



Institut des
Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Mémoire en vue de l'obtention du
Diplôme de Master
Option : Sciences vétérinaires

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES
D'ENTEROCOQUES D'ORIGINE AVIAIRE**

Présenté par

BELHOUT Linda Amel

Devant le jury :

Promotrice :	YOUSFI, S	MCB	ISV Blida
Co-promoteur :	HAMMAMI, N	MCA	ISV Blida
Président :	TARZAALI, D	MAA	ISV Blida
Examineur :	EZZEROUG, R	MCB	ISV Blida

Année : 2020/2021

REMERCIEMENTS

«Louange à Allah, le tout puissant et miséricordieux qui m'a prodigué le Courage et la Force afin de mener à terme ce travail».

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde gratitude à ma chère promotrice, YOUSFI Safia, de m'avoir encadrée, orientée et guidée tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à ma chère Co-promotrice, Mme HAMMAMI Nabila et à la doctorante AIT IALEFF Khouloud, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de recherche de l'institut qui m'a fournis tous le nécessaire pour travailler dans de bonnes conditions.

J'exprime également tous mes remerciements aux membres de jury, EZZROUG Rym et TARZAALI Dalila, qui ont accepté d'évaluer ce mémoire.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail :

A mes très chers parents Mama et Papa, qui m'ont donné la vie, qui m'ont aidé et soutenu à tracer ce chemin lumineux que je suis et qui m'ont encouragé tout au long de mes études. Aucun mot ne pourra suffire pour vous exprimer l'amour que je vous porte et votre place dans mon cœur et si maintenant je réalise mon rêve à devenir docteur vétérinaire c'est pour vous et grâce à vous, ce n'est qu'un fruit de vos encouragements et vos précieux conseils et le moindre cadeau que je puisse vous offrir. Mille mercis.

A ma grand mer

A ma chère sœur Samira, qui toujours qui à été toujours à mes coté pour me soutenir et m'encourager.

A ma chère sœur Nesrine et son mari et leurs enfants Adam et Nour Waal.

A mon héros Hadi, je t'adore petit frère.

A mon bras droit Sidou et sa femme Hanane.

A tout ma famille, oncles, Djamel Ismaïl et surtout Hamid et Moukhtar.

A mes tante Malika, aicha, Karima ,Fatma ,et surtout Maninaaaa.

A mes chères cousine Amina, Zineb, Meriem, Houda, Wissal, Hiba et Allaa.

A mes adorables amies, Faiza, Serine, Karima, Abir, Mounia et Bochra.

A mes chers amis Hicham, Djamil, Riyad et Ilyess .

A ma chatte « BICHA » qui m'a accompagnée durant la dernière année de mes études.

A tous les enseignants qui m'ont formé depuis ma première année jusqu'à ce Jour, qui nous ont toujours transmis des leçons avec passion et amour. Leur seul et vrai objectif dans l'enseignement, c'est de construire et faire de nous une génération consciente et responsable. Je vous dis simplement que les plus grandes leçons ne sont pas tirées d'un livre mais d'un enseignant tel que vous cher enseignant. Je ne vous remercierai jamais assez.

A toute la promotion de l'ISVB 2021.

Linda

RESUME

Les entérocoques font partie de la flore normale intestinale des animaux et des humains. Plusieurs études ont démontré que les entérocoques d'origine animale pouvaient représenter un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques pour la communauté humaine et animale.

L'objectif de cette étude est la caractérisation phénotypique des souches d'*Enterococcus faecalis* et *E.faecium*, isolées à partir du tractus digestif du poulet de chair.

Les souches isolées ont été soumises à l'étude de résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Un panel de six antibiotiques a été testé.

De hauts pourcentages de résistance aux Tétracyclines et à l'Erythromycine ont été observés (80% et 70% respectivement). 30% de résistances aux Pénicillines et 10% de résistance au Chloramphénicol ont été enregistrés. Cependant, toutes les souches ont été sensibles à la Vancomycine et à de haut niveau à la Gentamycine.

Mots-clés : *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Poulet de chair, Antibiogramme

ملخص

المكورات المعوية هي جزء من النباتات المعوية الطبيعية للحيوانات والبشر. أظهرت العديد من الدراسات أن المكورات المعوية من أصل حيواني يمكن أن تمثل مستودعًا للجينات المقاومة للمضادات الحيوية للمجتمع البشري والحيواني.

الهدف من هذه الدراسة هو التوصيف المظهرى لسلاطات *Enterococcus faecalis* و *E. faecium* المعزولة من القناة الهضمية للفروج.

تم إخضاع السلاطات المعزولة لدراسة مقاومة المضادات الحيوية بطريقة انتشار الأقراص على وسط أجار. تم اختبار مجموعة من ستة مضادات حيوية.

لوحظت نسب عالية من المقاومة لمضادات النتراسيكلين والاريثروميسين (80% و 70% على التوالي). تم تسجيل 30% مقاومة للبنسلين و 10% مقاومة للكلورامفينيكول. ومع ذلك ، كانت جميع السلاطات حساسة للفانكوميسين ومستوى عالٍ من الجنتاميسين.

الكلمات المفتاحية: *Enterococcus faecium* ، *Enterococcus faecalis* ، دجاج ، مقاومة المضادات الحيوية.

Abstract

Enterococci are part of the normal intestinal flora of animals and humans. Several studies have shown that enterococci of animal origin can represent a reservoir of antibiotic resistance genes for the human and animal community.

The objective of this study is the phenotypic characterization of the strains of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium*, isolated from the digestive tract of broilers.

The isolated strains were subjected to the study of resistance to antibiotics by the method of diffusion of the discs on agar medium. A panel of six antibiotics was tested.

High percentages of resistance to Tetracyclines and Erythromycin have been observed (80% and 70% respectively). 30% resistance to Penicillins and 10% resistance to Chloramphenicol were recorded. However, all strains were sensitive to Vancomycin and high level to Gentamycin.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Broiler, Antibiotic resistance.

