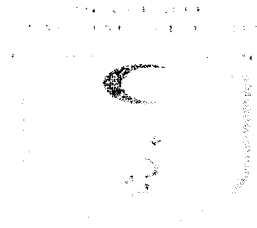


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB –BLIDA 1-



FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

LES ENTEROCOQUES RESISTANTS AUX GLYCOPEPTIDES ISOLES AU CHU DE BLIDA

Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Session : juin 2016

Présenté par :

- HASSANE Ikram
- KHELILI Meriem Anfel
- SALAH Khadidja

Devant le jury :

Dr M.I. ATIF
Maitre Assistant
Chef D'unité
C.H.U BLIDA

- Président : Dr. ATIF M.I. M. Assistant en Epidémiologie et Médecine Préventive
CHU Blida
- Examinatrice : Dr. AZROU.S M. Assistante en Microbiologie CHU Blida
- Examinatrice : Dr. BENYARBAH.C Spécialiste en Microbiologie CHU Blida
- Promotrice : Dr. BEROUAKEN.S M. Assistante en Microbiologie CHU Blida

Nous tenons avant tout à remercier Le miséricordieux tout puissant, car sans son aide et sa bienveillance, rien de cela n'aura pu être possible.

Nous tenons aussi, à exprimer notre gratitude, au docteur S.BEROUAKEN, notre promotrice, pour avoir accepté de diriger notre travail, pour ses précieux conseils, et surtout pour son soutien tout le long de ce travail, ainsi que l'aide et le temps qu'elle nous a consacré.

Nous remercions également les membres de jury pour avoir accepté d'examiner notre travail et de faire partie de notre jury.

Nous remercions également le personnel du laboratoire central du CHU de Blida pour leur coopération leur encouragement continu, et leur gentillesse, surtout ceux qui ont fait tout leur possible dans le but de nous faciliter la tâche durant nos 4 mois de stage.

Nos remerciements vont aussi au corps professionnel et administratif du département de pharmacie de l'université de Blida

Finalement, nous exprimons nos vifs et sincères remerciements à toute personne ayant participé de près ou de loin au bon déroulement de notre stage et à la réalisation de ce modeste travail.

Merci

*Je tiens en premier lieu à remercier Dieu tout puissant pour la volonté, la santé et le courage qu'il m'a
donné pour suivre mes études et de choisir un métier aussi noble.*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous
simplement que : Je dédie cette thèse à tous mes proches:*

*Aucune dédicace aussi douce soit elle ne saurait exprimer
L'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.
Chère père et mère : le jour tant attendu est enfin arrivé !
Je dépose entre vos mains le fruit de votre patience et de vos innombrables sacrifices.
Vos prières ont été pour moi d'un grand soutien moral tout au long de mes
études. C'est grâce au Tout Puissant puis à vous que je suis devenue ce que je
suis aujourd'hui.
Que ce travail puisse encore vous honorer et faire votre fierté. J'espère être à
la hauteur de tous les espoirs que vous avez mis en moi.
Je prie Dieu qu'il vous protège, qu'il vous garde, vous donne la santé et vous
accorde Longévité.*

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et
l'affection que je porte pour vous.
Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de Paix, de bonheur et de longue vie
Que Dieu Tout Puissant vous bénisse et vous protège.*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous
exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des
sœurs et des amies sur qui je peux compter.
Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble !
Ce travail reflète de la bonne ambiance qui a toujours régné entre nous
Que le Tout Puissant guide chacune de vous et vous donne la force d'exercer
vos professions respectives avec dignité où que vous soyez.*

*Je vous aime toutes et tous
Que le Tout Puissant vous bénisse et vous garde !*

Ibrahim

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements

A mes deux frères et à toute ma famille

A mes chères amies Meriem, Yasmine et Nesrine

A mes camarades Anfel et Ikram

Sans oublier tous mes enseignants et mes professeurs

Que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire

Ou de l'enseignement supérieur

Khadidja

Avec les sentiments de gratitude les plus sincères je dédie ce modeste travail à mes parents pour leur amour, leur patience, leur soutien, leur confiance, et leur prières.

Sans eux je ne serai jamais arrivée à ce stade dans ma vie. Merci pour tous

Je tiens également à remercier ma sœur Nour elhouda qui m'a toujours encouragé, mon cher grand frère Mohamed Nbel pour son aide inestimable, ses précieux conseils et suggestions

A mes adorables petits frères Taki eddine et Ishak qui m'ont supporté tout au long de ce travail. Que dieu les protège

Mes remerciements les plus intenses vont à ma tante Souad, mes grands-parents, toute ma famille et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

A mes chères copines Ikram et Khadidja qui ont partagé avec moi le meilleur et le pire lors de la réalisation de ce mémoire.

A mes amis : Kahina, Hayat, Marwa, Mohamed BMS et Sidahmed

A ceux qui remplissent mon cœur, sans que ma plume ne puisse les porter dans cette simple dédicace

A toute la promotion de pharmacie 2016 Blida

A tous ceux qui m'aiment

Merci.

Meriem Anfel

INTRODUCTION**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I : GENERALITES	1
I.1. Les entérocoques.....	1
I.1.1. Définition.....	1
I.1.2. Classification	1
I.1.3. Habitat	1
I.1.4. Les caractères bactériologiques.....	1
I.1.4.1. Caractères morphologiques	1
I.1.4.2. Caractères cultureux.....	1
I.1.4.3. Caractère biochimiques.....	2
I.1.4.4. Caractère antigénique.....	3
I.1.4.5. Facteurs de virulence.....	3
I.1.5. Pouvoirs pathogène.....	4
I.2. Les antibiotiques.....	5
I.2.1. Définition	5
I.2.2. Classification	5
I.2.2.1. Les bêta-lactamines	5
I.2.2.2. Les aminosides.....	6
I.2.2.3. Les macrolides et apparentés.....	6
I.2.2.4. Les glycopeptides	6
I.2.2.5. Autres antibiotiques.....	6
I.2.3. Mécanisme d'action.....	6
I.2.3.1. Les antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane	6
I.2.3.2. Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique	7
I.2.3.3. Les antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines	7
I.2.3.4. Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques.....	7
I.2.4. Les résistances des bactéries aux antibiotiques	8
I.2.4.1. Définition.....	8
I.2.4.2. Types de résistance.....	8
I.2.4.3. Mécanismes de résistance.....	8
I.3. Résistance aux antibiotiques chez les entérocoques.....	9
I.3.1. Résistances naturelles	9
I.3.1.1. Les bêta-lactamines	9
I.3.1.2. Les aminosides.....	10
I.3.1.3. Les autres antibiotiques.....	10
I.3.2. Résistances acquises	10
I.3.2.1. Les bêta-lactamines	10
I.3.2.2. Les aminosides.....	10
I.3.2.3. Les glycopeptides	11

I.3.2.4.Résistances associées	11
CHAPITRE II: ENTEROCOQUES ET GLYCOPEPTIDES	12
II.1.Glycopeptides	12
II.2.Mécanisme d'action des glycopeptides	13
II.3.Résistance des entérocoques aux glycopeptides	13
II.3.1.Mécanisme de résistance	13
II.3.2.Support génétique de la résistance	14
II.4.Les phénotypes de résistance des entérocoques aux glycopeptides	17
II.5.Méthodes de détection des entérocoques résistants aux glycopeptides	18
II.5.1.Méthodes phénotypiques	18
II.5.2.Méthode génotypique	19
CHAPITRE III : EPIDEMIOLOGIE	20
III.1.Portage	20
III.2.Mode de transmission.....	20
III.3.Données épidémiologiques.....	20
CHAPITRE IV : TRAITEMENT ET PREVENTION	24
IV.1.Traitement	24
IV.1.1.Traitement des infections à entérocoque sensible aux glycopeptides	24
IV.1.2.Traitement des infections à entérocoques résistants aux glycopeptides	24
IV.1.3.Perspectives.....	27
IV.2.Prévention.....	28
IV.2.1.Les mesures préventives.....	28
IV.2.1.1.Le dépistage	28
IV.2.1.2.Le regroupement et le cohorting des patients.....	28
IV.2.1.3.La décontamination	28
IV.2.1.4.Renforcement des mesures d'hygiène.....	29
IV.2.1.5.Restriction de l'utilisation des antibiotiques	29
IV.2.2.Conduite à tenir devant un patient « cas »	30
IV.2.3.Enjeux de la maîtrise	30
PARTIE PRATIQUE	
CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES	31
V.1.Protocole et durée de travail	31
V.2.Matériels	31
V.2.1.Appareillage.....	31
V.2.2.Matériel non biologique.....	31
V.2.3.Matériel biologique	31
V.3.Méthodes.....	31
V.3.1.Prélèvement à visée diagnostique	31
V.3.1.1.Isolement et identification des entérocoques	32
V.3.1.1.1.Examen microscopique.....	33
V.3.1.1.2.Recherche de la catalase	34
V.3.1.1.3.Isolement	35

V.3.1.1.4.Les tests d'identification	36
V.3.1.2.Recherche de la résistance des entérocoques aux glycopeptides.....	39
V.3.1.2.1.Antibiogramme standard : Méthode par diffusion des disques	40
V.3.1.2.2.Détermination de la CMI	40
V.3.2.Prélèvements à visée de dépistage	42
V.3.2.1.Recherche du portage digestif de l'ERG	42
V.3.2.2.Recherche du portage nasal de SARM chez les patients porteurs connus de l'ERG.....	43
V.3.3.Etude du prélèvement d'environnement	43
V.3.4.Etude moléculaire.....	44
V.3.5.Conservation des souches.....	44
CHAPITRE VI : RESULTATS.....	45
VI.1.Taux des ERG isolés au CHU Blida	45
VI.2.Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique.....	45
VI.2.1.Aspects épidémiologiques.....	45
VI.2.1.2.Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon la provenance des prélèvements (externe/interne)	46
VI.2.1.3.Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon le service	46
VI.2.1.4.Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon le type de prélèvement.....	47
VI.2.1.5.Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon l'espèce	47
VI.2.2.Entérocoques résistants aux glycopeptides et résistances associées	47
VI.3.Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage	49
VI.3.1.Etude rétrospective	49
VI.3.2.Etude prospective.....	49
VI.3.3.Antibiorésistance.....	49
VI.4.Résultats de l'enquête de l'environnement.....	50
VI.5.Résultats de l'étude moléculaire.....	50
CHAPITRE VII : DISCUSSION	51
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

AAC6' : 6'-N-aminoglycoside-acétyl-transférase
AARN: Algerian Anti-bacteriel Resistance Network
ADH: Arginine déshydrogénase
ADN: Acide désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AMP : Ampicilline
ARN : Acide ribonucléique
ARN 16s : Acide ribonucléique 16s
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ATB : Antibiotique
ATCC : American Type Culture Collection
BEA : Bile Esculine Azide
BHI : Brain Heart Infusion
BHIB : Brain Heart Infusion Broth
BHRe : Bactérie hautement résistante émergente
BMR : Bactérie multi-résistante
C : Celsius
C3G : Céphalosporines de troisième génération
CAC : Centre Anti-Cancer
CDC : Centers for Disease Control and prevention
CHL : Chloramphénicol
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
CIP : Ciprofloxacine
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

D-ALA : D-alanine

D-LAC : D-lactate

D-SER : D-Sérine

DDL : D-Alanine-D-Alanine ligase

DO : Densité optique

DSP : Disaccharidepentapeptides

EARSS : European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ERG : Entérocoque Résistant aux Glycopeptides

ERY: Erythromycine

ESG : Entérocoque sensible aux glycopeptides

FOS : Fosfomycine

GHN : Gentamycine Haut Niveau

GN : Gélose Nutritive

GSC : Gélose au sang cuit 11

GSF : Gélose au sang frais

h : Heure

I : Intermédiaire

IAS : Infection Associée aux Soins

InVs : Institut de Veille Sanitaire

IPA : Institut Pasteur D'Algérie

J : Jour

Kg : kilogramme

L: Litre

LAP : Leucine Amino Peptidase

LVX : Lévofoxacine

MH: Muller-Hinton

MHI : Muller-Hinton Imipénème

MHV : Muller-Hinton Vancomycine

min: minute

ml : millilitre

mm : millimètre

n : Nombre d'entérocoques résistants aux glycopeptides

N : Nombre total d'entérocoques isolés

NIT : Nitrofuranes

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCSIN : Programme Canadien de Surveillance des Infections Nosocomiales

PH : Potentiel Hydrogène

PLP : Protéine Liant la Pénicilline

PYRA : Pyrolidonyl-Aryl-Amidase

QDF : Quinupristine-Dalfopristine

R : Résistant

RBN : Résistant Bas Niveau

RIF : Rifampicine

S : Sensible

S1 : 1^{ère} Semaine

S4 : 4^{ème} Semaine

S8 : 8^{ème} Semaine

SA : Substance d'agrégation

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SASM : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méricilline

SCN: Staphylocoque à Coagulase Négative

SHEA: Society for Healthcare Epidemiology of America

SHN : Streptomycine Haut Niveau

SNC : Système Nerveux Central

T(+) : Témoin positif

T(-) : Témoin négatif

TCY : Tétracycline

TEC : Teicoplanine

UE/EEE : Union Européenne/ Espace Economique Européen

VAN : Vancomycine

VRSA : Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*

µg: Microgramme

µl : Microlitre

° : Degré

% : Pour cent

Figure 01 : Structure chimique des glycopeptides	12
Figure 02 : Structure du transposon Tn1546 et rôles de ses composants.....	14
Figure 03 : Résistance aux glycopeptides, type VanB	15
Figure 04 : Résistance aux glycopeptides, type VanD	16
Figure 05 : Résistance aux glycopeptides, type VanC	17
Figure 06 : Répartition des taux des ERG en Europe en 2014.....	22
Figure 07 : Les étapes de l'étude bactériologique des entérocoques.....	32
Figure 08 : Examen à l'état frais	33
Figure 09 : Lecture de la coloration de Gram.....	34
Figure 10 : Aspect du test positif et négatif de la recherche de la catalase	34
Figure 11 : Aspect des colonies des entérocoques sur GN.....	35
Figure 12 : Aspect des colonies des entérocoques sur GSF	35
Figure 13 : Aspect des colonies des entérocoques sur GSC.....	35
Figure 14 : Aspect des colonies des entérocoques sur milieu GN additionné de 6.5% de NaCl avant et après incubation	36
Figure 15 : Aspect de la suspension bactérienne avant et après incubation.....	37
Figure 16 : Aspect des colonies des entérocoques sur GSC après chauffage 30 min à 60°C .37	
Figure 17 : Aspect des colonies des entérocoques sur milieu MH additionné d'imipénème..	38
Figure 18 : Galerie API 20 Strep après incubation.....	39
Figure 19 : Fiche de résultat de la galerie API 20 Strep.....	39
Figure 20 : Recherche de la résistance des entérocoques aux glycopeptides.....	39
Figure 21 : Antibiogramme standard des entérocoques (VAN et TEC)	40
Figure 22 : Préparation des dilutions (CMI technique de dilution en gélose).....	41

Figure 23 : Préparation des milieux (CMI technique de dilution en gélose).....	41
Figure 24 : Lecture de CMI (Technique de dilution en gélose)	41
Figure 25 : CMI bandelette de TEC et VAN (technique de l'E-Test).....	42
Figure 26 : Aspect des colonies des entérocoques sur milieu MH additionné d'imipénème (prélèvement à visée diagnostique)	42
Figure 27 : Aspect des colonies des staphylocoques sur milieu Chapman	43
Figure 28 : Les différents prélèvements réalisés au niveau de la chambre	44
Figure 29 : Taux des ERG isolés au CHU Blida	45
Figure 30 : Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon le service.....	47
Figure 31 : Profil de résistance aux antibiotiques des ERG	48

Tableau I : Caractères de différenciation entre les entérocoques et les streptocoques	02
Tableau II : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre <i>Enterococcus</i>	03
Tableau III : Phénotype sauvage des entérocoques.....	09
Tableau IV : Les caractéristiques des principaux types de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques.....	18
Tableau V : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et leur interprétation des entérocoques (VAN, TEC)	18
Tableau VI : Valeurs critiques des concentrations minimales inhibitrices et leur interprétation des entérocoques (VAN, TEC)	19
Tableau VII : Nombre et pourcentage d'entérocoques résistants (R + I) aux glycopeptides entre 2008 et 2014 en Algérie.....	23
Tableau VIII : Souches de références utilisées.....	31
Tableau IX : Répartition des ERG selon le service et le type de prélèvement	46
Tableau X : Entérocoques et antibiorésistance	48
Tableau XI : Résultats de dépistage de l'ERG et de SARM.....	49
Tableau XII : Résultats de l'enquête de l'environnement	50

Les entérocoques sont des bactéries commensales de la flore digestive qui peuvent être responsables d'infections invasives. Leur résistance aux glycopeptides (ERG) a émergé d'abord aux États-Unis et plus récemment en Europe et commence à faire son apparition en Algérie.

