_h\\_tml](https://www.livres-medicaux.com/microbiologie-5e-edition_978_28073_08022_h_tml) .1120 p.

Y

**YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D., KORICH M.N,(2001).** Resistance bacterienne aux antibiotiques. *médecine du Maghreb* 2001.vol n°91. p 14-15.

**YVON MICHEL-BRIAND, (2009).** Une histoire de la résistance aux antibiotiques :Apropos de six bactéries.Paris(France) :L'Harmattan. .[en ligne].[consulté le 02/10/2020]. Disponible sur le web : [https://www.unitheque.com/une-histoire-resistance-aux-antibiotiques/\\_harmattan/Livre/34110](https://www.unitheque.com/une-histoire-resistance-aux-antibiotiques/_harmattan/Livre/34110) . 364 p.

# *Annexes*

## Annexes

**Tableau 7:** Résultats de dénombrement des germes testés par méthode de filtration par membrane.

Stations/germes	CT(UFC/100ml)	CF(UFC/100ml)	EN(UFC/100ml)
<b>Khelloufi</b>	contamination	8	9
<b>Riadh</b>	9.4	0	0
<b>Colonel Abes</b>	130	2	1
<b>Bateau Cassé</b>	contamination	20	1
<b>Sirène</b>	contamination	0	5.5
<b>Ain Taya</b>	10	0	4.6

**Tableau 8:** Résultats de dénombrement des germes testés par méthode NPP.

Stations /germes	CT(c/g)	CF(c/g)	EN(c/g)
<b>Sirène</b>	3,6	3,6	0
<b>Colonel Abes</b>	21	9,2	23
<b>Khelloufi</b>	21	230	3,6

**Tableau 9:** Les résultats des entérocoques sur milieu Litsky.

Stations	Dilution	résultas
<b>Khelloufi</b>	(10 <sup>-1</sup> )3	Trouble
<b>Colonel Abes</b>	(10 <sup>-1</sup> )1	Trouble
	(10 <sup>-1</sup> )2	Trouble
	(10 <sup>-1</sup> )3	Trouble

**Tableau 10:** Les résultats des coliformes sur milieu schuber puis avec kovacs.

Stations	Dilution	Schuber	Kovacs
Sirène	10 <sup>-1</sup>	Trouble	Anneau rouge
Colonel Abes	10 <sup>-1</sup>	Trouble	-
	10 <sup>-1</sup>	Trouble	-
Khelloufi	(10 <sup>-1</sup> )1	Trouble	Anneau rouge
	(10 <sup>-1</sup> )2	Trouble	-
	(10 <sup>-1</sup> )3	Trouble	-
	(10 <sup>-2</sup> )1	Trouble	-
	(10 <sup>-2</sup> )2	Trouble	-
	(10 <sup>-2</sup> )3	Trouble	-

**Tableau 11:** Les normes de salubrité des plages, normes algériennes (Décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993).

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

Tableau 12: valeurs critiques des diamètres de zone d'inhibition.

Antibiotiques	S	I	R	Référence
VA (30µg)	≥17	15-16	≤14	CLSI 2017
SXT(25 µg)	≥ 50	21-49	<21	CASFM2020
TMP(5 µg)	≥ 50	21-49	<21	CASFM2020
AK(30 µg)				
TE(30 µg)	≥19	15-18	≤14	CLSI.2017
CN(10 µg)	≥ 18	16-17	<16	CASFMI2013
NA(30 µg)				
AMC(3 0µg )				
ATM(30 µg)				
CAZ (30 µg)				
AM (10 µg)	≥17	-	≤16	CLSI.2017
CD(2 µg)	≥21	18-20	≤17	CASFM2013
CTX(30 µg)				
FOX(30 µg)				

Tableau 13: La table de Mac Grady.

Tables NPP (d'après la norme ISO 7218 :1996(F))

**Tableau 1 - Table NPP pour 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) et 3 x 0,01 g (ml).**

Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré	Limites de confiance			
					>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30		0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	0,4	3,6	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2	0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	3	36	2	44
3	1	3	16	0	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	3	40	2	56
3	2	3	29	3	9	99	5	152
3	3	0	24	1	44	99	3	152
3	3	1	46	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	20	400	10	570
3	3	3	>110					
autres valeurs			non cité dans la table ISO 7218 : 1996 (F)					

## Résumé

Le but de ce travail est l'évaluation et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques qui sont des bactéries à Gram positif isolées à partir de l'environnement marin dans six plages du littoral Algérois.

La résistance aux antibiotiques des isolats de l'environnement marin a révélé la présence d'une multirésistance aux divers antibiotiques testés. Une résistance totale des souches à l'acide nalidixique (NA) ; l'aztréonam (ATM); et la ceftazidime (CAZ) ; avec un taux de résistance élevés pour la clindamycine (CD) ; la céfoxine (FOX) ; la gentamicine (CN) et l'amikacine (AK). Aucune résistance n'a été détectée vis-à-vis de la vancomycine.

**Mots clés:** entérocoques; antibiotiques; résistance.

## Abstract

The aim of this work is the evaluation and characterization of antibiotic resistance in enterococci, which are Gram-positive bacteria isolated from the marine environment in six beaches along the Algerian coastline.

Antibiotic resistance of isolates from the marine environment to reveal the presence of resistance to various antibiotics. Total strain resistance to nalidixic acid (NA); aztreonam (ATM); and ceftazidime (CAZ); with high levels of resistance to clindamycin (CD); cefoxin (FOX); gentamicin (CN) and amikacin (AK). As well as no resistance was detected to vancomycin.

**Keywords:** enterococci; antibiotics; resistance.

## المخلص

الغرض من هذا العمل هو تقييم وتصنيف مقاومة المكورات المعوية للمضادات الحيوية ، وهي بكتيريا إيجابية معزولة من البيئة البحرية لسنة شواطئ على طول الساحل الجزائري.

مقاومة المكورات المعوية ال معزولة من الوسط البحري للمضادات الحيوية كشفت عن وجود مقاومة لمختلف المضادات الحيوية داخل السلالة نفسها ; على الرغم من أن جميع السلالات أعربت عن مقاومتها لثلاث عائلات من المضادات الحيوية المختبرة على الأقل.

مقاومة جميع سلالات I' acide nalidixique (NA) وAztreonam (ATM) وceftazidime (CAZ) مع معدل مقاومة عالية , clindamycine (CD) , (FOX) céfoxine , Gentamicine (CN) وAmikacine (AK) (SXT) . و عدم وجود مقاومة ل vancomycine .

الكلمات الرئيسية: المكورات المعوية, المضادات الحيوية, المقاومة.