Liste des figures

	Titre des figures	Page
Figure 1 :	Aspect en microscopie optique d' <i>E. faecium</i> après coloration de Gram (x 100)	4
Figure 2 :	Système d'identification : api® 20 Strep	11
Figure 3 :	Inoculation de la Galerie api® 20 Strep	12
Figure 4 :	Antibiogramme d'une souche d'entérocoque sur milieu gélosé	14
Figure 5 :	Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu sélectif BEA	15
Figure 6 :	Aspect des entérocoques sous un microscope optique après Coloration de Gram « Gram positif » (X1000).	15
Figure 7 :	Résultat du Test de Catalase-	15
Figure 8 :	Galerie api® 20 Strep après 24 heures d'incubation	15
Figure 9 :	Espèces d'entérocoques identifiées chez le poulet de chair	16
Figure 10 :	Antibiogramme d'une souche d'entérocoque après 18h d'incubation à 35°C	16

Liste des tableaux

	Titre du tableau	Page
Tableau 1 :	Identification des entérocoques (<i>E.faecalis</i> et <i>E. faecium</i>)	5
Tableau 2 :	Liste des antibiotiques testés	13
Tableau 3 :	Pourcentages (%) de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques isolées chez le poulet de chair.	17

Liste des abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique.
ARN	: Acide ribonucléique
ATB	: Antibiotique.
BEA	: Bile Esculine Azide.
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth.
CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
D-ala-D-ala	: D-analyl-D-alanine.
<i>E</i>	: <i>Enterococcus</i> .
ERV	: Entérocoque résistant à la vancomycine
NaCl	: Chlorure de Sodium.
pH	: Potentiel Hydrogène.
PLP	: Protéines liant la Pénicilline.
PYR	: L -pyrrolidonyl-3-naphthylamide.
Van	: Vancomycine.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les entérocoques..... 3

2. Multirésistance des entérocoques aux antibiotiques..... 6

3. Méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques..... 7

Etude expérimentale

1. Problématique..... 9

2. Objectifs..... 9

3. Matériel et méthodes..... 9

4. Résultats 15

5. Discussion..... 17

Conclusion..... 19

Appendices

Appendice A : Composition des milieux de culture et produits chimiques..... 20

Appendice B : Table de lecture galerie biochimique..... 22

Appendice C : Table de lecture antibiogramme..... 23

Références bibliographiques..... 24

Introduction

Introduction

L'utilisation des antibiotiques comme moyen thérapeutique contre les infections bactériennes a permis une avancée considérable de la médecine. Cependant, malgré les efforts continus visant à contrôler les agents pathogènes, les bactéries développent des phénomènes de résistance aux antibiotiques notamment en raison de la pression de sélection exercée par l'utilisation massive et parfois inadéquate des antibiotiques, ce qui conduit à l'échec thérapeutique (Wendt *et al.*, 1999)

L'antibiorésistance est un problème mondial tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. La présence de microorganismes résistants aux antibiotiques dans les matières fécales d'animaux suscite de vives inquiétudes, car ces microorganismes pourraient être transmis à l'homme via la chaîne alimentaire contaminée (Hayes *et al.*, 2003). Parmi ces microorganismes, les entérocoques qui font partie de la flore commensale du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux (Hegstad *et al.*, 2010), et qui ne sont pas connus pour être particulièrement pathogènes. Cependant, leur rôle dans les infections opportunistes et nosocomiales a considérablement augmenté ces dernières années. Les deux principales espèces responsables d'infections chez l'homme sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

La résistance aux agents antimicrobiens peut être intrinsèque, ou acquise via plusieurs mécanismes, incluant la mutation, l'intégration d'éléments génétiques étrangers, ou le transfert de plasmides et de transposons (Beveridge, 1999; Chambers and DeLeo, 2009). La résistance est particulièrement importante chez les entérocoques puisque ce groupe de bactéries est intrinsèquement résistants aux agents antimicrobiens couramment utilisés dans les hôpitaux (céphalosporines et autres bêtalactamines tels que les pénicillines résistantes à la pénicillinase, clindamycine et aminoglycosides) (Galdiero *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012). De plus, les entérocoques ont la capacité de facilement acquérir et exprimer de nouveaux gènes de résistance et peuvent ainsi tolérer la pression de sélection engendrée par la présence d'antibiotiques (Moellering Jr, 1992).

La synthèse bibliographique présentée dans ce manuscrit résume les généralités sur le genre *Enterococcus*, leurs multirésistances aux antibiotiques ainsi que les méthodes phénotypiques de détection de ces antibiorésistances.

Le principal objectif de ce travail est d'étudier la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine aviaire. Ce projet comprend les objectifs spécifiques suivants :

1. Isoler et identifier les souches d'*Enterococcus* spp à partir de tube digestif du poulet de chair.
2. Etudier la résistance des isolats aux différentes familles d'antibiotiques.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les entérocoques

Les entérocoques sont des germes ubiquistes (Delarras, 2007). Ils sont caractérisés par des propriétés intrinsèques qui leur permettent de se répandre un peu partout dans la nature. On les retrouve au niveau du tube digestif de l'homme, chez les autres mammifères, les oiseaux, les plantes, le sol et l'eau (Klein, 2003). Les entérocoques appartiennent à la microflore commensale du tractus gastro-intestinal des animaux. De ce fait, il existe de fortes probabilités qu'ils contaminent la viande au cours de l'abattage (Franz and Holzapfel, 2004), et aussi peuvent contaminer plusieurs aliments tels les produits laitiers les produits de la pêche, mais également les légumes via le sol et l'eau contaminés.

Le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus* en 1984, 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 ARN des ribosomes (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984). il a été établi que les espèces *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques afin de désigner un nouveau genre (Moreno *et al.*, 2006). Plusieurs espèces ont été transférées du groupe streptocoque au groupe entérocoque. Le genre *Enterococcus* inclut actuellement plus d'une cinquantaine d'espèces. La distinction entre les espèces *Enterococcus* des autres coques qui n'expriment pas l'antigène de groupe D, tels que les espèces *Pediococcus*, *Lactococcus* ou *Tetragenococcus*, est plus difficile, puisqu'aucune autre différence phénotypique n'a été décrite. Ainsi, d'autres caractéristiques, telles que les profils de fermentation, les activités enzymatiques (ex. : pyroglutamyl aminopeptidase) (PYRase) (Domig *et al.*, 2003), la croissance à des températures définies et les caractéristiques physiologiques, sont essentielles à l'identification des espèces *Enterococcus* (Shanks *et al.*, 2006).

1.1. Caractères morphologiques et culturels

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif immobiles (à l'exception d'*E. Casseliflavus*) les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées par paires ou sous forme de chainettes (Schleifer *and* Kilpper-Bälz, 1984) non sporulés et rarement capsulés (FRANCOIS-NGO and MAINARDI, 1998; Gorenflo and Mainardi, 1998; Horaud and Le Bouguenec, 1989).

Les bactéries peuvent prendre un aspect coco-bacillaire quand la coloration de Gram est effectuée à partir de colonies sur gélose (Gillespie *and* Hawkey, 2006; Schleifer *and* Kilpper-Bälz, 1984).