Dans le but d'étudier les caractéristiques épidémiologiques et de déterminer le mécanisme de résistance des entérocoques aux glycopeptides, nous avons réalisé une étude au niveau du laboratoire central du CHU Blida, hôpital Frantz Fanon, portant sur l'ensemble des ERG isolés de différents types de prélèvements.

L'étude s'est répartie en deux volets, une étude rétrospective étalée sur une période de cinq ans, allant de janvier 2011 à décembre 2015 suivie d'une étude prospective ayant une durée de 04 mois, de janvier 2016 à avril 2016.

19 souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides ont été isolées des prélèvements des patients hospitalisés au niveau du CHU de Blida.

La recherche et l'identification des ERG ont été effectuées par l'examen cytotobactériologique des différents types de prélèvements.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon les recommandations de la CLSI.

Les résultats obtenus montrent un taux de 5,88 % d'entérocoques résistants aux glycopeptides.

Les ERG sont fréquemment isolés chez des patients hospitalisés, majoritairement dans les services du Centre Anti-Cancer.

L'*Enterococcus faecium* est l'espèce la plus fréquente.

En raison du potentiel de dissémination rapide de ce germe dans les hôpitaux et le risque de transmission des gènes de résistance aux glycopeptides à d'autres bactéries hospitalières, en particulier au staphylocoque doré résistant à la méticilline, d'importantes mesures de contrôle doivent être mises en place permettant ainsi la prévention de la survenue d'une épidémie redoutable.

Mots clés : Entérocoques, *Enterococcus faecium*, glycopeptides, résistance

Enterococci are commensal bacteria of the intestinal flora; they are responsible of rare hospital infections. Their resistance to glycopeptides (ERG) is first emerged in the United States, more recently in Europe and begins to emerge in Algeria.

In order to study the epidemiological characteristics and determine the mechanisms of resistance to glycopeptides in enterococci, we have realized a study at the central laboratory of CHU Blida, Frantz Fanon unit.

Our study was done on all ERG isolated from different types of samples. It was divided in two parts, a retrospective study over a period of five years, from January 2011 to December 2015 followed by a prospective study with a term of 04 months from January 2016 to April 2016.

Our study was performed on 19 strains of enterococci resistant to glycopeptides isolated from samples of patients who were hospitalized at the CHU Blida.

Research and identification of ERG were performed by cytobacteriological examination of different types of samples.

The study of antibiotic susceptibility was performed according to the recommendations of the CLSI.

The results showed a rate of 5.88% of glycopeptide-resistant enterococci.

The ERG was frequently isolated from hospitalized patients, mainly in the Anti-Cancer Centre.

The Enterococcus the most encountered was the *Enterococcus faecium*,

Because of the potential spread of this organism in hospitals and the risk of transmission of glycopeptide resistance gene to other hospital bacteria, especially *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin, important control measures must be up allowing the eviction of a dangerous epidemic.

Key words : enterococci, *Enterococcus faecium*, glycopeptides, resistance

INTRODUCTION

Les entérocoques appartiennent à la flore commensale du tractus gastro-intestinal humain. Ils sont habituellement inoffensifs. Cependant, quand la relation commensale avec l'hôte est perturbée, les entérocoques peuvent provoquer des pathologies invasives comme des endocardites, des bactériémies, des méningites, des infections urinaires ou des infections de plaie.

Les glycopeptides sont une famille d'antibiotiques qui comprend la vancomycine et la teicoplanine. Ils étaient longtemps considérés comme alternative thérapeutique d'infection due à des bactéries à Gram positif multirésistantes, actuellement ils sont confrontés à des problèmes de résistance notamment chez les entérocoques « Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) ».

Depuis le premier cas isolé en Europe en 1986, les ERG ont émergé comme d'importants pathogènes responsables d'infections nosocomiales, actuellement ils constituent un problème majeur dans les établissements de soins vu :

- Leur très grande résistance dans l'environnement qui leur permet une survie prolongée ;
- La mauvaise compliance aux procédures d'hygiène et de lavage des mains par le personnel soignant, favorise leur dissémination rapide en milieu hospitalier ;
- Leur capacité à transférer les gènes de résistance à des bactéries à Gram positif plus pathogènes tel que les staphylocoques dorés.

Ceci a stimulé une intense recherche pour élucider à la fois l'épidémiologie, les mécanismes de résistance et les facteurs de risque responsables de l'apparition et de la dissémination de ces pathogènes dans le seul but d'améliorer la prise en charge thérapeutique des infections dû aux ERG et de diminuer leur dissémination en milieu hospitalier.

Nous répondons à cet objectif par ce travail réalisé au laboratoire central du CHU Blida hôpital FRANTZ FANON, qui consiste à :

- Evaluer le taux d'isolement des ERG au sein de notre établissement.
- Déterminer les caractéristiques épidémiologiques ainsi que les méthodes de détection des ERG.



CHAPITRE I : GENERALITES

I.1. Les entérocoques :

I.1.1. Définition :

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif qui se présentent sous forme de diplocoques ou de coques en chaînettes. Ce sont des bactéries anaérobies aéro-tolérantes. Cette famille contient plusieurs espèces, les deux principales sont l'*Enterococcus faecalis* et l'*Enterococcus faecium* (A.AGUILAR-GALVEZ et al 2012, K.STUCKI et al 2014).

I.1.2. Classification :

La famille des entérocoques englobe une trentaine d'espèces qui ont longtemps été classées dans le genre des streptocoques au vu de leurs similitudes avec les streptocoques du groupe D. La classification adoptée est celle de Schleifer et Kilpper-Bälz 1984 :

Règne : Bacteria ou Eubacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Lactobacillales

Famille : *Enterococcaceae*

Genre : *Enterococcus*

Espèce : une trentaine d'espèces

Enterococcus faecalis 80-90%

Enterococcus faecium 5-10%

(J-M.HARDIE et R-A.WHILEY 1997, G.CORRIEU et F-M.LUQUET 2008, A.AGUILAR-GALVEZ et al 2012)

I.1.3. Habitat :

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux, ils sont également présents sur les muqueuses génitales et sont plus accessoirement retrouvés dans l'oropharynx et sur la peau.

Les entérocoques peuvent être également retrouvés dans l'environnement, dans la poussière, sur les végétaux et dans l'eau, où leur présence est le témoin d'une contamination fécale (J-P.AVRIL et al 1992, M.ARCHAMBAUD et D.CLAVE 2007).

I.1.4. Les caractères bactériologiques :

I.1.4.1. Caractères morphologiques :

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif d'aspect ovoïdes de dimensions inégales, regroupés en diplocoques ou en courtes chaînettes, ils sont dépourvus de capsules et de spores, ils sont immobiles, à l'exception d'*Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus gallinarum* (C.DELMAS 2003, M.ARCHAMBAUD et D.CLAVE 2007).

I.1.4.2. Caractères culturels :

Les entérocoques sont des anaérobies aéro-tolérant. Ils sont non exigeants présentant un trouble en bouillon et des colonies légèrement opalescentes de 0,5-1mm de diamètre sur gélose nutritive.

Ils poussent facilement sur géloses au sang : les colonies peuvent être non hémolytiques ou alpha-hémolytiques. Elles sont larges de plus au moins 1,5 mm de diamètres et peuvent être opaques ou blanchâtres.

Sur un milieu bile-esculine (BEA), les entérocoques hydrolysent l'esculine en présence de 40% de bile.

Les entérocoques sont des micro-organismes mésophiles qui se développent dans une gamme de températures allant de 10 à 45 °C, avec une température optimale de 35 °C. Certaines espèces peuvent survivre à 60 °C pendant 30 min. Ils poussent dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl et en milieu très alcalin (bouillon PH 9,6).

Des milieux sélectifs contenant des antibiotiques (acide nalidixique et colistine) permettent de sélectionner les entérocoques d'un échantillon poly-microbien (**K.SCHLEIFER et R.KILPPER-BÄLZ 1984, D.LEBLANC 2006**).

I.1.4.3. Caractères biochimiques :

Certains caractères d'identification permettent la distinction entre les entérocoques et les streptocoques du groupe D, ils sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Caractères de différenciation entre les entérocoques et les streptocoques

	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Croissance à 10°C	+	-
NaCl 6,5 %	+	-
PyrA	+*	-**
Mobilité	-***	-
Bile esculine	+	-****

* *Enterococcus cecorum*, *E.columbae* et *E.saccharolyticus* sont Pyr –

** *Streptococcus pyogenes*, *S.iniae*, *S.porcinus* et quelques souches de *S.pneumoniae* sont PYR +

*** à l'exception d'*Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus gallinarum*.

**** 5 à 10% des streptocoques oraux sont bile-esculine +

Pyr A : pyrrolidonyl-aryl-amidase

(**J-P.AVRIL et al 1992, C.DELMAS 2003**)

Les caractères communs de la famille des *Enterococcaceae* sont : Oxydase (-) Catalase (-) Gaz (-) ADH (+) Sorbitol (-) Saccharose (+) Mannitol (+), la production de Leucine aminopeptide (LAP) et de l'acide lactique, ainsi que la pyrrolidonyl-arylamidase (PyrA) (**K.SCHLEIFER et R.KILPPER-BÄLZ 1984, D.LEBLANC 2006**). Les autres paramètres biochimiques permettant la différenciation des espèces entre elles, sont cités dans le tableau ci-après :

Tableau II : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Enterococcus*

	Mobilité	Pigment	Résistance au tellurite	Production d'acétone	Hydrolyse d'arginine	Arabinose	Raffinose
<i>E.faecalis</i>	-	-	+	+	+	-	-
<i>E.faecium</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>E.gallinarum</i>	+	-	-	V	+	-	+
<i>E.casseliflavus</i>	+	+	-	V	V	+	V
<i>E.durans</i>	-	-	-	+	+	-	-
<i>E.hirae</i>	-	-	-	+	+	-	v
<i>E.avium</i>	-	-	-	V	-	+	-
<i>E.raffinusus</i>	-	-	-	V	-	+	+

(+) positif (-) négatif (v) variable

(L.MINOR et M.VERON 1989, E.HERNANDEZ et al 1999)

I.1.4.4. Caractères antigéniques :

Les entérocoques possèdent généralement l'antigène du groupe D de Lancefield, il est fixé sur la paroi et est constitué par l'acide lipoteichoïque.

Il existe également d'autres antigènes comme les protéines (enzymes en particulier), des polysaccharides et les acides teichoïques, l'antigène polysidique de la paroi cellulaire est spécifique de type chez certains entérocoques (*E.faecalis* et *E.avium*) (L.MINOR et M.VERON 1989).

I.1.4.5. Facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence les plus couramment étudiés chez les entérocoques sont la production de substances d'agrégation, la production de cytolysine, bactériocine et les enzymes.

- **Bactériocines** : le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, dénommées entérocoques. Ces bactériocines sont des peptides de faibles poids moléculaires constitués de 20 à 60 acides aminés cationiques et amphiphiles. Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (M.VAN-BELKUM et M.STILES 2000, H.CHEN et D.HOOVER 2003, C.DORTU et P. THONART 2009).

- **La substance d'agrégation (SA)** : est une adhésine de nature glycoprotéique codée par un gène plasmidique régulé par des phéromones. Ces dernières favorisent le lien à des récepteurs de la surface des eucaryotes, jouent un rôle essentiel dans la colonisation de l'hôte (B-D.JETT et al 1994) et facilitent le transfert des plasmides. L'adhérence des bactéries aux tissus de l'hôte étant une étape cruciale dans le processus d'infection, la présence de SA dans les souches peut conduire à l'accroissement de la capacité de colonisation (T-J.EATON et M-J.GASSON 2001).

- **La cytolysine** : ou β -hémolysine est le facteur de virulence le plus étudié. Cette toxine peptidique lyse les cellules animales en générant des pores dans la membrane cellulaire. La production de cytolysine semble être un facteur de risque important lié aux entérocoques

pathogènes, ce mécanisme de lyse étant une stratégie bactérienne pour contourner les réactions immunitaires chez l'hôte (D.LEBLANC 2006).

Les gènes de cytolysine sont souvent portés par des plasmides et régulés par des phéromones. Une étude suggère que la combinaison d'hémolysine et de la substance d'agrégation entraîne une mortalité accrue dans l'endocardite due à *E.faecalis* (J-W.CHOW et al 1993).

- **La gélatinase** : est l'un des facteurs de virulence largement étudié chez *E.faecalis* (M-F.DELPAPA et al 2007), il s'agit d'une Zn-métalloprotéase capable d'hydrolyser la β -insuline, la gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine et d'autres peptides biologiquement actifs (B-D.JETT et al 1994, K.FISHER et C.PHILLIPS 2009). En outre, la gélatinase contribue au processus de formation de biofilm, ce qui peut accroître la capacité des entérocoques à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (M-F.DELPAPA et al 2007).

- **Autres facteurs** : sont les enzymes hydrolytiques produites tel que l'hyaluronidase (enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, constituant majeur de la matrice extracellulaire des cellules animales (F-H.KAYSER 2003)), et la sérine protéase (K.FISHER et C.PHILLIPS 2009).

I.1.5.Pouvoir pathogène :

Les entérocoques ne sont pas des bactéries très virulentes. 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, ils sont donc des bactéries opportunistes (B-D.JETT et al 1994, N.BEN-OMAR et al 2004).

Les infections à entérocoque surviennent le plus souvent dans un environnement hospitalier, les entérocoques représentent 10 à 12% des infections associées aux soins (B-S.HARVEY et al 1992, L-M.HALL et al 1992).

Les deux espèces les plus couramment rencontrées dans les infections humaines sont *E.faecalis* (80 à 90 %) et *E.faecium* (5 à 10 %) (F-H.KAYSER 2003, J.SANCHEZ et al 2007).

Les infections associées aux entérocoques sont :

- Endocardite : ils sont classés au 3^{ème} rang des germes responsables d'endocardite aigüe après les streptocoques et les staphylocoques (5-10%), la porte d'entrée peut être digestive ou génito-urinaire (P.PARIZE et J-L.MAINARDI 2011).

- Infections urinaires : elles sont rares en milieu communautaire mais assez fréquente en milieu hospitalier (P.MONTRAVERS et C-L.CARBON 1994).

- Bactériémies : elles sont nosocomiales de pronostic sévère, la porte d'entrée est généralement urinaire et peut être endocarditique, biliaire, intra abdominale ou cutanée (J-L.AVRIL et al 1992).

- Infection abdomino-pelvienne : péritonites, infections du tractus biliaire, infections post-opératoires, abcès pelviens, endométrites du post partum et salpingites (P.MONTRAVERS et al 1995).

- Infections néo-natales : suite à un portage vaginal, elles sont moins fréquentes que celles causées par les Streptocoques du groupe B, *E.Coli* et *Listeria monocytogenes*.

- Infections de la peau et des tissus mous : grands brûlés et ulcère des pieds diabétiques (P.BERCHE et al 1988, B-E.MURRAY 1990).

- Méningites et infections du système nerveux central (SNC) : très rares mais d'évolution fatale suite à un traumatisme crânien ou à une malformation du SNC, elles sont très souvent inoculées suite aux procédures neuro-chirurgicales et aux injections intra trachéales.

- Infections ostéo-articulaires suite à une septicémie ou endocardite.
- Quelques cas de pneumonies (J.ALOUF 1994).

I.2. Les antibiotiques :

I.2.1. Définition :

Les antibiotiques (ATB) sont des molécules à activité antibactérienne. Ils sont soit d'origine biologique, c'est à dire produits par des micro-organismes, semi synthétique ou synthétique obtenus par modification chimique d'une molécule de base naturelle.