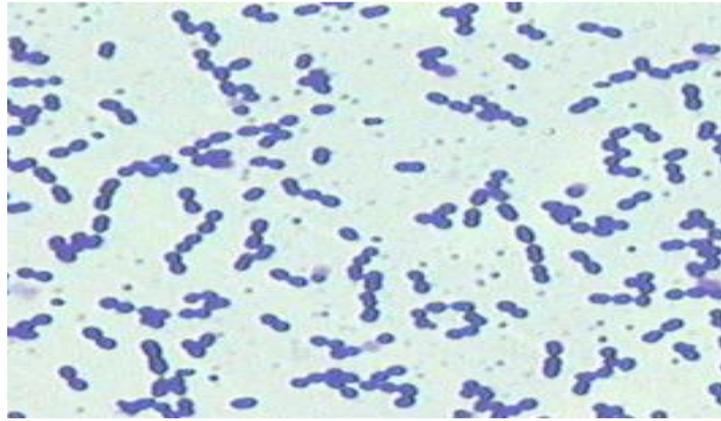


Figure 1 : Aspect en microscopie optique d'*E. faecium* après coloration de Gram (x 100) (Aguilar Galvez et al., 2012).

Généralement, les entérocoques produisent des colonies de couleur blanche. Toutefois, quelques-unes sont de couleur jaune comme *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. sulfureus*. Les entérocoques sont des microorganismes mésophiles (Higashida et al., 2005). La croissance peut se faire sous toutes les conditions respiratoires (anaérobie, aérobie et aérobie avec adjonction de 5% de CO₂ et à un pH optimal de 7,2 à 7,4). Les entérocoques se distinguent des streptocoques par leur capacité à se multiplier dans des conditions hostiles, en milieu hypersalé de 6,5%, en présence de 40% de bile et à pH de 9,6, c'est ainsi qu'ils survivent à un traitement de 60 °C pendant 30 min (certaines exceptions existent quant à ces capacités) ce qui explique leur persistance dans l'environnement (Stiles and Holzapfel, 1997).

Sur gélose au sang, la plupart des souches d'entérocoques sont Alpha ou non hémolytique et les caractères Béta hémolytique de certaines souches ou de certaines espèces dépend des conditions de culture ((Facklam et al., 1989) ; (Weinstock, 2007). La particularité des entérocoques à se multiplier sur des milieux usuels à base de peptone (Trypticase et Mueller-Hinton) en l'absence de facteur de croissance constitue un facteur important dans la reconnaissance des ces bactérie (Leclercq, 2001).

1.2. Caractères biochimiques

Les entérocoques possèdent des caractéristiques particulières servant à leur identification comme: présence de l'antigène du groupe D de Lancefield, hydrolyse de l'esculine en esculetine (noircissement caractéristique du milieu bile-esculine), cette propriété étant liée à la présence d'une alpha-glucosidase , enzyme qui est à l'origine de la formation des colonies bleu-vertes d'*E.faecalis* ou d'une β -galactosidase avec formation des colonies violettes d'*E.faecium* sur gélose ChromID™ VRE (bioMérieux), tolérance avec 40% de bile, production d'acétoïne,

fermentation du ribose, croissance à 10°C et à 45°C, croissance en présence de 6.5 % de NaCl, croissance à un pH 9.6 et synthèse d'une pyrrolidonyl-arylamidase (réaction dite PYR+) (Facklam, 1972).

Les entérocoques sont capables de métaboliser divers types de sucre comme N acétyl glucosamine, le ribose, le glucose, l'arbutine, le cellobiose, le maltose, le β gentiobiose, le D manose, le β -D méthyle glucopyranose, la salicine et le tréhalose (Aguilar Galvez et al., 2012; Carvalho et al., 2004).

Ces caractéristiques biochimiques et en particulier la dégradation de certains sucres ont permis la mise au point en bactériologie clinique des milieux « sélectifs » pour les entérocoques (milieux dits bile-esculine) mais aussi Le dépistage rapide par méthode chromogène (Aguilar Galvez et al., 2012; Carvalho et al., 2004).

Le tableau suivant récapitule l'identification des entérocoques.

Tableau 1 : Identification des entérocoques (*E.faecalis* et *E. faecium*) modifié de (Facklam et al., 2002).

Genre	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Test	Pyrrolidonyl-arylamidase +, mannitol +, sorbitol +, sorbose -, ADH +	Pyrrolidonyl-arylamidase +, mannitol +, sorbitol -, sorbose -, ADH +
Mobilité	-	-
Pigmentation	-	-
Tellurite*	+	-
Arabinose	-	+
Lactose	+	+
Raffinose	-	-**
Ribose	+	+
Saccharose	+	d

* : Croissance en présence de 0.04 % de tellurite.

** : Celles isolées principalement chez la volaille acidifient le raffinose.

d : Réponse variable selon les souches

1.3. Facteurs de virulence

Les entérocoques ne sont pas des bactéries très virulentes par rapport au *Staphylococcus* et pour devenir pathogènes, ils ont besoin d'exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion, la translocation et la disparition de la réponse immunitaire (Valenzuela *et al.*, 2008).

Les facteurs de virulence permettent la colonisation et l'invasion des tissus ainsi que la perméabilisation des cellules épithéliales contournant ainsi les défenses immunitaires de l'hôte (Franz *et al.*, 1999). Les facteurs de virulence les plus couramment étudiés chez les entérocoques sont la production de cytolysine (bactériocine), la production de substances d'agrégation et les activités enzymatiques (Jett *et al.*, 1994).

2. Multirésistance des entérocoques aux antibiotiques

Actuellement, les entérocoques sont considérés comme des réservoirs d'antibiorésistance du fait qu'ils résistent à plusieurs antibiotiques couramment utilisés en clinique, tels que les β lactamines, les aminosides, les quinolones et même les glycopeptides. Ces derniers sont réservés à l'utilisation hospitalière uniquement dans le cas d'infection sévère à germes Gram positif multirésistants.

Les entérocoques présentent une résistance naturelle aux β lactamines. Le mécanisme de cette résistance est lié à la présence d'une PLP de faible affinité pour la pénicilline. Quant à la résistance acquise, les entérocoques et notamment *Enterococcus faecalis* résistent aux β -lactamines par production de la β -lactamase. Ce mécanisme a été signalé aux Etats Unis, en Argentine et au Liban (Murray, 1992). Cette résistance généralement plasmidique s'associe le plus souvent à un haut niveau de résistance à la gentamicine liée à la présence de l'enzyme bifonctionnelle AAC-6-APH2. La β lactamase produite est une pénicillinase identique au type A codée par le gène *bla Z* de *Staphylococcus aureus* (Zscheck and Murray, 1991).

Quant aux aminosides, les premières souches d'*Enterococcus faecalis* résistantes à haut niveau d'aminosides ont été isolées en France 1979 (Horodniceanu *et al.*, 1979). Chez *E.faecium*, la résistance de haut niveau aux aminosides a été détectée pour la première fois en 1986 aux Etats Unis (Eliopoulos *et al.*, 1988). La résistance acquise aux aminosides chez les entérocoques est due à 3 mécanismes : altération de la cible ribosomale, modification du transport de l'antibiotique qui sont dus à des mutations chromosomiques, et la production enzymatique qui est le mécanisme le plus prédominant (Murray, 1990).

Chez les entérocoques, la résistance aux glycopeptides peut être naturelle, ou acquise, ce mécanisme de résistance est dû à une modification de la cible de l'antibiotique D-ala-D-ala du précurseur du peptidoglycane (Depardieu *et al.*, 2007).

La résistance acquise à la vancomycine est due à l'expression de la bactérie d'un opéron de résistance (opéron *van*) qui code pour des enzymes impliquées à la fois dans la synthèse d'un précurseur du peptidoglycane de faible affinité et dans l'élimination du D-ala-D-ala et le remplacé soit par un D-lactate, soit par une D- sérine (Cattoir and Leclercq, 2010; Courvalin, 2006; Xu et al., 2010). Ainsi, 9 types de résistance acquise ont été caractérisés : Van A, Van B, Van D, Van G, Van L, Van M, et Van N. Les résistances de type Van A, Van B, Van D et Van M sont responsables de la synthèse du précurseur D-ala-D-lac, tandis que les types Van E, Van G, Van L et Van N conduisent à la synthèse du dipeptide D-ala-D-ser (Boyd et al., 2008; Cattoir and Leclercq, 2010; Depardieu et al., 2007); (Xu et al., 2010); (Le Breton, 2011). Quant à la résistance naturelle, elle est retrouvée chez les espèces *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus flavescens*. Ces espèces contiennent un gène *van C* qui conduit à la synthèse du dipeptide D-ala-D-ser et qui confère une résistance de bas niveau à la vancomycine (CMI \leq 16 mg / l) (Sievert et al., 2008).

3. Méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques

De très nombreuses techniques sont réalisables pour évaluer *in vitro* l'activité des antibiotiques; elles sont toutes basées sur la détermination des concentrations minimales bactériostatiques et bactéricides (Archambault, M., 2004). Ces méthodes, permettant de déterminer le profil de sensibilité des bactéries à différents antibiotiques, donnent des réponses sous forme qualitative : sensible, intermédiaire et résistant. Elles résultent d'une détermination semi-quantitative du pouvoir bactériostatique des antibiotiques. Deux mesures sont à la base de toutes les techniques d'étude de l'activité des antibiotiques. Il y a tout d'abord la CMI (concentration minimale inhibitrice) qui consiste en la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 35°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique. Ensuite, il y a la CMB (concentration minimale bactéricide) qui est la plus petite concentration d'antibiotique laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 35°C.

Différentes techniques sont possibles, soient en milieu gélosé par diffusion avec des disques chargés en antibiotique (antibiogramme), soient en milieu liquide avec différentes concentrations d'antibiotiques. (Tremblay, 2012)

La méthode de diffusion en gélose consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une géloseensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après 18 heures d'incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque permettant ainsi de mesurer un diamètre. Ce diamètre reflète la valeur des CMI. La comparaison de ce diamètre aux diamètres standards, publiés dans les différents guides, permet de répondre qualitativement si la souche étudiée est sensible, intermédiaire ou résistante. L'interprétation de l'antibiogramme ne se limite pas à la lecture d'un seul antibiotique, mais elle est basée sur la lecture comparée de plusieurs molécules d'une même famille d'antibiotiques, voire d'autres familles pour mieux déceler les mécanismes de résistance faiblement exprimés.

Il existe également une technique simple d'utilisation en milieu gélosé, l'E-Test, qui utilise des bandelettes avec un gradient continu d'antibiotique, et une échelle de lecture de concentration.(Tremblay, 2012)

La méthode en milieu liquide consiste en l'utilisation de milieux supplémentés avec une concentration croissante d'antibiotique pour être ensuite inoculés avec une suspension bactérienne ayant une densité optique prédéterminée (ex. : Standard McFarland 0.5) suivi d'une incubation pendant 24 heures à 35°C. Peu importe la taille de la croissance observée, celle-ci devra être considérée comme une indication de la résistance.(Tremblay, 2012)

Les méthodes en milieu liquide se prêtent à l'automatisation et plusieurs systèmes existent sur le marché (ex. : système ARIS « Sensititre Automated Reading and Incubation System »).

Toutes ces techniques ont une certaine limitation étant donné que la résistance envers un seul groupe donné de bactéries est déterminée. Elles sous-estiment donc le nombre de bactéries résistantes dans la communauté présente. Afin d'améliorer l'estimation, il serait mieux d'ensemencer des milieux gélosés supplémentés en antibiotique avec des cultures de bactéries identifiées seulement au genre ou de toucher le centre de plusieurs colonies afin d'obtenir un McFarland 0.5 pour ensuite faire les analyses. (CLSI ; 2008)

Etude expérimentale

1. Problématique

Les entérocoques sont des bactéries dangereuses de part leur multirésistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques, aggravée ces dernières années par l'émergence de souches résistantes aux Glycopeptides (ERG). Aussi, ils peuvent être un vecteur de propagation des gènes de résistance aux antibiotiques via la chaîne alimentaire. C'est ce qui explique leur suivi dans les programmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens en tant qu'indicateurs de la résistance aux antibiotiques des bactéries Gram positif.

2. Objectif

Notre travail a pour but d'isoler et d'identifier des entérocoques d'origine aviaire, puis étudier leur profil de résistance aux différentes familles d'antibiotiques.

3. Matériel et méthodes

3.1. Techniques de prélèvement

Le contenu caecal des sujets était recueilli au niveau d'un abattoir de volailles (privé), situé dans la wilaya de Tizi Ouzou. Après éviscération, les caeca des sujets sélectionnés (10 sujet) ont été placés dans des sacs plastiques stériles et conservés dans une glacière pour un maximum de 08 heures avant la mise en culture. Nous avons prélevé 10 élevages.

3.2. Techniques de l'examen bactériologique

3.2.1. Méthodes d'isolement et de purification

Nous avons réalisé des dilutions au 1/10 (25g de fientes dans 225 ml d'Eau Peptonée Tamponnée « EPT »). L'homogénéisation des suspensions est réalisée à l'aide du vortex.