Ils agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires perturbant une étape essentielle du métabolisme des bactéries (synthèse protéiques, synthèse des acides nucléiques, réplication, transcription, transport transmembranaire...) par leur effet bactéricide ou bactériostatique (D.YALA et al 2001, A.BENSLIMANI et al 2011).

I.2.2. Classification des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur mode d'action, leur spectre d'activité l'origine de la molécule et la structure chimique de l'antibiotique.

Selon leur structure chimique, les antibiotiques sont classés comme suit (M-H.ANDRE et al 1998) :

I.2.2.1. Les bêta-lactamines :

Elles constituent le groupe d'antibiotiques le plus utilisé. Elles sont bactéricides grâce à l'hétérocycle azétidinone qui comprend une fonction lactame (amide intra cyclique).

Quatre groupes de bêta-lactamines peuvent être décrit, en fonction de leurs caractéristiques structurales (J-L.FAUCHERE et J-L.AVRIL 2002) :

***Les pénames (pénicillines) :**

On distingue plusieurs sous classes selon la nature de la chaîne latérale reliée à l'acide amine-6-pénicillinique :

- Pénicillines G : elles sont à spectre limité vers les coques à Gram + et à Gram -, bacilles à Gram+, clostridies, tréponèmes et leptospires. Elles sont sans action sur les bactéries sécrétant les bêta-lactamases.
- Pénicillines M : indiquées pour les infections à staphylocoques producteurs de pénicillinases.
- Pénicillines A : sont des aminopénicillines à spectre élargi vers les bacilles à Gram- (certaines entérobactéries).
- Autres pénicillines : Carboxypénicillines, Uréidopénicillines, Pivmécillinam (amidinopénicilline) (D.YALA et al 2001).

***Les céphèmes (céphalosporines) :**

Elles sont synthétisées à partir de la céphalosporine C, produit de fermentation d'un champignon *Cephalosporium acremonium*, les céphalosporines sont classées selon leur apparition en :

- Céphalosporines de 1^{er} génération : elles sont actives sur les bacilles à Gram - .
- Céphalosporines de 2^{ème} génération : elles possèdent un pouvoir anti-bactérien un peu plus élevé (CMI plus basses) elles agissent sur certaines bactéries résistantes aux céphalosporines de 1^{ère} génération (L.MINOR et M.VERON 1989).
- Céphalosporines de 3^{ème} génération : elles sont à large spectre, elles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram- que sur les bactéries à Gram+, certaines sont actives sur le pseudomonas.

Elles sont inactives sur les entérocoques.

- Céphalosporines de 4^{ème} génération : elles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram- que sur les bactéries à Gram+, actives sur *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries (A.BENSLIMANI et al 2011).

***Autres bêta-lactamines :**

- Les Pénèmes : l'imipénème.

- Les Monobactames : l'aztréonam.

- Les inhibiteurs des bêta-lactamases : l'acide clavulanique, le sulbactam, le tazobactam (J-M.GAZANGEL 2013).

I.2.2.2.Les aminosides :

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Leur spectre est essentiellement orienté vers les bacilles à Gram- aérobies, les staphylocoques et les bacilles à Gram + (D.YALA et al 2001, C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.2.2.3.Les macrolides et apparentés :

Les macrolides possèdent un noyau lactone central, leur spectre d'action est étroit, voisin de celui de la pénicilline G, il recouvre les cocci à Gram+, le gonocoque, *Mycoplasma pneumoniae* et quelques bacilles à Gram- aérobies, *Campylobacter* et *Legionella* (M-H.ANDRE et al 1998, J-M.GAZANGEL 2013).

I.2.2.4.Les glycopeptides :

Ce sont des antibiotiques à structure complexe hétérocyclique associant une partie peptidique, une partie osidique et des chaînes d'acides gras. Leur spectre d'activité est étroit, ces molécules agissent sur les bactéries à Gram + (les staphylocoques, entérocoques, streptocoques, Corynébactéries, *Listeria*) et certaines souches anaérobies, *Clostridium*, *Bacteroides*.

Elles sont utilisées en milieu hospitalier dans le traitement des infections sévères à cocci à Gram positif (staphylocoques méticillino-résistants, entérocoques) (M.SCHAECHTER et al 1999, A.BENSLIMANI et al 2011).

I.2.2.5.Autres antibiotiques :

- Quinolones

- Tétracycline

- Phénicolés

- Rifamycines

- Nitro-imidazolés

- Sulfamides (L-M.PRESCOTT et al 2011, J-M.GAZANGEL 2013).

I.2.3.Mécanisme d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques agissent sur une des étapes essentielles du métabolisme bactérien, on distingue :

I.2.3.1.Les antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane :

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques reliées par des peptides. Cette molécule n'existe que chez les bactéries et assure la rigidité de la paroi. Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du

peptidoglycane. Il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie. Les bêta-lactamines et les glycopeptides bloquent la phase finale de polymérisation. Les bêta-lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane en se fixant de manière covalente sur les protéines membranaires liant la pénicilline (PLP). Quant aux glycopeptides ils inhibent la synthèse du peptidoglycane par blocage de la transglycosylation.

En revanche, la fosfomycine agit en phase précoce de la synthèse du peptidoglycane par inhibition de la pyruvyl-transférase impliquée dans la formation de l'acide N-acétyl-muramique précurseur du peptidoglycane (M.SCHORDERT 1989, C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.2.3.2. Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique :

Les polymixines se fixent sur les phospholipides membranaires, elles perturbent ainsi les transferts transmembranaires de nutriments et inhibent les phosphorylations oxydatives du métabolisme énergétique dont les enzymes se trouvent au niveau de la membrane cytoplasmique (A.BENSLIMANI et al 2011).

I.2.3.3. Les antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines :

Plusieurs familles d'antibiotiques peuvent inhiber, par différents mécanismes, l'élongation de la chaîne polypeptidique chez les bactéries.

Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome :

Les aminosides et les tétracyclines perturbent la lecture des ARN messagers suite à cette fixation et provoquent la synthèse des protéines anormales non fonctionnelles (C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50 S du ribosome :

Les macrolides et apparentés se fixent sur la fraction 50S du ribosome. Ils inhibent la translocation et la transpeptidation, favorisant ainsi la libération prématurée du complexe ARNt-peptide du ribosome (D.YALA et al 2001).

Antibiotique inhibant le facteur d'élongation G :

Acide fusidique (C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.2.3.4. Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques :

Les sulfamides et le triméthoprime bloquent la synthèse des folates à deux niveaux différents en inhibant respectivement la dihydroptérate synthétase et la dihydrofolate réductase ce qui leur assure un effet synergique.

Les quinolones inhibent des topoisomérases, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN, et plus particulièrement la topoisomérase II (ADN gyrase) et la topoisomérase IV en se fixant sur le complexe formé par la topoisomérase et l'ADN.

Les nitro-imidazoles sont réduits dans les bactéries anaérobies et forment des métabolites qui oxydent l'ADN et provoquent sa fragmentation.

Les rifamycines inhibent l'ARN polymérase ADN-dépendante en se liant à leur cible de manière covalente. Il en résulte un arrêt de la synthèse des ARN messagers (C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.2.4. Les résistances des bactéries aux antibiotiques :

I.2.4.1. Définition :

Une souche est dite « résistante » lorsqu'elle supporte une concentration d'ATB notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (L.MINOR et M.VERON 1989, J-L.FAUCHERE et J-L.AVRIL 2002).

I.2.4.2. Types de résistance :

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise.

- **La résistance naturelle** est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique (L.MINOR et M.VERON 1989).

- **La résistance acquise** résulte d'une modification du patrimoine génétique. Il peut s'agir d'une mutation portant sur le chromosome qui peut entraîner, par exemple, une modification de la cible de l'antibiotique ou bien diminuer sa pénétration ou le plus souvent il s'agit de l'acquisition d'ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes (C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.2.4.3. Mécanismes de résistance :

On peut classer les mécanismes de résistance en 3 groupes :

- Synthèse des enzymes inactivant l'antibiotique :

C'est l'un des mécanismes le plus souvent en cause. Les bactéries produisent des enzymes qui inactivent l'antibiotique par modification de sa structure chimique ou par hydrolyse.

Exemple : Enzymes inactivant les bêtalactamines (les bêtalactamases), Enzymes inactivant les aminosides (les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases et les phosphotransférases) (B.ROUVEIX 1990, J-P.LAVIGNE 2007).

- Modification de la cible :

- Modification des PLP : par synthèse de nouvelles PLP de très faible affinité vis-à-vis des bêtalactamines.

- Modifications du précurseur du peptidoglycane.

- Modifications du ribosome.

- Modifications des topoisomérases.

- Modifications de l'ARN-polymérase.

- Modifications des enzymes impliquées dans la synthèse des folates.

- Modifications du facteur d'élongation G (M.SCHAECHTER et al 1999, J-P.LAVIGNE 2007, B.DOUBLET et al 2012).

- Diminution d'antibiotique atteignant la cible :

*Diminution ou absence de perméabilité :

Les porines sont des protéines formant des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif et permettant le passage de certaines molécules hydrophiles. Des mutations peuvent entraîner la perte de certaines porines et de ce fait entraver la pénétration de certains antibiotiques. Ces mutations peuvent entraîner la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques simultanément (J-D.CAVALLO et al 2004).

*Système d'efflux :

Diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par des protéines membranaires qui le refoulent activement hors de la bactérie. Ce phénomène a été décrit surtout chez les bactéries à Gram négatif (C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.3. Résistance aux antibiotiques chez les entérocoques :

Les entérocoques sont des bactéries résistantes et tenaces dont on ne se débarrasse pas facilement (L.MINOR et M.VERON 1989) ils présentent des résistances naturelles multiples aux antibiotiques, dont les pénicillines, les céphalosporines, les aminosides à bas niveau, les fluoroquinolones, les sulfamides et les lincosamides (J.FRENEY et al 2007), ils ont par ailleurs acquis souvent la résistance de haut niveau aux aminosides, aux tétracyclines, aux macrolides, parfois au chloramphénicol (L.MINOR et M.VERON 1989, J.FRENEY et al 2007).

I.3.1. Résistances naturelles :

Ces résistances sont résumées dans le tableau ci-après :

Tableau III : Phénotype sauvage des entérocoques (original)

Famille d'antibiotique		Phénotype sauvage
Bêta-lactamines	Pénicilline G	R
	Pénicilline M	R
	Urédopénicillines	S*
	Imipénème	S*/S***
	Céphalosporines	R
Aminosides	Streptomycine	RBN
	Gentamycine	RBN
	Tobramycine	RBN
	Kanamycine	RBN
	Amikacine	RBN
Macrolides et apparentés	Streptogramine A	S**
	Streptogramine B	S
	Lincosamine	S**
	Clindamycine	S**
	Macrolides	S
Phénicolés	Chloramphénicol	S
Tétracyclines		S
Fluoroquinolones		S*
Fosfomycine		R
Sulfamides		R
Furane		S***

S : Sensible R : Résistant RBN Résistant Bas Niveau

*peu sensible, ** *E. faecalis* est résistant *** *E. faecium* est résistant

I.3.1.1. Les bêta-lactamines :

Les entérocoques possèdent une résistance naturelle (de niveau intermédiaire) aux pénicillines, du fait de la faible affinité de leurs protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Les urédopénicillines, l'imipénème et les aminopénicillines sont légèrement plus actives que la pénicilline G alors que les céphalosporines sont inactives (L.MINOR et M.VERON 1989, C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.3.1.2. Les aminosides :

Les entérocoques possèdent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (CMI comprise entre 8 et 16 mg/L) du fait d'un transport inefficace à travers la membrane cytoplasmique lié à un défaut d'énergie oxydative au niveau de la paroi des entérocoques qui ont un métabolisme anaérobie facultatif qui limite l'entrée des aminosides (J-C.GRAHAM et F-K.GOULD 2002).

En effet, le transport des aminosides à travers la membrane cytoplasmique des bactéries est un mécanisme oxygène-dépendant. Les aminosides sont donc inactifs sur les pathogènes anaérobies. Ce bas niveau de résistance permet cependant une action synergique dans le traitement d'infections sévères à entérocoques avec les pénicillines ou les glycopeptides (L.GUTMAN 1994, J-W.CHOW 2000, N.TROILLET et F.BALLY 2011).

L'espèce naturellement la plus résistante est *E.faecium* qui synthétise une 6'-N-aminoglycoside-acétyl-transférase (AAC6') qui inactive la kanamycine, la tobramycine, la nétilmicine, ainsi que l'amikacine mais sans toucher la gentamicine et la streptomycine (C.DELMAS 2003, M.ARCHAMBAUD et D.CLAVE 2007, J.FRENEY et al 2007).

I.3.1.3. Les autres antibiotiques :

Les macrolides et les fluoroquinolones ont une mauvaise activité sur les entérocoques de même que la rifampicine qui est inconstamment active. Les entérocoques sont également naturellement résistants aux sulfamides et à la fosfomycine (résistance de bas niveau) (R.LECLERCQ 2002).

En plus de ces résistances communes à tous les entérocoques, *E.faecalis* possède une résistance naturelle aux lincosamides et au composé A des streptogamines (K-V.SINGH et al 2002, J.FRENEY et al 2007).

E.faecium est naturellement résistant aux furanes (M.ARCHAMBAUD et D.CLAVE 2007).

I.3.2. Résistances acquises :

I.3.2.1. Les bêta-lactamines :

Deux mécanismes ont été actuellement identifiés :

- La production d'une pénicillinase d'origine plasmidique décrite principalement chez *E.faecalis* (L.MINOR et M.VERON 1989) responsable d'une inactivation de la pénicilline, des aminopénicillines et des uréidopénicillines mais ne touche pas l'imipénème. L'activité des pénicillines est restaurée par les inhibiteurs des bêta-lactamases (O.LESENS et al 2006).

- La modification des protéines de liaisons aux pénicillines (PLP) touche la plupart des souches d'*E.faecium* mais reste rare chez *E.faecalis*. La résistance à la pénicilline G, secondaire à ce mécanisme est forte mais il existe encore une synergie entre les pénicillines et la gentamicine in vitro tant que les CMI des pénicillines restent inférieures à 100 mg/L (J-C.QUINCAMPOIX et J-L.MAINARDI 2001, O.LESENS et al 2006).

I.3.2.2. Les aminosides :

Trois mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de haut niveau aux aminosides chez les entérocoques : altération de la cible ribosomale, modification du transport de l'antibiotique et l'acquisition d'enzymes inactivatrices des aminosides. Les deux premiers mécanismes sont, en général, la conséquence de mutations chromosomiques. Le troisième, de support principalement plasmidique, est le plus fréquemment rencontré (S.DUTKA-MALEN et P.COURVALIN 1994, J-I.WACHINO et Y.ARAKAWA 2012).

Chaque enzyme reconnaît un certain nombre d'aminosides avec une affinité plus ou moins grande.

La présence d'une enzyme modificatrice supprime toute synergie entre les aminosides et les pénicillines ou entre les aminosides et les glycopeptides (J-C.QUINCAMPOIX et J-L.MAINARDI 2001, R.LECLERCQ 2002).

I.3.2.3. Les glycopeptides :

Ces dernières années une résistance aux glycopeptides a commencé à se répandre. Elle peut intéresser la vancomycine seule ou l'ensemble des glycopeptides (C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

I.3.2.4. Résistances associées :

La résistance associée aux pénicillines, aux glycopeptides et éventuellement aux aminosides est surtout décelée chez *E.faecium* (E.HERNANDEZ et al 1999, R.LECLERCQ 2002).

CHAPITRE II : ENTEROCOQUES ET GLYCOPEPTIDES

II.1. Glycopeptides :

La famille des glycopeptides constitue une classe relativement restreinte d'antibiotiques. Deux antibiotiques d'usage exclusivement hospitalier sont actuellement disponibles : la vancomycine et la teicoplanine. Fréquemment prescrits dans le traitement d'infections sévères à bactéries à Gram positif (L-M.KALTENBACH et R.VISTELLE 1998, C.RABAUD et T.MAY 2000, J-L.MAINARDI 2011).