Ensuite nous avons transvasé 01 ml de cette suspension dans un tube à essai, à lequel nous avons ajouté 10 ml de bouillon Cœur Cerveau (BHIB) hypersalé à 6,5% de NaCl (Bouillon sélectif des entérocoques). Puis, incubés 24 à 48 heures à 37°C. Les entérocoques peuvent pousser en présence de 6,5% de NaCl, à la différence des streptocoques, et donnent un trouble du bouillon BHIB ainsi qu'un précipité au fond du tube à essai (Aspect mie de pain).

L'isolement des bactéries s'est fait sur un milieu sélectif BEA (IPA). C'est un milieu destiné à l'isolement sélectif des streptocoques du groupe D et des entérocoques qui tolèrent la bile et hydrolysent l'esculine en glucose et esculétine. Cette dernière donne une coloration noire avec

le citrate de fer. La sélection se fait grâce à la bile qui est un inhibiteur des bactéries autres qu'intestinales, et l'azide de sodium qui inhibe les bactéries à Gram négatif. L'inoculum est ensemencé en surface de la gélose selon la méthode des quadrants, puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Les entérocoques donnent de petites colonies translucides entourées d'un halo noir. Les colonies suspectes sont ensuite réensemencées à l'aide d'une pipette Pasteur selon la méthode des quatre quadrants sur la gélose nutritive de telle manière à obtenir des colonies bien isolées en culture pure.

3.2.2. Identification

L'identification est basée sur des caractères morphologiques et biochimiques par les méthodes conventionnelles et de galeries standardisées.

Les tests effectués sont les suivant :

- Coloration de Gram :

Permet de diviser les bactéries en 2 groupes : Gram + (celles qui retiennent le violet de gentiane après le lavage à l'alcool), et Gram - (celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant).

➤ Technique :

1. Préparation du frotti : prélèvement par une pipette pasteur ou une anse de platine de quelques gouttes ou une parcelle de la colonie à étudier et la déposer sur une lame propre et l'étaler.
2. Fixation : Pour tuer les germes, fixer leurs structures cytologiques sans altération et augmenter la perméabilité membranaire aux colorants. Elle peut se faire par la chaleur, l'alcool-Ether ou l'acide osmique.
3. Coloration proprement dite : Quelques gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane sont répandues sur le frotti, puis l'excès du violet est jeté après une minute de contact. Ensuite le frotti est recouvert de lugol de Gram ; cette liqueur prend une teinte mordorée ; on la jette au bout de quelques secondes.
4. Décoloration : La lame est ensuite décolorée à l'alcool qui sera versé goutte à goutte jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'action décolorante.
5. Coloration de contraste : Après lavage à l'eau de robinet, le frotti est recoloré à la fushine de Ziehl au 1/10 pendant 1 minute puis lavé à l'eau, séché et examiné par microscope optique à l'immersion par grossissement x 1000.
6. Lecture : Les bactéries Gram + apparaissent en bleu noir et les Gram – en rouge.

- Test de Catalase :

La catalase est une enzyme qui détruit les peroxydes toxiques pour les bactéries.

Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau avec libération d'O₂, selon la réaction suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

- Technique :

Déposer une goutte d' H₂O₂ sur une lame, puis mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement à partir d'une gélose avec une pipette pasteur boutonnée.

- Si formation de bulles; catalase positif.
- En absence de bulles ; catalase négatif, le cas des entérocoques.

- Réalisation de l'api® 20 Strep :

L'identification des espèces a été assurée par les tests biochimiques du système « Galerie api® 20 Strep ». C'est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présente un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic du groupe ou d'espèce pour la plupart des entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

- Principe de la galerie Api :

La Galerie api® 20 Strep comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentations de sucre.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense qui réhydrate les substrats.

Les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres.

La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification qui se traduit par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture est faite à l'aide du tableau de lecture (voir annexe B) et l'identification par le Logiciel APIWEB Plus.



Figure 2 : Système d'identification : api® 20 Strep.

➤ Préparation de l'inoculum :

Après détermination de l'appartenance du germe au genre *Enterococcus* (Catalase -, oxydase -, cocci Gram + en chaînettes), le type d'hémolyse est noté, et avec un écouvillon stérile nous réalisons une suspension dense dans de l'eau physiologique d'opacité supérieure à celle de l'étalon 4 Mac Farland à partir de la culture pure de 24 heures sur gélose au sang.

➤ Inoculation de la galerie :

Dans la moitié des tests (VP à ADH), répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles d'air. Dans le reste des tests: RIB à GLYG ouvrir une ampoule d'API GP Médium y transférer le reste de la suspension précédente et répartir cette nouvelle suspension dans les tests restants.

Les tests soulignés (ADH à GLYG) sont remplis avec de l'huile de paraffine. Ensuite les boîtes sont fermées puis incubées à 37°C à l'étuve pendant 4 heures pour une première lecture et 24 heures si nécessaire pour une deuxième lecture.



Figure 3 : Inoculation de la Galerie api® 20 Strep.

➤ Lecture de la galerie :

Après 4 heures d'incubation les boîtes sont retirées de l'étuve et les réactifs suivants sont ajoutés :

- Sur VP ajouter une goutte de VP1 et une goutte de VP2.
- Sur HIP ajouter 02 gouttes de NIN.
- De PYRA à LAP 01 goutte de Zym A et 01 goutte de Zym B.

La lecture est faite 10 minutes après l'ajout des réactifs; quelque fois il est nécessaire d'utiliser une lampe forte (1000W) pour décolorer l'excès de réactif de PYRA à LAP.

➤ Identification :

L'identification de l'espèce est obtenue avec le logiciel APIWEB Plus® de Bio Mérieux, en entrant le profil numérique à 07 chiffres inscrit sur la fiche de résultat.

3.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées

La méthode de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme Standard) est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. La sensibilité aux antibiotiques est déterminée selon les recommandations de CLSI 2017.

➤ Principe :

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité du germe identifié vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques. Pour les Entérocoques, les antibiotiques testés ainsi que la charge du disque sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Liste des antibiotiques testés.

Familles Antibiotiques	Antibiotiques	Charge du disque
B-lactamines	Pénicilline	10 UI
Aminosides	Gentamycine	120 µg
Tétracyclines	Tétracyclines	30 µg
Macrolides	Erythromycine	15 µg
Phénicolés	Chloramphénicol	30 µg
Glycopeptides	Vancomycine	30 µg

➤ Technique :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur le milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en tournant) sur la paroi du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée (Mueller Hinton), de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte à 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de pétrie de 90mm de diamètre, les disques d'antibiotique doivent être espacés de 24mm.
- Les boîtes de Pétri seront ensuite incubées à 35°C pendant 16 à 24 heures à l'étuve.



Figure 4 : Antibiogramme d'une souche d'entérocoque sur milieu gélosé.

➤ Lecture de l'antibiogramme :

Elle est effectuée à l'aide d'un pied à coulisse qui mesure les diamètres d'inhibition. Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (voir appendice c). Les bactéries sont classées dans les catégories : sensible, intermédiaire ou résistant.

3.3.1. Contrôle de qualité :

Les normes utilisées ont été celles de NCCLS, et les contrôles de qualité ont été effectués à plusieurs niveaux :

- Par une simple vérification de la date de péremption des milieux de culture et de tout réactif à utiliser ;
- Par un stockage correct des milieux de culture et des disques d'antibiotiques ;
- Par une vérification de la profondeur de la gélose.

Les souches de référence utilisées sont *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 et *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212.

4. Résultats

4.1. Identifications de souches *Enterococcus spp*

L'isolement sur le milieu BEA montre des petites colonies translucides entourées d'un halo noir (figure 5).

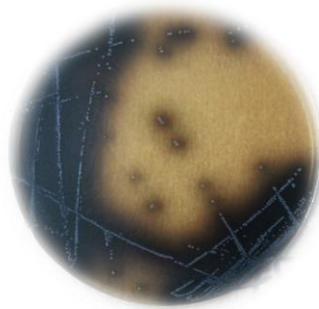


Figure 5 : Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu sélectif BEA.

L'identification des souches isolées a été faite sur la base de leur aspect microscopique après Coloration de Gram (figure 6) et le Test de Catalase (figure 7).

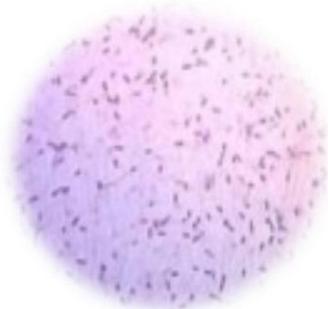


Figure 6 : Aspect des entérocoques sous un microscope optique après Coloration de Gram « Gram positif » (X1000).

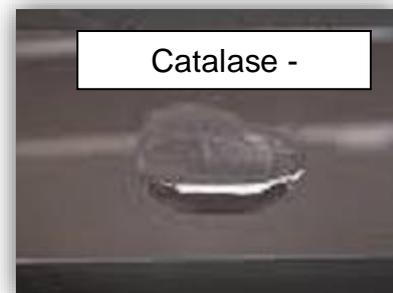


Figure 7 : Résultat du Test de Catalase-.

Les espèces identifiées à l'aide de galeries Api (figure 8) sont *E.faecalis* avec un taux de 60%, suivie par *E.faecium* avec un taux de 40% (figure 9).



Figure 8: Galerie api® 20 Strep après 24 heures d'incubation.

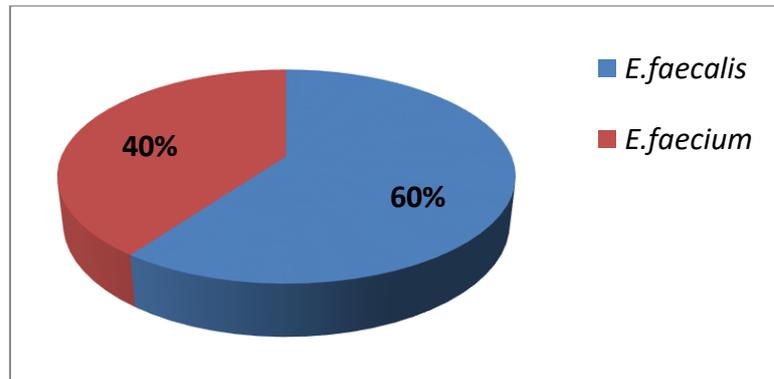


Figure 9 : Espèces d'entérocoques identifiées chez le poulet de chair.

4.2. Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches isolées

Sur les 10 souches d'entérocoques isolées, nous avons procédé à l'étude de la sensibilité aux différents antibiotiques par l'antibiogramme standard et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n°3.

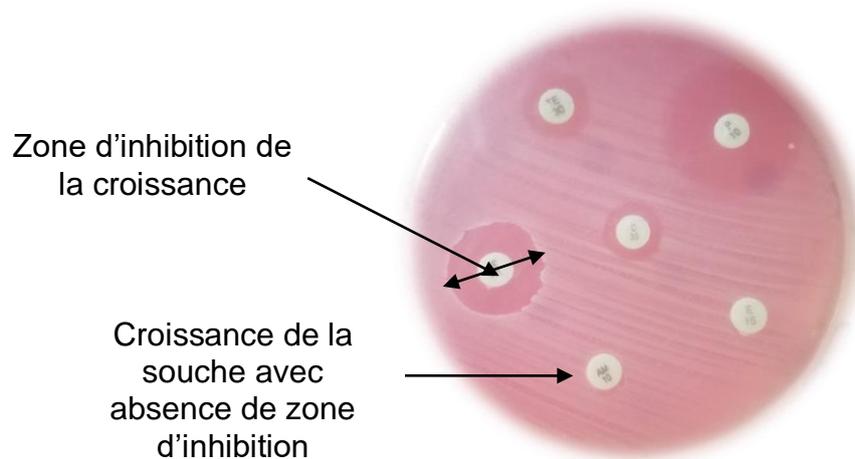


Figure 10 : Antibiogramme d'une souche d'entérocoque après 18h d'incubation à 35°C.

La résistance à la Vancomycine, antimicrobien d'importance capitale en médecine humaine, n'a été trouvée dans aucune souche d'entérocoque.

Toutes les souches étaient sensibles aussi à de hauts niveaux à la Gentamycine.

La plupart des isolats étaient résistants à la Tétracycline (80%) et à l'Erythromycine (70%).

30% de résistance à la Pénicilline et 10% de résistance au Chloramphenicol.

Tableau 3 : Pourcentages (%) de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques isolées chez le poulet de chair.

ATB	<i>E. faecalis</i> (n=6)	<i>E. faecium</i> (n=4)	Total (n=10)
Tétracycline	4	4	8 (80%)
Erythromycine	5	2	7 (70%)
Gentamycine	-	-	-
Pénicilline	1	2	3 (30%)
Chloramphénicol	-	1	1(10%)
Vancomycine	-	-	-

5. Discussion

Notre étude sur la sensibilité des entérocoques aux antibiotiques s'est portée sur un échantillon de 10 isolats. La question de la taille de l'échantillon ne semble pas se poser vu qu'il s'agissait d'une étude de sensibilité ponctuelle donc limitée dans le temps et dans l'espace, et ne pas une étude de prévalence.