Ce sont de volumineuses molécules de haut poids moléculaire (1450 daltons pour la vancomycine et 1890 daltons pour la teicoplanine). Ils comportent un noyau central peptidique de sept acides aminés leur conférant une structure tridimensionnelle en forme de poche d'aspect rigide, dont le rôle est primordial lors de la liaison de l'antibiotique à sa cible sur la paroi cellulaire (J-C-J.BARNA et D-H.WILLIAMS 1984). (Figure 1)

Les différences entre les glycopeptides se situent au niveau des acides aminés 1 et 3 et des substrats attachés aux groupes aromatiques des acides aminés (R.NAGARAJAN 1991).

La formule empirique de la vancomycine est $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ et ses acides aminés 1 et 3 sont respectivement la leucine et une asparagine alors qu'il s'agit de deux hydroxyphényl-glycines pour la teicoplanine.

La vancomycine est hydrosoluble si le pH est inférieur à 4 et la teicoplanine est hydrosoluble et liposoluble, ce qui permet une meilleure pénétration tissulaire (F.PARENTI 1986, A-H.WILLIAMS et R-N.GRUNENBERG 1988, M.LEONE et al 2000).

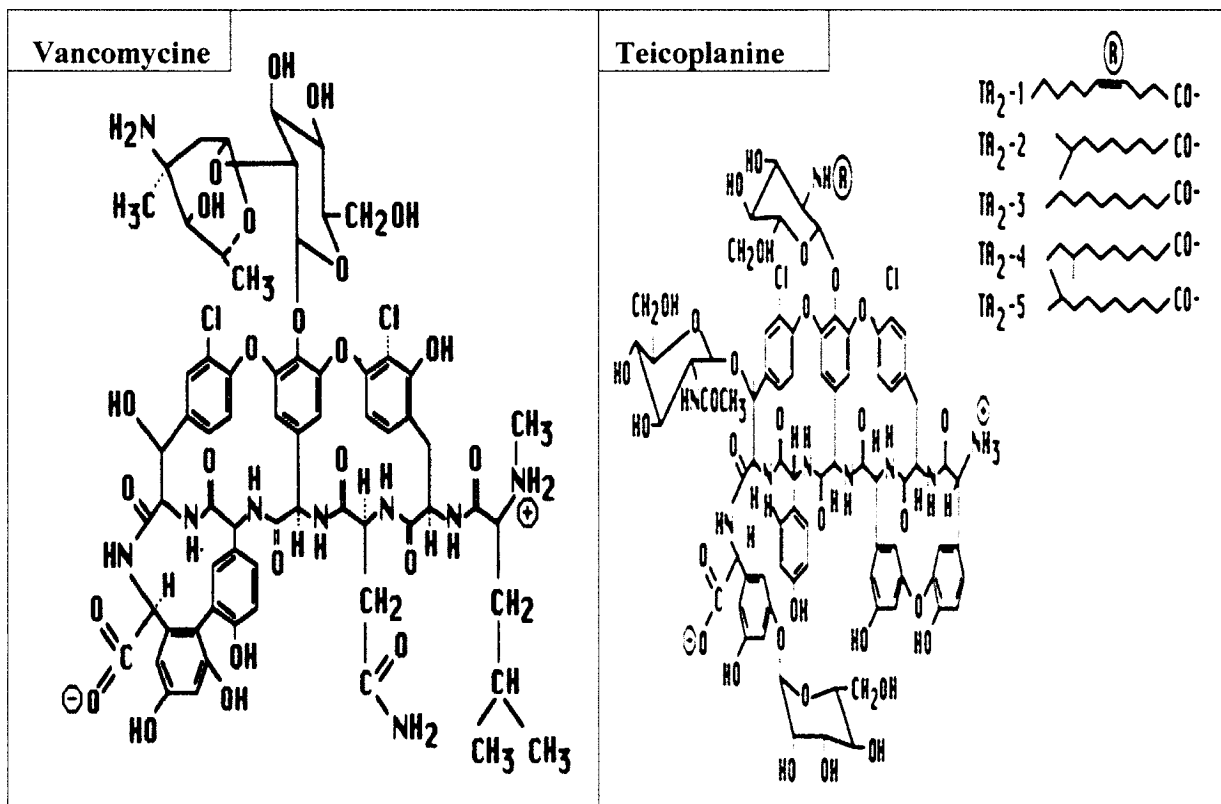


Figure 1 : Structure chimique des glycopeptides (A-P.JOHNSON et al 1990)

II.2.Mécanisme d'action des glycopeptides :

Les glycopeptides possèdent une activité bactéricide lente temps-dépendante, maximale sur les bactéries en phase de multiplication active (L-M.KALTENBACH et R.VISTELLE 1998). Leur mécanisme d'action principal est l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane avec pour conséquence la lyse bactérienne (L.MINOR et M.VERON 1989), le peptidoglycane constituant principal de la paroi des bactéries à Gram positif, est composé d'une macromolécule, dont la structure réticulée résulte de la polymérisation de sous-unités composées de diosides (J-S.ANDERSON et al 1967, G-D.SHOCKMAN et J-F.BARREN 1983). Leurs précurseurs, les disaccharidepentapeptides (DSP), sont synthétisés dans le cytoplasme, puis transférés à la surface extérieure de la membrane cytoplasmique et incorporés dans le peptidoglycane préexistant (J-C-J.BARNA et D-H.WILLIAMS 1984).

Plusieurs enzymes interviennent dans cette étape dont la transglycosylase qui permet la liaison du DSP au peptidoglycane préexistant et la transpeptidase qui assure la liaison entre les chaînes polysaccharidiques. Ces deux enzymes clivent la liaison D-Alanine-D-Alanine, puis relient la D-Alanine (D-Ala) avec l'acide aminé porté par un pentapeptide d'une autre chaîne polysaccharidique (P-E.REYNOLDS 1989).

Une troisième enzyme, la DD-carboxypeptidase régule la croissance du peptidoglycane après transformation du pentapeptide en tétrapeptide par excision d'un D-Ala. Les glycopeptides, en se liant aux DSP, forme au niveau du D-Ala-D-Ala terminal une poche rigide, qui gêne le positionnement des transglycosylases et masque le site d'action des transpeptidases (R.NAGARAJAN et al 1994). Cette double action entraîne l'inhibition de la croissance puis la mort bactérienne (M.LEONE et al 2000).

Pour la vancomycine, une inhibition de la synthèse d'ARN (D-C.JORDAN et W-E.INNISS 1959) et une altération de la perméabilité membranaire (D-C.JORDAN et H-D-C.MALLORY 1964) sont deux mécanismes d'action supplémentaires décrits (L-M.KALTENBACH et R.VISTELLE 1998).

II.3.Résistance des entérocoques aux glycopeptides :

II.3.1.Mécanisme de résistance :

Peu de résistances se sont développées après quatre décennies d'utilisation des glycopeptides. Ces dernières années, des mécanismes de résistance ont été mis en évidence d'une part chez des entérocoques principalement ceux de l'espèce *Enterococcus faecium* (M.FINES et al 2007, S.DEKEYSER et al 2011), et plus récemment chez des staphylocoques. Ces mécanismes de résistance sont très élaborés et différents d'une espèce à l'autre.

La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques peut être :

- Naturelle, qui est observée chez les espèces *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus flavescens*. Ces espèces contiennent un gène vanC qui typiquement confère une résistance de bas niveau à la vancomycine.
- Ou acquise, qui est observée principalement chez l'espèce *Enterococcus faecium*, mais également parfois chez *Enterococcus faecalis*. Chez ces espèces, la résistance secondaire à l'acquisition du gène vanA est habituellement de haut niveau.

Il existe également d'autres gènes qui induisent la résistance aux glycopeptides (vanB, vanD, vanG...) dont le niveau de résistance est variable vis-à-vis de la vancomycine et la teicoplanine. Ce sont les souches qui ont une résistance acquise que l'on appelle couramment entérocoque

résistant aux glycopeptides (ERG), et cela quel que soit le gène en cause (**J.ROBERT 2007, N.FORTINEAU et al 2008**).

Le mécanisme de résistance est basé sur une modification de la cible des glycopeptides due à la présence d'un opéron de gènes au niveau plasmidique ou chromosomique qui coopèrent (**R.LECLERCQ 1997**), conduisant à la production d'une protéine tronquée ou à des modifications d'acides aminés essentiels à la fixation du substrat, d'où une inactivation de la voie classique de synthèse du peptidoglycane (**V.LEFLON-GUIBOUT et al 2009, O.LESENS 2009**) ce qui aboutit à la production de précurseurs de la paroi bactérienne (peptidoglycane) se terminant par un D-Lactate (D-Lac) au lieu d'un D-Alanine dans le cas de VanA, VanB et VanD ou par une D-Sérine (D-Ser) dans le cas de VanC, VanG et VanE (**M.FINES et al 2007, R.LECLERCQ et V.CATTOIRA 2012**).

II.3.2.Support génétique de la résistance :

- **Génotype Van A** : dans ce cas l'opéron fait participer neuf gènes (vanA, vanH, vanX, vanS, vanR, vanY, vanZ, ORF1 et ORF2) situés sur un transposon Tn 1546 lui-même porté par différents plasmides autotransférables, ces gènes codent pour neuf polypeptides (**S.DUTKA-MALEN et P.COURVALIN 1994, Y.GHOLIZADEH et P.COURVALIN 2000**). (Figure 2)

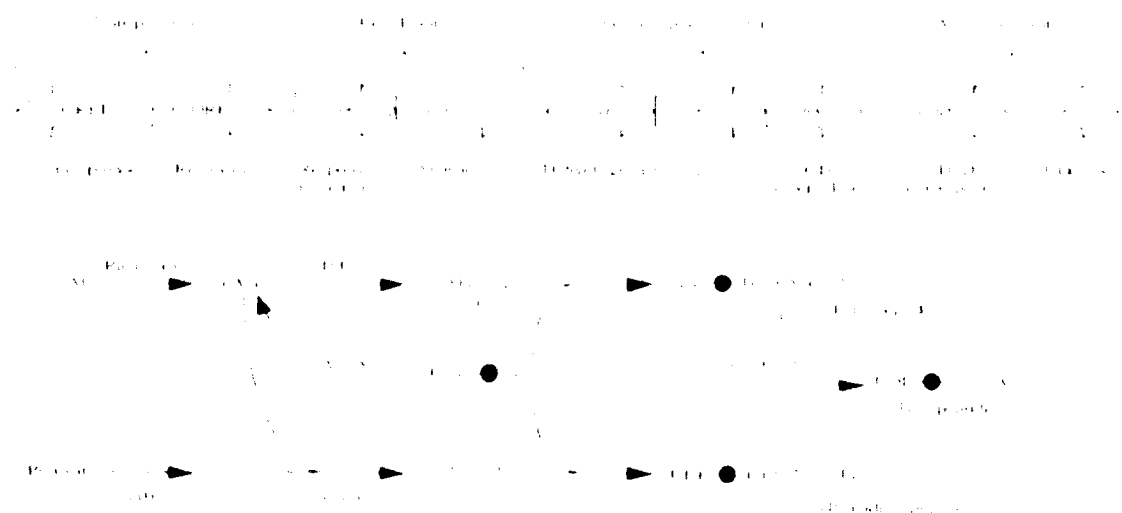


Figure 2 : Structure du transposon Tn1546 et rôles de ses composants
(**Y.GHOLIZADEH et P.COURVALIN 2000**)

(Ddl = D-Ala-D-Ala ligase naturelle, VanA = D-Ala-D-Lac ligase)

Les trois gènes : vanA, vanH et vanX sont essentiels à la résistance aux glycopeptides (**S.DUTKA-MALEN et P.COURVALIN 1994, Y.GHOLIZADEH et P.COURVALIN 2000**). Le gène vanH code pour une lactate-déshydrogénase qui convertit le pyruvate présent dans la bactérie en D-lactate. Le gène vanA code pour une D-Ala-D-Lac ligase qui relie une D-Alanine au D-Lactate pour former le depsipeptide terminal du peptidoglycane. La protéine VanX clive les dimères de D-Ala-D-Ala synthétisés en parallèle par les D-Ala-D-Ala ligases naturelles de la bactérie (**M.ARTHUR et al 1992**).

Les précurseurs du peptidoglycane contenant ce depsipeptide ont une affinité réduite pour la vancomycine ce qui autorise la synthèse de la paroi bactérienne (**P-E.REYNOLDS et**

P.COURVALIN 2005). Ce mécanisme génétique fonctionne sur un mode récessif et l'expression de ces gènes est induite par des concentrations subinhibitrices de glycopeptides. Un système de régulation existe au niveau membranaire : *vanS*, en présence d'antibiotique, active *vanR* qui contrôle l'expression des gènes de résistance. Les protéines accessoires *VanY* et *VanZ* ne sont pas indispensables à l'expression de la résistance.

Les régions ORF1 et ORF2 permettent la transposition de l'opéron dans le génome bactérien (**S.DUTKA-MALEN et P.COURVALIN 1994, M.AARTHUR et al 1999**). La duplication des transposons permet la dissémination de *vanA* chez les entérocoques. L'origine de ces gènes de résistance proviendrait d'espèces bactériennes produisant des glycopeptides (**S.DUTKA-MALEN et P.COURVALIN 1994, M.LEONE et al 2000**).

- **Génotype Van B** : l'opéron *vanB* peut être retrouvé sur divers transposons (Tn1547, Tn1549 ou Tn5382) qui sont le plus souvent chromosomiques, mais peuvent aussi être plasmidiques. L'organisation et les fonctionnalités des opérons *vanA* et *vanB* sont semblables, mais leur régulation diffère (**F.DEPARDIEU et al 2005**). (Figure 3)

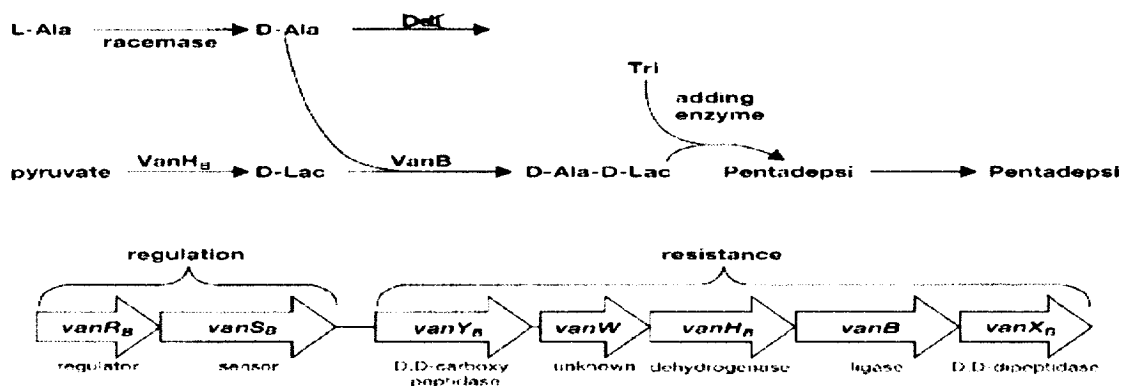


Figure 3 : Résistance aux glycopeptides, type VanB (P.COURVALIN 2006)

Ainsi l'opéron *vanB* contient les gènes de résistance : *vanY_B*, *vanW*, *vanH_B*, *vanB* et *vanX_B*, les trois derniers codent respectivement, pour une déshydrogénase (*VanH_B*) qui réduit le pyruvate en D-Lac, une ligase (*VanB*) pour synthétiser le depsipeptide D-Ala-D-Lac et un DD-dipeptidase (*VanX_B*) pour hydrolyser le dipeptide D-Ala-D-Ala synthétisé par les D-Ala-D-Ala ligases naturelles de la bactérie, il contient aussi les gènes *vanR_B* et *vanS_B* qui codent pour un système de régulation (**S.EVERS et P.COURVALIN 1996, F.DEPARDIEU et al 2003**).

Les trois protéines de résistance (*VanH_B*, *VanB* et *VanX_B*) sont structurellement très proches avec les protéines correspondantes de l'opéron *vanA* (67 – 76 % d'homologie au niveau des acides aminés) tandis que les protéines de régulation *VanR_B* et *VanS_B* sont lointainement reliées à *VanR* et *VanS* de l'opéron *vanA* (identité de 34 et 19 % respectivement) (**S.EVERS et P.COURVALIN 1996**). Cette résistance est parfois transférable mais à basse fréquence à d'autres souches d'entérocoques (**S.DUTKA-MALEN et P.COURVALIN 1994**).