E.faecalis est l'espèce prédominante avec 60% des isolats, récupérée à partir d'échantillons de Poulet de Chair, conformément à certains rapports, où *E.faecalis* a été signalée comme étant l'espèce la plus répandue (Franz *et al.*, 1999); (Graham, 2009); (Aslam *et al.*, 2012) ; (Yildiz *et al.*, 2015); (Pillay *et al.*, 2015), mais en contraste avec d'autres, indiquant qu'*E.faecium* est l'espèce d'entérocoque la plus fréquente isolée de la volaille(Hayes *et al.*, 2003);(Jackson, 2004);(Han *et al.*, 2011).

Ces différences de prédominance peuvent être attribuées à des divergences géographiques ou aux méthodes d'échantillonnage et d'isolement (Manero and Blanch, 1999); (Jackson, 2005).

La résistance aux antibiotiques la plus observée était celle aux Tétracyclines et aux Macrolides. Ces antibiotiques sont fréquemment utilisés pour le traitement et la prévention chez les volailles, étant relativement bon marché et efficaces contre une grande variété de micro-organismes (Persoon *et al.*, 2010). Ainsi, un taux élevé de résistance a été enregistré aux médicaments de ces classes d'antimicrobiens.

La co-résistance peut contribuer à des niveaux élevés de résistance à la Tétracycline et à l'Erythromycine. Selon Chopra et roberts (2001), Les plasmides et/ou les transposons

conjugatifs peuvent également porter à la fois les déterminants de la résistance à la Tétracycline et à l'Erythromycine, et les deux résistances peuvent être maintenues avec n'importe lequel de ces agents.(Chopra and Roberts, 2001)

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que 30% des souches présentaient une résistance à la Pénicilline, cette résistance est plus fréquemment détectée dans les isolats d'origine humaine que dans ceux d'origine animale(Mannu *et al.*, 2003). Le développement d'une résistance élevée à la Pénicilline pourrait avoir des conséquences sur le traitement des infections à entérocoques.

10% des isolats étaient résistants au Chloramphénicol dans notre étude. Cela peut être dû à des expositions illégales à cette molécule, car elle est interdite d'utilisation en élevage, ou bien, c'est dû à la persistance de résistances antérieures. Cette résistance au Chloramphénicol chez la volaille a été détectée aussi chez l'*E.coli*, bactérie indicatrice de résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram négatif. Les auteurs ont rapporté un taux assez élevé de résistance à cet antibiotique (39.22%) (Halfaoui *et al.*, 2017).

Nous n'avons pas isolé de souches résistantes à la Vancomycine, aussi toutes les souches étaient sensibles à de haut niveau à la Gentamycine. Cliniquement, la sensibilité à la Gentamycine et à la Vancomycine semble être favorable, car la résistance à ces molécules réduit considérablement les traitements thérapeutiques dans les infections à entérocoques(Klare *et al.*, 2003). Étant donné que le seul choix thérapeutique pour traiter les infections graves à entérocoques est limité aux combinaisons β -lactamines-Aminosides ou Glycopeptides-Aminosides.

Conclusion

CONCLUSION

L'étude du profil de résistance aux antibiotiques des 10 souches d'entérocoques isolées chez le poulet de chair, a donné de hauts pourcentages de résistance aux Tétracyclines et à l'Erythromycine (antibiotiques fréquemment utilisés en élevage), 30% de résistances aux Pénicillines, et 10% de résistance au Chloramphénicol.

Toutes les souches ont été sensibles à la Vancomycine et à de haut niveau à la Gentamycine, fort heureusement, toutefois, il est souhaitable de faire des études de grande envergure pour estimer la prévalence du portage digestif des différentes espèces d'entérocoques chez la volaille et de mieux déterminer leurs profils de résistance aux antimicrobiens et de la diversité des gènes de résistance aux antibiotiques.

Annexes

APPENDICE A

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES

❖ Milieux de culture (Pour 1litre d'eau distillée) :

• Milieu Bile Esculine Azide de Sodium (BEA) :

Extrait de viande	3g
Peptones	17g
Extrait de levure	5g
Citrate de sodium	1g
Citrate de fer	0.5g
Chlorure de sodium	5g
Esculine	1g
Bile de bœuf	10g
Azide de sodium	0.25g
Agar	13g
pH	7,3±0,1

• Milieu Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf déshydratée	300 g
Hydrolysate de caséine	17.5 g
Amidon	1.5 g
Agar agar	13 g
Agar	7,3±0,1

• Milieu BHIB :

Protéose-peptone	10,0 g
Infusion de cervelle de veau	12,5 g
Infusion de cœur de bœuf	5,0 g
Glucose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
pH	7,4± 0,2

- **Eau peptonée tamponnée (EPT):**

Peptone	10,0 g
Chlorure de potassium	5.0g
Phosphate disodique anhydre	3.5g
Dihydrogénophosphate de potassium	1.5g
pH	7,2± 0,2

- **Gélose nutritive :**

Extrait de viande	1.0 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Agar agar	15 g
pH	7.3± 0,2

- ❖ **Produits chimiques :**

- **Fushine phénique :**

Fushine cristallisée	1g
Alcool éthylique	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	10ml

- **Violet de gentiane phénique :**

Violet de gentiane	1g
Phénol	11g
Ethanol	10ml
Eau distillée	100ml

- **Lugol :**

Iodure de potassium	2g
Iode métalloïde	1g
Eau quod satis pour	100g

APPENDICE B

TABLE DE LECTURE GALERIE BIOCHIMIQUE

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

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

APPENDICE C

TABLE DE LECTURE ANTIBIOGRAMME

Tableau de lecture : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Enterococcus spp.*

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		Sensible	Intermédiaire	Résistant
Tétracycline	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Erythromycine	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
Gentamycine*	120 µg	≥10	7-9	≤ 6
Pénicilline	10 UI	≥15	–	≤ 14
Chloramphénicol	30 µg	≥18	13–17	≤12
Vancomycine**	30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14

* : Haut niveau de résistance.

** : Incuber pendant 24 heures.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aguilar Galvez, A., Dubois Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P., 2012. Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 16, 67-76.

Aslam, M., Javaid, N., Rahim, A., Nazir, U., Bibi, A., Khan, Z.A., 2012. Survey of extended LEACH-based clustering routing protocols for wireless sensor networks. In: 2012 IEEE 14th international conference on high performance computing and communication & 2012 IEEE 9th international conference on embedded software and systems, pp. 1232-1238.

Beveridge, T.J., 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology* 181, 4725-4733.

Archambault, M. 2004, *Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire.*, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. p. 1-35.

Boyd, D., Lankford, H., Loeb, S., Rockoff, J., Wyckoff, J., 2008. The narrowing gap in New York City teacher qualifications and its implications for student achievement in high-poverty schools. In. National Bureau of Economic Research, City.