- **Génotype Van D** : la résistance acquise de type *VanD* est due à une production constitutive des précurseurs de peptidoglycane se terminant par D-Ala-D-Lac. L'organisation de l'opéron *vanD*, qui est de localisation exclusivement chromosomique est semblable à celle de *vanA* et

vanB (F.DEPARDEIU et al 2005). Toutefois, aucun gène homologue à vanZ ou vanW de l'opéron van A et van B, respectivement, n'est présent (F.DEPARDEIU et al 2005). (Figure 4)

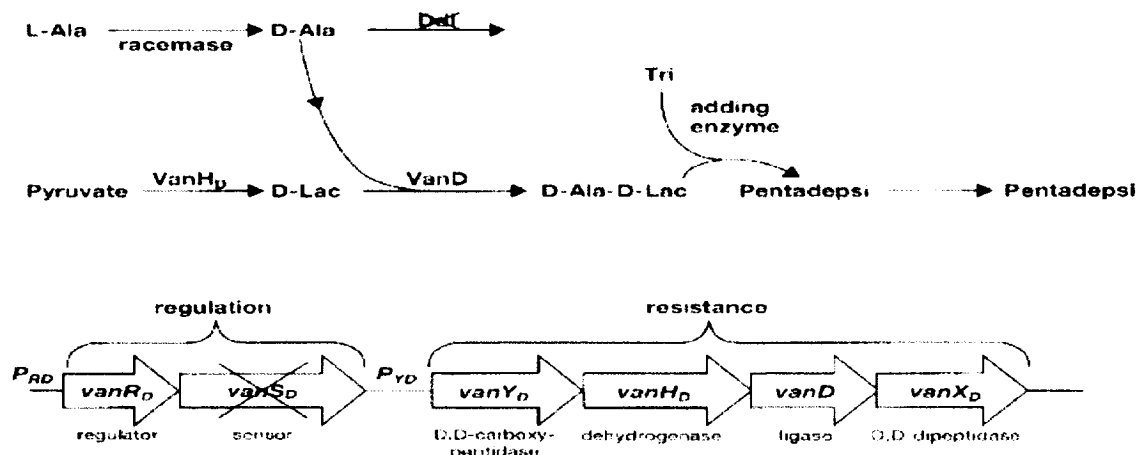


Figure 4 : Résistance aux glycopeptides, type VanD (P.COURVALIN 2006)

La résistance est constitutive et n'est pas transférable par conjugaison à autres entérocoques (F.DEPARDEIU et al 2005). Les souches de type VanD ont une activité DD-dipeptidase négligeable, qui devrait se traduire par un phénotype sensible, car ces bactéries sont incapables d'éliminer les précurseurs du peptidoglycane se terminant par D-Ala-D-Ala, qui est la cible de glycopeptides. Cependant, chez les souches de type VanD, la voie sensible ne fonctionne pas, parce que la Ddl est inactivé par différentes mutations chromosomique du gène ddl (F.DEPARDEIU et al 2004, F.DEPARDEIU et al 2005) par conséquent, les souches peuvent se développer en présence de la vancomycine, car ils s'appuient sur la voie de la résistance inductible pour la synthèse du peptidoglycane (P.COURVALIN 2006).

- **Génotype Van C** : trois types de gènes vanC, ont été décrit : vanC1, vanC2 et vanC3 qui sont spécifiques respectivement de *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* et *E.flavescens* (S.DUTKAMALENS et P.COURVALIN 1994). La localisation de ces gènes est chromosomique et leur expression est constitutive (M.LEONE et al 2000, Y.CETINKAYA et al 2000).

L'organisation de l'opéron vanC, se distingue de celles de vanA, vanB et vanD, Trois gènes sont nécessaires pour l'expression de cette résistance : vanT code pour une sérine racémase (VanT) qui produit D-Ser, le gène vanC code pour la ligase VanC qui catalyse la synthèse d'un pentapeptide se terminant par D-Ala-D-Ser à la place de D-Ala-D-Ala

(Y.CETINKAYA et al 2000, P.COURVALIN 2006) et vanXY_C code pour la protéine VanXY_C, qui possède à la fois une activité DD-dipeptidase et une DD-carboxypeptidase permettant ainsi l'hydrolyse des précurseurs se terminant par D-Ala (P-E.REYNOLDS et P.COURVALIN 2005, P.COURVALIN 2006). (Figure 5)

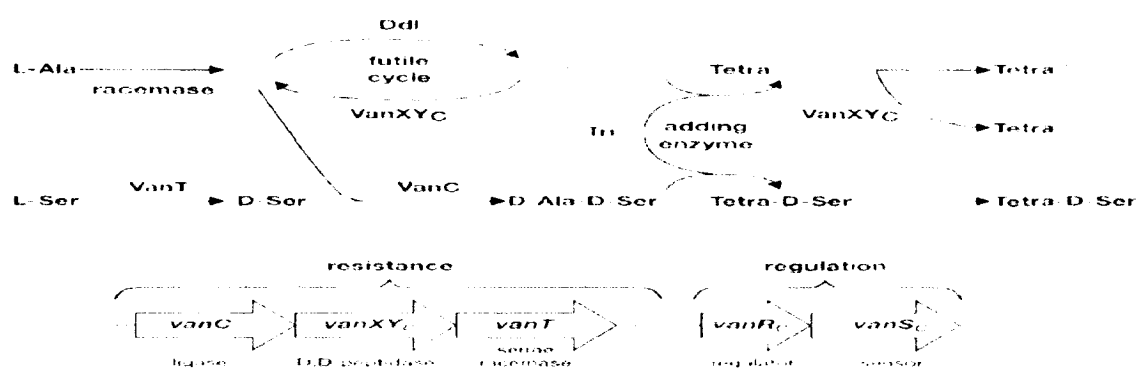


Figure 5 : Résistance aux glycopeptides, type VanC (P.COURVALIN 2006)

II.4. Les phénotypes de résistance des entérocoques aux glycopeptides :

Neuf types de résistance sont maintenant individualisés sur des critères génotypiques et phénotypiques. Huit types (Van A, B, D, E, G, L, M et N) correspondent à des résistances acquises par des souches de *E. faecium* essentiellement mais aussi de *Enterococcus faecalis* ou d'autres espèces d'entérocoques et un type (VanC) résulte d'une résistance naturelle à la vancomycine chez *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*

(M.FINES et al 2007, R.LECLERCQ et V.CATTOIR 2012).

En pratique, les résistances les plus courantes sont les résistances acquises VanA, VanB et VanD (plus rare) qui sont essentiellement trouvées chez *E. faecium* (le plus souvent résistant à l'ampicilline) et parfois chez *E. faecalis* ainsi que la résistance naturelle VanC (R.LECLERCQ et V.CATTOIR 2012).

- **Phénotype VanA** : il s'agit d'une résistance acquise de haut niveau aux glycopeptides, c'est la résistance la plus fréquente en clinique. Il a été observé chez *E. faecium* et *E. faecalis* ainsi que chez de nombreuses autres espèces d'entérocoques, présente une résistance inductible de haut niveau à la vancomycine ($CMI > 64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) et à la teicoplanine ($CMI > 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (S.DUTKA-MALENS et P.COURVALIN 1994, M.LEONE et al 2000).

- **Phénotype VanB** : il s'agit d'une résistance acquise de niveau variable à la vancomycine, il est moins fréquent par rapport au phénotype VanA. Il est retrouvé chez *E. faecalis* et *E. faecium* résistants de façon inductible et de niveau modéré à la vancomycine avec des CMI très variables, mais qui demeurent sensibles à la teicoplanine ce qui est expliquée par l'absence d'induction de la résistance par cet antibiotique (S.DUTKA-MALENS et P.COURVALIN 1994).

Phénotype VanD : il s'agit d'une résistance constitutive à la vancomycine ($CMI = 64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) et une résistance de bas niveau à la teicoplanine. Il est rare et ne présente pas de risque écologique, Seules rares souches d'*E. faecium* ont été isolées (R.LECLERCQ et P.COURVALIN 1997, P.COURVALIN 2006).

- **Phénotype VanC** : est constitué de souches des espèces rarement pathogènes *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens* qui présentent une résistance naturelle à la vancomycine. Les trois phénotypes VanC1, VanC2 et VanC3 présentent un bas niveau de résistance à la vancomycine et restent sensibles à la teicoplanine (M.LEONE et al 2000).

Remarque : Il est à noter que le phénotype permet de prédire le génotype de la souche mais pas constamment. En effet, si une résistance élevée à la vancomycine et à la teicoplanine

évoque une résistance de génotype vanA inductible par les deux glycopeptides, certaines souches constitutivement résistantes de génotype vanB ont un phénotype VanA. Au contraire, certaines souches de génotype vanA peuvent avoir un phénotype VanD ou VanB (M.FINES et al 2007).

Les caractéristiques des principaux types de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau IV : Les caractéristiques des principaux types de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques

Caractéristiques	Résistance acquise			Résistance naturelle
	VanA	VanB	VanD	Van C (C1/C2/C3)
Phénotypes	VanA	VanB	VanD	Van C (C1/C2/C3)
CMI vancomycine (mg/L)	64 – 1000	4 - 1000 (souvent 16 -64)	64 – 128	2 - 32
CMI teicoplanine (mg/L)	16 – 512	0.5 – 1	4 – 64	0.5 - 1
Expression	Inductible	Inductible	Constitutive	Constitutive Inductible
Support génétique et localisation	Transposon, plasmide, chromosome	Transposon, plasmide, chromosome	Chromosome	Chromosome
Cible modifiée	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser
Transférabilité par conjugaison	+	+	-	-
Espèces bactériennes	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i> <i>E.avium</i> <i>E.durans</i> <i>E.mundtii</i>	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> <i>E.flavescens</i>

(M.LEONE et al 2000, M.FINES et al 2007)

II.5.Méthodes de détection des entérocoques résistants aux glycopeptides :

II.5.1. Méthodes phénotypiques :

La détection des entérocoques résistants aux glycopeptides est réalisée sur l'antibiogramme avec un disque de Vancomycine 30 µg (VAN) et un disque de Teicoplanine 30 µg (TEC) selon les critères suivants :

Tableau V : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et leur interprétation des entérocoques (VAN, TEC)

	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Vancomycine (µg/ml)	≤ 14	15-16	≥ 17
Teicoplanine (µg/ml)	≤ 10	11-13	≥ 14

(K.RAHAL et al 2014)

En plus d'un échec thérapeutique, les critères de présomption ou d'alerte sont envisagés lorsque le diamètre d'inhibition est <17mm pour la vancomycine et <14mm pour la teicoplanine, ou une différence d'au moins 3mm entre ces deux diamètres.

Egalement toute culture dans les zones d'inhibition de la vancomycine et/ou la teicoplanine est considérée comme une alerte (K.RAHAL et al 2014).

En présence de l'un de ces signes d'alerte, la mise en évidence de la résistance des entérocoques aux glycopeptides se fait en deux étapes :

- Test de Screening (criblage) :

On utilise un milieu solide à base de BHI (Brain heart infusion) agar additionné de vancomycine à une concentration de 6 µg/ml ou un milieu Mueller-Hinton agar supplémenté de 5 µg/ml de Teicoplanine, On ensemence 1 à 10µl d'une suspension de 0,5 McFarland par spot, l'incubation se fait à 35°C ± 2 pendant 24h (J.ROBERT 2007, K.RAHAL et al 2014). D'autres milieux sélectifs peuvent être utilisés tel qu'une gélose D-coccosel contenant 4mg/l de vancomycine, un milieu solide à base de Bile-Esculine-Azide (BEA) additionné de vancomycine à la concentration de 6 mg/l (S.GODREUIL et al 2007), ou un milieu chromogène contenant 8 mg/L de vancomycine.

- Test de confirmation :

Il est obligatoire devant tout test de présomption et/ou de criblage positif. Il se base sur la détermination de la CMI, soit par dilution en milieu gélosé avec un inoculum de 0,5 McFarland dilué au 1/10^{ème} puis ensemencer 1 à 2 µl par spot sur MH agar et incuber pendant 24h. Ou par E-Test à partir d'un inoculum de turbidité 0,5 McFarland standard ensemencé sur gélose Mueller-Hinton, incubée 24 heures à 37°C (K.RAHAL et al 2014).

L'interprétation de la CMI se présente comme suit :

Tableau VI : Valeurs critiques des concentrations minimales inhibitrices et leurs interprétation des entérocoques (VAN, TEC)

	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Vancomycine (µg/ml)	≤ 4	8 -16	≥ 32
Teicoplanine (µg/ml)	≤ 8	16	≥ 32

(K.RAHAL et al 2014)

II.5.2.Méthode génotypique :

La recherche des gènes de résistance aux glycopeptides se fait par biologie moléculaire, la technique de référence est la PCR (Polymerase Chain Reaction) basée sur l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S couplée au séquençage à la recherche des gènes de résistances aux glycopeptides (vanA, vanB, vanC, vanD, vanG et vanE) ainsi que les gènes spécifiques des espèces *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* (vanC1) et *E. casseliflavus-flavescens* (vanC2-C3) (S.GODREUIL et al 2007).

Il est possible de réaliser une recherche d'entérocoque résistant aux glycopeptides directement à partir du prélèvement à l'aide d'une technique de PCR ciblant les gènes vanA et/ou vanB :

- BD GeneOhm™ Van R (GeneOhm – BD diagnostics): gènes vanA + vanB
- Xpert® Van A Van B (Genexpert – Cepheid): gènes vanA et/ou vanB (O.BARRAUD et N.PESTOURIE 2011).

Ces technologies utilisées dans le diagnostic sont plus sensibles et rapides par rapport aux méthodes de culture (O.BARRAUD et N.PESTOURIE 2011).

CHAPITRE III : EPIDEMIOLOGIE

III.1. Portage :

Les entérocoques, résistants ou non aux glycopeptides, colonisent le tube digestif, principal réservoir de ces micro-organismes (N.FORTINEAU et al 2008, C.JEHL et al 2011).

Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) sont surtout responsables de colonisations digestives asymptomatiques (portage digestif), mais peuvent également être à l'origine d'infections dans environ 10 % des cas, (infections urinaires, endocardites, bactériémies...) (S.HENARD et al 2009).

III.2. Mode de transmission :

La colonisation intestinale joue un rôle clé dans l'épidémiologie et la pathogénie de l'ERG. C'est à partir de la colonisation que l'ERG va disséminer d'un patient à l'autre, voire d'un hôpital à l'autre ou même d'un pays à l'autre. La transmission d'un patient à l'autre est dans la grande majorité des cas, manuportée (O.LESENS 2009), des études ont montré que des ERG pouvaient être retrouvés sur les mains de personnels soignants avec une fréquence variant de 0 à 41 % (C.JEHL et al 2011), mais peut aussi se faire à partir de surfaces contaminées, de l'eau et des aliments. En effet, comme la plupart des cocci à Gram positif, l'ERG peut persister très longtemps (5 jours à 4 mois) sur les surfaces inertes (lits, barrières, tablettes) (O.LESENS 2009) et sur le matériel médical (glucomètres, thermomètres et tensiomètres, par exemple) constituant ainsi un autre réservoir en milieu hospitalier, favorisant des transmissions croisées, mais ce mode de transmission est nettement moins important que la contamination par manuportage (C.JEHL et al 2011).

La transmission des ERG est facilitée par les diarrhées, l'incontinence fécale et les suppurations (C.JEHL et al 2011).

L'émergence des ERG dans l'écosystème hospitalier semblent être favorisée par l'utilisation massive de certains antibiotiques comme les glycopeptides mais aussi les céphalosporines de 3^{ème} génération ou les nitro-imidazolés qui agissent sur la flore fécale mais sont inactifs sur les entérocoques, par conséquent ils exercent une pression de sélection sur les entérocoques et induisent l'émergence de résistances (C.RABAUD et al 2008, S.HENARD et al 2009), l'insuffisance rénale et l'hémodialyse, la transplantation d'organe, l'hospitalisation en oncologie ou en réanimation, les cathéters centraux, le grand âge et les durées longues d'hospitalisation sont les principaux facteurs de risque de l'émergence des ERG (S.GODREUIL et al 2007).

III.3. Données épidémiologiques :

- Situation dans le monde :

Les premières souches d'*E.faecium* résistantes aux glycopeptides ont été isolées au Royaume Uni en 1986 et en France en 1987, soit 30 ans après l'introduction de la vancomycine, puis dans les années 90 aux Etats Unis (C.SURCOUF et al 2011) où elles sont devenues endémiques avec une proportion de souches résistantes à la vancomycine de 28 % en 2003 (CDC 2013) et se placent au 3^{ème} rang des bactéries multirésistantes dans les unités de soins intensifs (CDC 2013). Le rapport national «Antibiotic Resistance Threats in the United States» du Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de 2013 fait état de 30% de résistance pour les entérocoques (CDC 2013). Sur 66000 infections nosocomiales à entérocoque, 20000 sont dues à des entérocoques résistants à la vancomycine soit un taux de

30,30 %. Sur ces 20000 infections nosocomiales à entérocoques résistants à la vancomycine 1300 décès, soit un taux de létalité de 6,5% (CDC 2013).

La répartition des ERG est maintenant mondiale. En Corée, en 2002, la proportion d'*E.faecium*, résistants à la vancomycine, était de 16 % (K.LEE et al 2004).

En Turquie, en 2008, sur 100 souches d'entérocoques isolés des urines, 18.2% des *E.faecium* étaient résistants aux glycopeptides (M.BUTCU et al 2011).

Ce phénomène était encore marginal il y a peu en Europe, mais plusieurs épidémies ont été signalées à partir de l'année 2000 au Royaume-Uni, aux Pays-Bas, en Allemagne puis en Europe méditerranéenne (O.LESENS 2009).

En Amérique latine, la situation a été très compliquée, avec des taux d'*E.faecium* résistant à la vancomycine proches des 60% en 1997, ils ont toutefois réussi à faire diminuer ce taux à 39% en 2002 (D-J.BIEDENBACH et al 2004). Une première épidémie a été décrite au Brésil en 2006 (C.DELAMARE et al 2008).

Au Canada, les données du programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PCSIN) indiquent une augmentation des taux d'incidence des infections à l'ERG de 1999 à 2006, ceux-ci passant de 0,02 pour 1000 admissions en 1999 à 0,06 pour 1000 admissions en 2006. Les taux d'incidence de la colonisation pour 1000 admissions serait passés de 0,035 en 1999 à 1,14 en 2006 (PCSIN 2006).

Pour ce qui est de phénotype de résistance, aux Etats-Unis et en Europe le type de résistance prédominant est VanA alors que pour les pays asiatiques et l'Australie, le phénotype VanB est prédominant (K-S.YANG et al 2007).

- Situation en Europe :

L'émergence des ERG en Europe est moins forte qu'aux Etats-Unis pour plusieurs raisons probables comme par exemple l'utilisation hospitalière plus fréquente de la vancomycine (5 à 10 fois plus) (C.SURCOUF et al 2011). Toutefois les données du réseau EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) de 2013 montrent elles aussi une augmentation des ERG, mais avec des proportions contrastées. Concernant les bactériémies à ERG, leur proportion est au-delà des 20% pour plusieurs pays comme : Irlande, Portugal, Grèce, Grande Bretagne,... Mais les taux restent < 1% pour la plupart des autres pays surveillés (EARSS 2013). Durant ces dix dernières années, certains pays ont connu une forte augmentation de leur taux d'ERG, comme l'Irlande qui présente un taux de bactériémie supérieure à 40% en 2013. En Europe cette augmentation est en lien avec l'augmentation des épidémies hospitalières (EARSS 2013).

Des éclosions hospitalières ont été rapportées en Suède, en Pologne, en Allemagne, en Finlande, en Grèce et aux Pays Bas, mais les mesures de contrôle mises en place ont été efficaces (CINQ 2012).

Entre 2011 et 2014 le pourcentage moyen des entérocoques résistants à la vancomycine de la population de l'UE/EEE (l'Union européenne/ L'Espace économique européen) a augmenté significativement, passant de 6,2 % en 2011 à 7,9 % en 2014 (EARSS 2014) ainsi pour 2014, 29 pays ont signalé 8142 isolats résistants à la vancomycine.

La répartition des taux d'isolats d'entérocoques résistants aux glycopeptides en Europe en 2014 est représentée dans la carte ci-après :

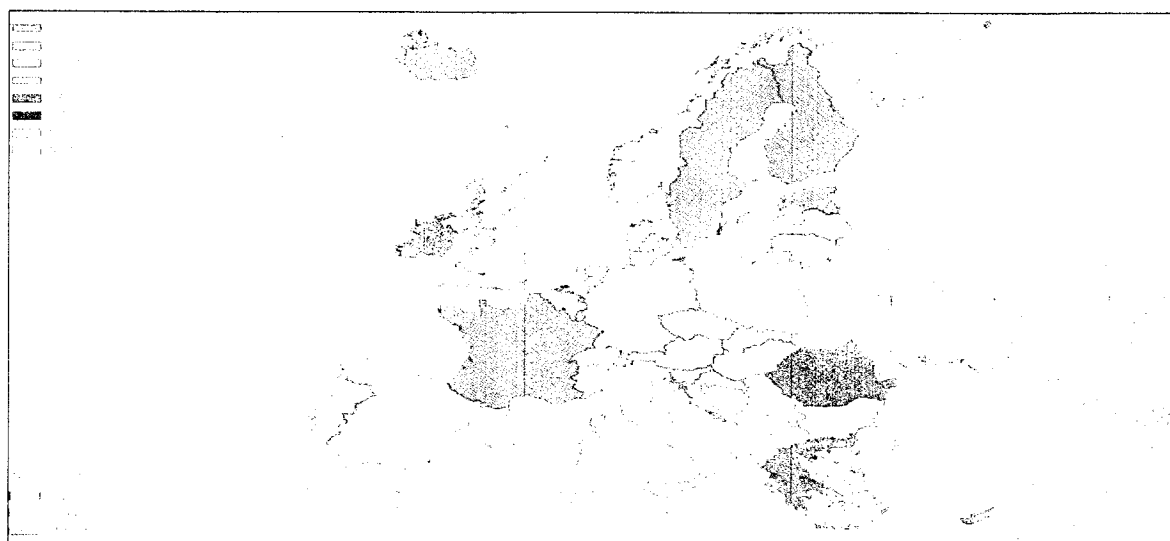


Figure 6 : Répartition des taux des ERG en Europe en 2014 (ECDC 2014)

Le nombre d'isolats rapporté par pays varie de 11 à 882 et les taux nationaux d'isolats résistants varient de 0% (Estonie, Finlande, Islande et Malte) à 45,1 % (Irlande) (EARSS 2014). Cette forte disparité entre les pays de l'Europe pour le taux d'ERG est liée à la différence de consommation d'antibiotique entre les pays, mais aussi à la prise de mesures préventives trop tardives et peut être pas assez respectées et strictes (C.SURCOUF et al 2011).

- Situation en France :

En France la proportion de souches d'entérocoque résistant aux glycopeptides était stable jusqu'en 2003, comprise entre 1 et 2 % chez *E.faecium* et < 0,5 % chez *E.faecalis*. On assiste depuis à une augmentation du taux de la résistance chez *E.faecium* (>5%) (EARSS 2004) et du nombre de signalements d'ERG avec des épidémies d'ampleur inhabituelle rapportées dans plusieurs établissements de santé jusqu'en 2008, suivie d'une diminution en 2009 suite aux recommandations adoptées par l'institut de veille sanitaire (InVS) en 2005 (J.LUCET et al 2008, I.POUJOL et al 2010, J.THIOLET et al 2011).

En 2010, la proportion de résistance à la vancomycine pour l'espèce *E.faecium* était estimée à 1,1 % en France (EARSS 2010). Une stabilité pour 2010 et 2011 est observée, avec une émergence à ce jour contrôlée, car le taux de résistance reste stable < 1% (J.THIOLET et al 2011, InVS 2014).

Ainsi de 2003 à 2013, 1160 signalements de 2560 cas ont été effectués avec 289 (25 %) épisodes épidémiques (n > 1 cas) à la date du signalement (InVS 2014).

- Situation en Afrique :

L'émergence de souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine était rapportée en Afrique du Sud en 1997 (S-M.BUDAVARI et al 1997). D'autres auteurs sud-africains de Johannesburg notifient en février 2000, l'émergence de souches d'entérocoque résistant aux glycopeptides : trois *E.faecium* VanA, dix *E.faecium* VanB, six *E.gallinarum* VanC et un *E.avium* VanA (A.VON-GOTTBERE et al 2000). Ces souches ont été isolées en 1998 lors d'une enquête de prévalence dans quatre hôpitaux chez des patients à haut risque d'infections nosocomiales (M.DOSSO et al 2000).

- Situation en Algérie

l'isolement d'un ERG était rare en Algérie, en effet le premier cas d'entérocoque résistant à la vancomycine a été rapporté en Algérie en 2007, il s'agit d'*E.faecalis*, isolé au sein du service de pédiatrie de l'hôpital central de l'armée (N.AGGOUNE et al 2008). Puis deux cas d'infections à *E.faecium* résistant aux glycopeptides (ERG) ont été signalés en 2009 (M.HAMIDI et al 2013). Après en 2010 trois souches d'ERG ont été signalées (AARN 2011).

En 2011, un total de 8 souches d'entérocoques résistants à la vancomycine dont 5 à l'hôpital et 3 externes a été signalé par certains laboratoires du réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Pour les souches confirmées à l'IPA (Institut Pasteur d'Algérie), il s'agit d'*E.faecium* porteurs de gène van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine (AARN 2012). Puis 10 souches d'ERG isolées à l'hôpital ont été signalées par certains laboratoires du réseau entre 2012 et 2013. Toutes les souches confirmées à l'IPA étaient des souches d'*E.faecium* portant le gène vanA qui exprime une résistance de très haut niveau à la vancomycine et teicoplanine (AARN 2015).

Et en 2014, un total de 21 souches d'entérocoques résistants à la vancomycine dont 9 étaient des souches d'*E.faecium* a été signalé (AARN 2016).

Les taux de résistance des entérocoques vis-à-vis des glycopeptides des années allant de 2008 à 2014 selon le réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN), sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII : Nombre et pourcentage d'Entérocoques résistants (R + I) aux glycopeptides entre 2008 et 2014 en Algérie. (AARN 2009, 2010, 2011, 2012, 2015, 2016)

Année		n	N	Taux de résistance %
2008	VAN	1	645	0.15
	TEC	0	33	0
2009	VAN	2	408	0.49
	TEC	0	84	0
2010	VAN	3	499	0.6
	TEC	0	173	0
2011	VAN	8	450	1.78
	TEC	1	108	0.93
2012-2013	VAN	10	1015	0.98
	TEC	19	852	2.23
2014	VAN	21	1341	1.56
	TEC	97	1267	7.65

N : nombre total d'entérocoques isolés.

n : nombre d'entérocoques résistants aux glycopeptides.

VAN : vancomycine

TEC : teicoplanine

CHAPITRE IV : TRAITEMENT ET PREVENTION

IV.1. Traitement :

Le traitement des infections à entérocoques est devenu de plus en plus difficile en raison de la résistance fréquente de ces bactéries aux antibiotiques standards comme, les bêta-lactamines les aminoglycosides et les glycopeptides. De plus, l'isolement de souches d'entérocoques résistant à la vancomycine en milieu hospitalier s'avère plus fréquent à travers le monde, ce qui a entraîné une augmentation significative de la mortalité due à ce type d'infection (E.BONNET 2008, A-C.ARIAS et al 2011).

IV.1.1. Traitement des infections à entérocoque sensible aux glycopeptides :

Les entérocoques présentent des résistances naturelles multiples aux antibiotiques, Ils sont peu sensibles à l'action des bêta-lactamines, les CMI de la pénicilline G varient de 2 à 4 mg/L, et de 0,5 à 4 mg/L pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la pipéracilline et l'imipénème (*E.faecium* est résistant). L'oxacilline et les céphalosporines de toute génération restent inactives sur les entérocoques. Les bêta-lactamines ne sont que bactériostatiques sur ces bactéries (N.YAMANE, N-R.JONES 1991, C.NAUCIEL et J-L.VILDE 2007).

En outre ils présentent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (CMI gentamicine 4-8 mg/l) (J-C.GRAHAM et F-K.GOULD 2002).

L'association des pénicillines et des aminosides a un effet synergique bactéricide rapide in vitro et in vivo (E.BONNET 2008), lié à une meilleure pénétration de l'aminoside dans la bactérie, grâce à l'action de la bêta-lactamine sur la paroi (E.BONNET 2008, N.TROILLET et F.BALLY 2011).

Les infections à entérocoque nécessitent habituellement une bithérapie prolongée associant de l'amoxicilline (à la dose de 200 mg/kg par jour) avec un aminoside (gentamycine).

L'amoxicilline est substituée par un glycopeptide en cas de souche bactérienne de haut niveau de résistance à l'amoxicilline (CMI \geq 16 mg/L) ou en cas d'allergie à la pénicilline (P.PARIZE et J-L.MAINARDI 2011).

Cependant les entérocoques ayant une résistance de haut niveau aux aminosides sont relativement fréquents. Ces germes posent des problèmes thérapeutiques en raison de la perte de l'action synergique exercée par l'aminoside et d'une diminution de la bactéricidie associée. Une alternative thérapeutique possible est l'association d'amoxicilline et de ceftriaxone (ou de céfotaxime). En effet, il a été montré in vitro que ces antibiotiques avaient des propriétés synergiques sur l'entérocoque en inhibant de façon complémentaire les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (J-L.MAINARDI et al 1995). Cette association thérapeutique a été utilisée in vivo avec succès et représente donc une alternative intéressante à l'utilisation des aminosides (P.PARIZE et J-L.MAINARDI 2011), l'ampicilline peut également être utilisé dans ce cas-là à très fortes doses (de l'ordre de 400 mg/kg/j), en perfusion continue (C.CARBON 1991). Pour les infections à entérocoque résistant aux aminopénicillines et aux aminosides le traitement est basé sur l'utilisation des glycopeptides (C.RABUAD et T.MAY 2000, E.BONNET 2008, N.TROILLET et F.BALLY 2011).

IV.1.2. Traitement des infections à entérocoques résistants aux glycopeptides :

Le traitement des infections à l'ERG dépend de la souche en cause et de sa susceptibilité aux antibiotiques, les problèmes thérapeutiques sont majeurs lorsqu'il existe une résistance associée aux pénicillines, aux glycopeptides et éventuellement aux aminosides qui est

fréquent, surtout décelée chez *E.faecium* (E.HERNANDEZ et al 1999, R.LECLERCQ 2002).

Les alternatives potentielles aux glycopeptides sont les nouveaux antibiotiques à savoir l'association quinupristine-dalfopristine, le linézolide, la tigécycline et la daptomycine (E.BONNET 2008).

- **Quinupristine-Dalfopristine**, Synercid® (1996):

La quinupristine–dalfopristine fait partie de la classe des streptogramines, il s'agit d'une association de deux molécules, streptogramines A et streptogramines B.

Il inhibe la synthèse protéique bactérienne par la formation d'un complexe stable avec les ribosomes après pénétration dans la cellule bactérienne. L'association de deux streptogramines est synergique et lui confère une action bactéricide (son action étant dix fois supérieure à la somme des activités de chaque molécule). Son activité antibiotique s'exerce contre une grande variété de bactérie à Gram positif y compris résistantes aux bêta-lactamines et aux macrolides (H-M.BRYSON et C-M.SPENCER 1996).

Le Synercid® est actif sur tous les *E.faecium* même résistants à la vancomycine mais il est inactif sur les *E.faecalis* (O.LESENS 2009).

Toutefois, en cas de résistance à la streptogramine B, la quinupristine est inactive, la synergie bactéricide n'est plus présente et cela pourrait affecter l'activité de l'association (A.MAKINSON et V.LEMOING 2008).