Carvalho, M.d.G.r.S., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Shewmaker, P.L., Teixeira, L.M., Facklam, R.R., 2004. Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 42, 1192-1198.

Cattoir, V., Leclercq, R., 2010. Les entérocoques résistants aux glycopeptides. *médecine/sciences* 26, 936-942.

Chambers, H.F., DeLeo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* 7, 629-641.

Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews* 65, 232-260.

Courvalin, P., 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42, S25-S34.

- Delarras, C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P., 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical microbiology reviews* 20, 79-114.
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno-and genotypic criteria. *International journal of food microbiology* 88, 165-188.
- Eliopoulos, G., Wennersten, C., Zigelboim-Daum, S., Reiszner, E., Goldmann, D., Moellering Jr, R., 1988. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32, 1528-1532.
- Facklam, R., Hollis, D., Collins, M., 1989. Identification of gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 724-730.
- Facklam, R.R., 1972. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Applied microbiology* 23, 1131-1139.
- Facklam, R.R., Carvalho, M.d.G.S., Teixeira, L.M., 2002. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, 1-54.
- FRANCOIS-NGO, S., MAINARDI, J.-L., 1998. *Enterococcus faecalis*: aspects bacteriologique, epidemiologique et therapeutique. *Feuillets de biologie* 39, 21-26.
- Franz, C., Holzapfel, W., 2004. The Genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. *The Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 3rd edn (Salminen S, von Wright A & Ouwehand A, eds). In. Marcel Dekker, New York, City.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International journal of food microbiology* 47, 1-24.
- Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Elena Della Pepa, M., D'Orlando, V., Galdiero, M., 2012. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Current Protein and Peptide Science* 13, 843-854.
- Gillespie, S., Hawkey, P.M., 2006. *Principles and practice of clinical bacteriology*. John Wiley & Sons.
- Gorenflo, R., Mainardi, F., 1998. Signalling problem and Dirichlet-Neumann map for time-fractional diffusion-wave equations.
- Graham, A., 2009. The Andes: a geological overview from a biological perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96, 371-385.

- Halfaoui, Z., Menoueri, N.M., Bendali, L.M., 2017. Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. *Veterinary world* 10, 830.
- Han, W.-S., Hong, J.-M., Kim, H.-S., Song, Y.-W., 2011. Multi-pulsed white light sintering of printed Cu nanoinks. *Nanotechnology* 22, 395705.
- Hayes, J.R., English, L.L., Carter, P.J., Proescholdt, T., Lee, K.Y., Wagner, D.D., White, D.G., 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and environmental microbiology* 69, 7153-7160.
- Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T., Werner, G., Sundsfjord, A., 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical microbiology and infection* 16, 541-554.
- Higashida, R.T., Halbach, V.V., Dowd, C.F., Juravsky, L., Meagher, S., 2005. Initial clinical experience with a new self-expanding nitinol stent for the treatment of intracranial cerebral aneurysms: the Cordis Enterprise stent. *American Journal of Neuroradiology* 26, 1751-1756.
- Horaud, T., Le Bouguenec, C., 1989. *Streptococcus pneumoniae*. In, *Bactériologie médicale*. Flammarion Médecine-Sciences Paris, pp. 817-821.
- Horodniceanu, T., Bougueleret, L., El-Solh, N., Bieth, G., Delbos, F., 1979. High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 16, 686-689.
- Jackson, G., 2005. Stakeholders under pressure: corporate governance and labour management in Germany and Japan. *Corporate Governance: An International Review* 13, 419-428.
- Jackson, T., 2004. Negotiating Sustainable Consumption: A review of the consumption debate and its policy implications. *Energy & Environment* 15, 1027-1051.
- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994. Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews* 7, 462-478.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W., 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International journal of food microbiology* 88, 269-290.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International journal of food microbiology* 88, 123-131.
- Le Breton, D., 2011. *Eclats de voix.. Une anthropologie des voix*. Métailié.
- Leclercq, R., 2001. Faut-il identifier les entérocoques, et comment? *La Lettre de l'infectiologue* 16, 217-221.

Manero, A., Blanch, A.R., 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and environmental microbiology* 65, 4425-4430.

Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., Sechi, L.A., 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* 88, 291-304.

Moellering Jr, R.C., 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 1173-1176.

Moreno, M.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology* 106, 1-24.

Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical microbiology reviews* 3, 46-65.

Park, J.S., Lee, W.C., Yeo, K.J., Ryu, K.S., Kumarasiri, M., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Song, J.H., Kim, S.I., 2012. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *The FASEB Journal* 26, 219-228.

Persoon, S., Kappelle, L.J., Klijn, C.J., 2010. Limb-shaking transient ischaemic attacks in patients with internal carotid artery occlusion: a case-control study. *Brain* 133, 915-922.

Pillay, J., Armstrong, M.J., Butalia, S., Donovan, L.E., Sigal, R.J., Vandermeer, B., Chordiya, P., Dhakal, S., Hartling, L., Nuspl, M., 2015. Behavioral programs for type 2 diabetes mellitus: a systematic review and network meta-analysis. *Annals of internal medicine* 163, 848-860.

Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34, 31-34.

Shanks, O.C., Santo Domingo, J.W., Graham, J.E., 2006. Use of competitive DNA hybridization to identify differences in the genomes of bacteria. *Journal of microbiological methods* 66, 321-330.

Sievert, D.M., Rudrik, J.T., Patel, J.B., McDonald, L.C., Wilkins, M.J., Hageman, J.C., 2008. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clinical Infectious Diseases* 46, 668-674.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology* 36, 1-29.

- Tremblay, C.-L., 2012. Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. Université de Montréal (Canada).
- Valenzuela, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Ortega, E., Cañamero, M.M., Gálvez, A., 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2648-2652.
- Weinstock, D., 2007. La «crise» des accommodements au Québec: hypothèses explicatives. *Éthique publique. Revue internationale d'éthique sociétale et gouvernementale* 9.
- Wendt, C., Krause, C., Xander, L., Löffler, D., Floss, H., 1999. Prevalence of colonization with vancomycin-resistant enterococci in various population groups in Berlin, Germany. *Journal of Hospital Infection* 42, 193-200.
- Xu, X., Chua, K.-W., Chua, C.C., Liu, C.-F., Hamdy, R.C., Chua, B.H., 2010. Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain research* 1355, 189-194.
- Yildiz, Ö., Rommel, J., Debor, S., Holstenkamp, L., Mey, F., Müller, J.R., Radtke, J., Rognli, J., 2015. Renewable energy cooperatives as gatekeepers or facilitators? Recent developments in Germany and a multidisciplinary research agenda. *Energy Research & Social Science* 6, 59-73.
- Zscheck, K.K., Murray, B.E., 1991. Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35, 1736-1740.