Le Synercid® n'est administrable que par voie intraveineuse et de préférence sur une voie centrale du fait de sa veino-toxicité. La posologie est de 7,5 mg/kg toutes les 8 heures (A.MAKINSON et V.LEMOING 2008, O.LESENS 2009).

- **Linezolide**, Zyvoxid® (2001):

De la classe des oxazolidinones. Il inhibe la synthèse protéique bactérienne en empêchant la formation du complexe ribosomal 70S. Il exerce une activité bactériostatique sur toutes les bactéries à Gram positif. Des résistances ont été décrites pour des souches d'entérocoques et de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (O.LESENS 2009, R.BERENGER et al 2011).

Son excellente biodisponibilité par voie orale autorise l'administration orale aux mêmes posologies que par voie intraveineuse soit 600 mg/12 h. Les traitements prolongés au-delà de quatre semaines exposent à une toxicité hématologique (anémie, thrombopénie) et à un risque de neuropathie périphérique axonale invalidante et peu réversible (C.JACQUELINE et al 2003, A.MAKINSON et V.LEMOING 2008).

L'expérience clinique dans le traitement des endocardites, à entérocoque en particulier, par cet antibiotique reste limitée et les résultats sont mitigés (J-E.BERDAL et A.ESKESEN 2008).

- **Tigécycline**, Tygacil® (2006) :

Fait partie de la nouvelle classe glycylicyclines, dérivé des tétracyclines (O.LESENS 2009), il inhibe la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous-unité ribosomale 30S et en bloquant l'entrée d'ARNt amino-acyl dans le site A du ribosome. Ceci empêche l'incorporation des résidus acides aminés dans les chaînes peptidiques en formation (VIDAL 2013).

La tigécycline est bactériostatique, elle a un spectre antibactérien très large, comprenant toutes les bactéries à Gram positif y compris les ERG et de nombreuses bactéries à Gram négatif à l'exception de *Proteus spp* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Ce médicament n'est administré que par voie intraveineuse à posologie de 50 mg/12 h après une dose de charge de 100 mg. Les intolérances sont dominées par des troubles digestifs (A.MAKINSON et V.LEMOING 2008).

- **Daptomycine**, Cubicin® (2007) :

La daptomycine est un lipopeptide cyclique naturel, actif uniquement sur les bactéries à Gram positif. Son mécanisme d'action implique la liaison (en présence d'ions calcium) aux membranes bactériennes des cellules en phase de croissance et en phase stationnaire, entraînant une dépolarisation et aboutissant à une inhibition rapide de la synthèse protéique de l'ADN et de l'ARN provoquant la mort de la cellule bactérienne (VIDAL 2013).

Ce médicament est actif uniquement par voie intraveineuse et sa demi-vie longue autorise une seule perfusion quotidienne (A.MAKINSON et V.LEMOING 2008).

Néanmoins, l'émergence de souches résistantes à la daptomycine, au linezolid et à l'association Quinupristine-Dalfopristine durant les traitements s'avère une réalité (A.MAKINSON et V.LEMOING 2008).

Par conséquent il y a d'autres nouvelles molécules d'antibiotiques dont certaines sont commercialisées, ces dernières peuvent constituer un espoir en cas d'impasse thérapeutique sachant qu'elles sont actives sur les bactéries à Gram positif sans particularité pour les ERG, ces molécules sont :

- **Teixobactine** :

Utilisé essentiellement contre les bactéries à Gram positif, il est actif sur la paroi bactérienne par liaison et inhibition du lipide II précurseur de peptidoglycane. Il ne présente jusqu'à maintenant aucun risque d'induction de résistances (A.MAJDOUB 2015).

- **Tedizolide**, Sivextro® :

Le phosphate de tédizolide est une prodrogue du phosphate d'oxazolidinone. Il exerce son activité antibactérienne en se liant à la sous-unité 50S du ribosome bactérien, ce qui inhibe la synthèse protéique.

Le tédizolide est actif principalement contre les bactéries à Gram positif. Il est bactériostatique in vitro contre les entérocoques, les staphylocoques et les streptocoques (HAS 2015).

Issue de la même classe du Linezolid, le Tedizolide est moins myélotoxique que ce dernier, mais de durée de traitement plus courte (C.JOSEPH 2015).

- **Les nouveaux glycopeptides** :

- **Télavancine**, Vibativ® :

C'est un antibiotique lipoglycopeptidique semi-synthétique. Son activité bactéricide résulte de l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, des protéines, de l'ARN et des lipides cellulaires ce qui entraîne la mort de la cellule bactérienne.

La télavancine est indiquée pour le traitement des infections compliquées de la peau et des structures cutanées causées par les bactéries à Gram positif suivantes : *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) et sensibles à la méthicilline (SASM), *Streptococcus*

pyogenes, *Streptococcus agalactiae*, groupe *Streptococcus anginosus* et *Enterococcus faecalis* (E.RUBINSTEIN et al 2014).

- **L'oritavancine**, Orbactiv® :

Semi-synthétique de la vancomycine, ayant une activité bactéricide sur les bactéries à Gram positif, y compris le SARM.

Son autorisation de mise sur le marché (AMM) actuelle est restreinte au traitement « des infections bactériennes aiguës de la peau et des tissus mous chez les adultes », administrée par voie intra-veineuse (HAS 2015).

IV.1.3.Perspectives :

Le risque d'impasse thérapeutique est une réalité, cela d'autant que les nouveaux antibiotiques n'ont pas prouvés leurs efficacités, les probiotiques peuvent constituer une alternative thérapeutique.

Les probiotiques contiennent des monocultures ou des cultures mixtes vivantes de microorganismes agissant de façon bénéfique sur l'organisme en améliorant les caractéristiques de la microflore qui y réside. Un probiotique idéal doit respecter les conditions suivantes :

- Absence de nocivité.
- Atteindre vivant le site de l'action, s'y multiplier et/ou le coloniser.
- Donner lieu à des actions cliniquement documentables (modification de la flore intestinale, élimination de germes pathogènes ou opportunistes, stimulation immunitaire...).
- Être aisément maîtrisable d'un point de vue technologique (génétiquement stable, pas de transfert de plasmides, production aisée et reproductible, bonne survie dans les denrées alimentaires tout au long de sa conservation).

Les probiotiques les plus utilisés sont les *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp* et *Saccharomyces boulardii*. Ils ont déjà montré leur intérêt dans la prévention et le traitement des diarrhées infectieuses (W.ISAKOW et al 2007).

Ils peuvent aider à réduire le déséquilibre bactérien intestinal induit par un traitement antibiotique. Et ils pourraient avoir un impact sur le portage de bactéries multi-résistantes. Les principaux risques d'utilisation rapportés jusqu'alors sont les risques d'infection généralisée chez les immunodéprimés, le risque d'acquisition de résistance par transfert plasmidique, et le risque de recolonisation à l'arrêt du traitement.

Une étude australienne randomisée en double aveugle, dans un service de dialyse, a comparé deux yaourts du commerce : un contenant *Lactobacillus rhamnosus* et un autre sans (K-J.MANLEY et al 2007). Des coprocultures de contrôle étaient réalisées une fois par semaine, de la 1^{ère} à la 4^{ème} semaine (S1 à S4), puis à la 8^{ème} semaine (S8). Dans le groupe traité, tous les patients étaient ERG négatif à S4, alors que dans le groupe témoin 10 patients sur 11 étaient toujours porteurs. Quatre semaines après l'arrêt du traitement, 3 patients traités étaient redevenus ERG positif. Les patients témoins mis sous traitement de S4 à S8 se sont négativés (MANLEY et al 2007).

Ces données semblent montrer une efficacité du traitement probiotique, mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires. Les arguments sont pour l'instant insuffisants pour recommander l'usage systématique des probiotiques.

IV.2.Prévention :

Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) sont des bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) (J.ROBERT 2007).

Ces souches hautement résistantes posent trois problèmes :

- Le risque important de transmission croisée et donc d'épidémie de BHRe (EARSS 2006).
- Le risque d'impasse thérapeutique, car le plus souvent les ERG sont résistants aux principaux antibiotiques actifs sur les entérocoques.
- Le risque de transfert du gène de résistance à la vancomycine à un *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (S-E.FLANNAGAN et al 2003).

IV.2.1.Les mesures préventives :

Pour prévenir les infections dues aux ERG on applique les principes de lutte contre les BMR avec certaines mesures spécifiques aux BHRe (J.ROBERT 2007) :

IV.2.1.1.Le dépistage :

Le dépistage consiste à identifier de manière présomptive à l'aide de tests, d'examens ou d'autres techniques susceptibles d'une application rapide, les sujets à ERG positifs. Il a pour objectif la prévention de la dissémination des ERG à d'autres patients et permet par la suite d'instaurer un traitement préventif ou curatif pour les sujets atteints (C.ARNAUD 2006).

Il se fait par un prélèvement rectal, si le test est positif, des précautions spéciales doivent être mises en place.

Le dépistage est effectué chez les deux catégories de patients cas et contacts :

- **Patient « cas »** : tout patient chez lesquels *E.faecium* ou *E.faecalis* résistant aux glycopeptides a été identifié dans un prélèvement à visée diagnostique ou de dépistage (HCSP 2010).
- **Patient « contact »** : tout patient hébergé concomitamment à un patient ERG positif et pris en charge par la même équipe soignante (de jour et/ou de nuit) (C-CLIN EST 2008).

Modalités de dépistage :

- Chez les patients ERG positif sans antécédent de colonisation à SARM : le dépistage est hebdomadaire en court séjour, mensuel en moyen séjour.
- Chez les patients ERG positif avec antécédents de colonisation à SARM et succès de décolonisation antérieure : hebdomadaire en court et moyen séjour.
- Chez les patients ERG positif avec antécédents de colonisation à SARM et échec de décolonisation antérieure : prendre un avis spécialisé auprès d'un infectiologue.
- Pour les sujets contacts il se fait de façon hebdomadaire durant les 15 jours qui suivent le premier jour d'hospitalisation (8^{ème} Jour J₈ et le 15^{ème} Jour J₁₅) (C-CLIN EST 2008).

IV.2.1.2.Le regroupement et le cohorting des patients :

Ceci consiste à regrouper les patients connus porteurs d'ERG en une seule unité géographique, avec un personnel soignant ne prenant en charge que les patients porteurs d'ERG ayant un prélèvement positif dans les 3 derniers mois. La mise en place de cette mesure permet de limiter efficacement la dissémination des ERG dans le milieu hospitalier et de limiter également le nombre des patients contacts (S.HENARD et al 2009).

IV.2.1.3.La décontamination :

La décontamination a pour objectif collectif, la prévention de la transmission croisée des BMR. Sur le plan individuel elle contribue à la prévention d'Infections Associées aux Soins (IAS) (CCLIN 2011).

Les études sur la décontamination des porteurs d'ERG sont rares et avec de faibles effectifs. Deux études avant/après utilisant la bacitracine seule ou en association avec la doxycycline sur des filières d'hémodialyse et d'oncologie concluent à une efficacité des traitements avec 15/15 (100 %) patients décolonisés à la fin du traitement pour l'une et 5/28 (18 %) pour la seconde contre 1/28 pour les patients témoins (M-R.WEINSTEIN et al 1999, R.HACHEM et I.RAAD 2002). Une dernière étude randomisée traitement contre placebo ne retrouvait aucune différence entre les 2 bras après 3 semaines (K-E.MONDY 2001). Ces rares études semblent prouver une inefficacité de la décontamination des patients porteurs d'ERG (G.BIRGANDA, J-C.LUCET 2013).

IV.2.1.4.Renforcement des mesures d'hygiène :

- Lavage des mains :

L'hygiène des mains reste la mesure la plus importante de la lutte contre la dissémination des bactéries à transmission manuportée par l'utilisation des produits hydro-alcooliques (D.PITTET et al 2000).

L'épidémie à ERG a permis de revoir l'ensemble des pratiques d'hygiène des mains, de sensibiliser les établissements concernés et d'inciter à l'utilisation des produit hydro-alcoolique, conformément aux recommandations nationales (S.HENARD et al 2009).

- Port de gants :

Si risque de contact avec du sang ou tout autre liquide biologique, les muqueuses ou bien avec du matériel souillé.

Les gants doivent être changés entre deux patients et deux activités.

- Port de masque, lunettes, surblouse :

Si les soins ou manipulations exposent à un risque de projection de liquides biologiques (C-CLIN EST 2008).

- Nettoyage de l'environnement :

Le rôle important de la contamination de l'environnement dans la transmission des ERG est assurée par le fait que les souches isolées chez des patients pendant les épidémies sont génétiquement identiques à celles qui contaminent l'environnement (R.PORWANCHER et al 1997).

L'exposition à une chambre préalablement occupée par un patient ERG positifs est un facteur prédictif significatif d'acquisition ultérieure des ERG.

La culture des différentes surfaces de l'environnement hospitalier pendant une journée de travail normale a montré que 10% d'entre eux étaient positives pour l'ERG. Après le nettoyage de routine toutes les surfaces positives antérieures ont été trouvés négatives, indiquant le succès de la décontamination (E.TACCONELLI et M-A.CATALDO 2008).

IV.2.1.5.Restriction de l'utilisation des antibiotiques :

Selon la SHEA (Society for Healthcare Epidemiology of America), la réduction de la consommation des antibiotiques est l'une des mesures les plus importantes pour lutter contre le développement des résistances (SHLAES et al 1997).

L'utilisation des antibiotiques a été identifié comme l'un des facteurs de risque les plus importants dans l'acquisition d'ERG. Des études Cas-témoin, ont associées la survenue des infections à ERG à la forte exposition à la vancomycine, les céphalosporines de 3^{ème} génération ainsi qu'à la ciprofloxacine (H-S.GOLD et al 2001, A-K.ZAAS et al 2002).

Egalement, l'administration de vancomycine ou d'autres antibiotiques tels que les C3G, la clindamycine, le métronidazole, peut augmenter le taux de colonisation intestinale et cutanée,

et majorer ainsi la transmission de patient à patient (**KURUP et al 2008**).

IV.2.2. Conduite à tenir devant un patient « cas » :

- Isolement des patients en chambre individuelle et l'utilisation du matériel à usage unique pour leur prise en charge (**J.ROBERT 2007**).
- Renforcement des mesures d'hygiène.
- Renforcement de la maîtrise de l'environnement y compris du matériel par bionettoyage de la chambre de chaque cas et désinfecter tous les équipements (**M-K.HAYDEN et al 2006, J.ROBERT 2007**).
- Un usage raisonné des antibiotiques, en particulier des glycopeptides et des C3G.
- Rechercher un portage nasal de SARM chez les porteurs d'ERG.
- Lister tous les malades-contacts des cas et qui sont présents ou sortis de l'établissement et organiser un dépistage du portage rectal d'ERG de tous ces contacts par écouvillonnage rectal. En effet, le nombre de porteurs asymptomatiques (portage rectal sans prélèvement à visée diagnostique positif) est extrêmement important par rapport au nombre de malades ayant un prélèvement à visée diagnostique positif (jusqu'à plus de dix pour un) (**J.ROBERT 2007, CINQ 2012**).
- Organiser le dépistage hebdomadaire des contacts aussi longtemps qu'ils restent hospitalisés.
- Proposer comme traitement de 1^{ère} intention des rares bactériémies ou infections urinaires symptomatiques à ERG, le linézolide, sous réserve d'un contrôle hématologique bihebdomadaire et d'une durée de prescription ne dépassant pas 3 semaines (**CSAI 2007**).
- Former le personnel à l'application de ces mesures.
- Envoyer les souches au laboratoire de référence des entérocoques associé au centre national de référence de la résistance aux antibiotiques (**J.ROBERT 2007, A.KURUP et al 2008**).

IV.2.3. Enjeux de la maîtrise :

La lutte contre les bactéries hautement résistantes tel que les ERG afin d'éviter une impasse thérapeutique dans le traitement des infections représente le principal enjeu de cette maîtrise. Cependant, du fait de la résistance plasmidique (mobile) des ERG, la lutte est d'autant plus importante qu'il existe une possibilité de transmission du gène aux staphylocoques notamment SARM.

En effet ces deux germes colonisent des sites écologiques différents, *Staphylococcus aureus* est retrouvé dans les fosses nasales alors que les entérocoques font parties de la flore intestinale. Par contre certaines situations peuvent favoriser le transfert, comme par exemple la présence de plaies cutanées colonisées par du *Staphylococcus aureus*. L'étude de Rossi et al montre l'importance de la double contamination à la fois par le SARM et l'ERG dans l'apparition de *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine (**F.ROSSI et al 2014**).

Les souches de *S.aureus* ayant acquis le gène de résistance aux glycopeptides sont appelées VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*).

Dans le monde, 13 souches de VRSA ont pu être isolées, la première était en Europe (**A.FRIÀES et al 2015**).

La décolonisation de l'ERG est actuellement non recommandée car il n'existe pas encore de méthode ayant prouvées son efficacité. La décolonisation du SARM reste donc un moyen de limiter le risque de transmission et d'éviter l'apparition de SARM résistants aux glycopeptides. C'est pourquoi le dépistage de SARM doit être systématique chez tous les patients ERG positifs (**C-CLIN EST 2008**).

CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES

V.1. Protocole et durée de travail :

Ce travail a été réalisé au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU de Blida, hôpital Frantz Fanon, et s'est réparti en deux volets :

- ✦ Une étude rétrospective étalée sur une période de cinq ans, allant de janvier 2011 à décembre 2015.
- ✦ Une étude prospective ayant duré 04 mois de Janvier 2016 à Avril 2016.

Au cours de cette étude nous avons recherché :

- La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques isolés des différents types de prélèvements.
- Le portage digestif de l'ERG chez les patients cas et les patients contacts.
- Le portage nasal de MRSA chez les patients porteurs connus de l'ERG.

Et nous avons également mené une enquête d'environnement au niveau de la chambre occupée par les patients cas.

V.2. Matériels :

V.2.1. Appareillage : (Annexe I)

Etuve, microscope optique, bec bunsen, séchoir, jarre, hotte, bain-marie, réfrigérateur, densitomètre, balance, ordinateur.

V.2.2. Matériel non biologique : (Annexe II, III)

Représenté par : les milieux de culture, la verrerie, les boîtes de Pétri, les lames, les lamelles, les pipettes Pasteur stériles, les écouvillons stériles, le pied à coulisse, la micropipette, les seringues, l'eau physiologique stérile, les disques d'antibiotiques, les galeries d'identification et les réactifs.

V.2.3. Matériel biologique :

Représenté par :

- Les entérocoques isolés des différents types de prélèvements.
- Les souches de références (ATCC): ces souches sont utilisées pour valider les différents tests effectués, les souches de références du laboratoire sont fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie, celles utilisées dans notre travail sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Souches de références utilisées (original)

Souches	Références
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA(-) (sensible à l'oxacilline)	ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

V.3. Méthodes :

Nous avons suivi différentes démarches selon qu'ils s'agissent d'une recherche d'ERG au sein d'un prélèvement à visée diagnostique, à visée de dépistage, ou d'un prélèvement de l'environnement.

V.3.1. Prélèvement à visée diagnostique :

L'étude bactériologique des ERG s'est effectuée en deux étapes :

- L'isolement et l'identification des entérocoques ;
- La recherche de la résistance des entérocoques aux glycopeptides.

V.3.1.1. Isolement et identification des entérocoques :

L'isolement et l'identification des entérocoques ont été réalisés par les techniques conventionnelles.

L'organigramme ci-dessous résume les étapes suivies :

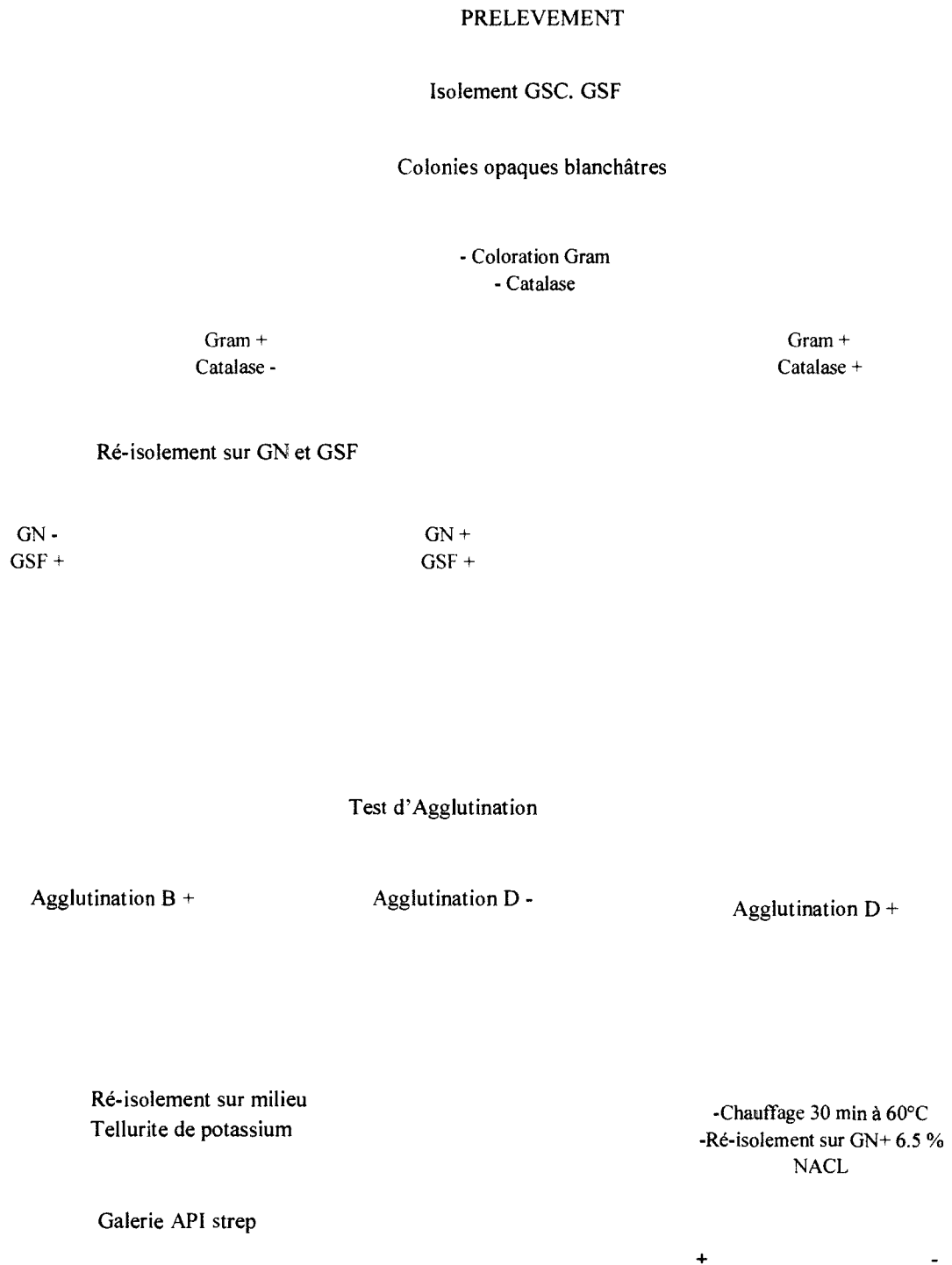


Figure 7 : Les étapes de l'étude bactériologique des entérocoques

V.3.1.1.1.Examen microscopique :**- Examen à l'état frais :**

L'examen à l'état frais permet d'observer les bactéries vivantes, afin de mettre en évidence leur mobilité, leur mode de regroupement et faire une approche de leur morphologie.

Technique :

- Deux cas sont à envisager :

✦ Prélèvement à partir d'une culture sur milieux solide :

Déposer sur une lame propre une petite goutte d'eau physiologique stérile, puis prélever une fraction de colonies sur gélose et faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement.

✦ Prélèvement à partir d'une suspension bactérienne :

Déposer sur la lame une goutte de la suspension à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

- Recouvrir d'une lamelle, puis observer rapidement à l'objectif 40.

Lecture :**Figure 8 : Examen à l'état frais (originale)****- Examen après coloration de Gram : (Annexe III)**

Il s'agit d'une "coloration double", qui permet de différencier entre les bactéries en fonction de leur forme (cocci ou bacille) mais aussi en fonction de leur affinité pour les colorants (Gram positif ou Gram négatif).

Technique :

- Réalisation d'un frottis : déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile, puis prélever à l'aide d'une pipette pasteur une parcelle de la culture. Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène. Etaler avec des mouvements circulaires du centre vers la périphérie. Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen sans trop le chauffer.

- Coloration : par le violet de gentiane pendant une minute, rincer à l'eau de robinet.

- Mordançage : recouvrir la lame de réactif de Lugol pendant 30 à 45 seconde, rincer à l'eau de robinet.

- Décoloration (alcoolo-résistance) : verser l'alcool goutte à goutte sur la lame inclinée, puis rincer à l'eau du robinet immédiatement.

- Contre coloration : par la fuschine diluée pendant 30 seconde à une minute.

- Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier absorbant.

- Observer à l'objectif 100 à l'immersion, à pleine lumière.

Lecture :

Au terme du processus de coloration, les bactéries à Gram positif apparaissent violettes tandis que les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

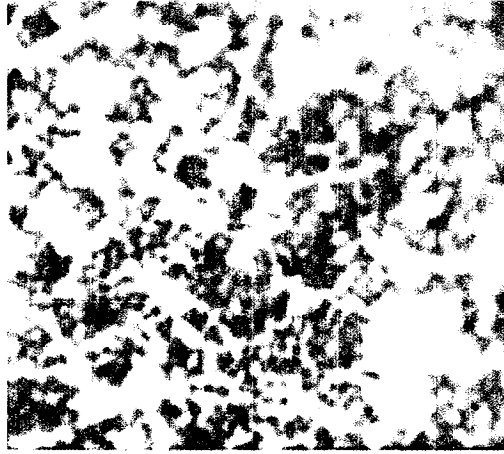
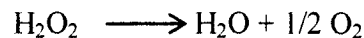


Figure 09 : Lecture de la coloration de Gram (originale)

V.3.1.1.2. Recherche de la catalase :

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif. C'est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $1/2 O_2$.

**Technique :**

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame. Y déposer, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.

Résultat :

- Dégageant gazeux (production d' O_2 provenant de la dégradation d' H_2O_2) : souche catalase (+).
- Absence de dégageant gazeux (absence de production d' O_2 provenant de la dégradation d' H_2O_2) : souche catalase (-).
- Les entérocoques sont catalase (-).

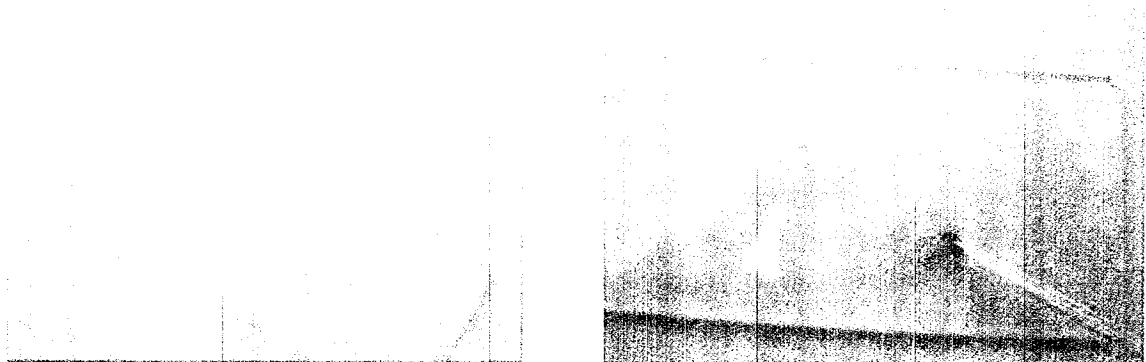


Figure 10 : Aspect du test positif et négatif de la recherche de la catalase (originale)

V.3.1.1.3. Isolement :

La culture des entérocoques est plus aisée et plus abondante que celle des streptocoques. Leur isolement se fait sur divers milieux de culture : milieu de base pour bactéries non exigeantes (gélose nutritive : GN) et/ou sur des milieux à base de sang (gélose au sang frais : GSF, gélose au sang cuit : GSC). (Annexe III)

Sur GN :

Les colonies sont légèrement opalescentes de 0,5 à 1 mm de diamètre.

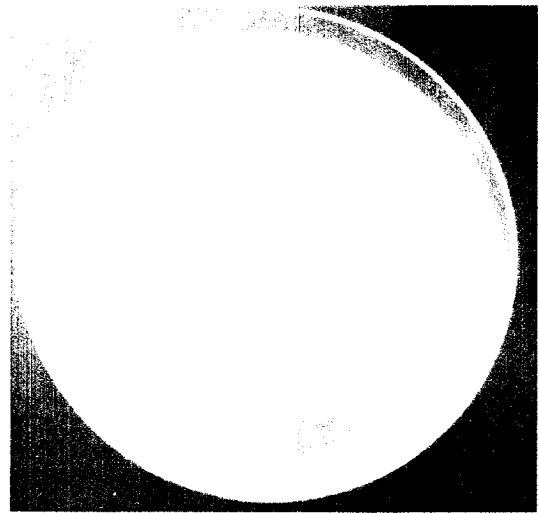
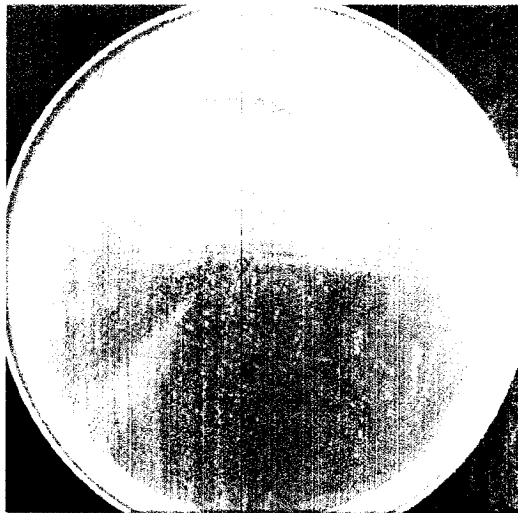


Figure 11 : Aspect des colonies des entérocoques sur GN (originale)

Sur GSF ou GSC :

Les colonies peuvent être non hémolytiques ou alpha-hémolytiques. Elles sont larges de plus ou moins 1,5 mm de diamètre, opaques ou blanchâtres.

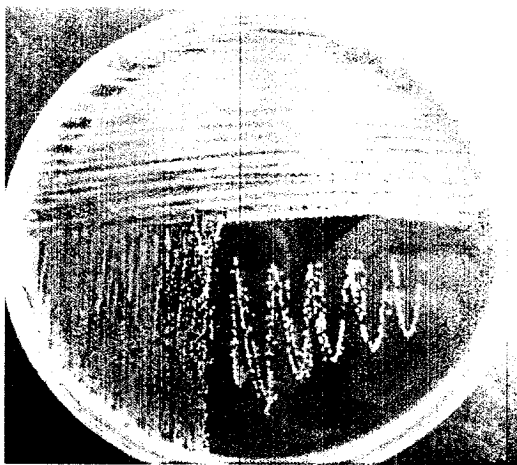


Figure 12 : Aspect des colonies des entérocoques sur GSF (Originale)



Figure 13 : Aspect des colonies des entérocoques sur GSC (Originale)

V.3.1.1.4. Les tests d'identification :

- **Identification du genre :**

- **Test d'agglutination :**

Il repose sur l'agglutination de particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques de chacun des groupes (A, B, C, D, F, G,.....) en présence de la souche possédant le polyside C correspondant (qui a été extrait enzymatiquement).

- **Ré-isolément sur gélose nutritive additionnée de 6.5% NaCl :** (Annexe IV)

Les entérocoques poussent dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl à l'inverse des streptocoques.

Mode opératoire :

Ensemencement :

Sur chaque boîte ensemencer :

- Un témoin positif (T+) : *E.feacalis* ATCC 29212 (pousse dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl).
- Un témoin négatif (T-) : *E.coli* ATCC 25922 (ne pousse pas dans des conditions hostiles de 6,5% de NaCl).
- La souche à tester (si on a plusieurs souches à tester, on peut diviser la boîte en portion de fromage).

Incuber à 35-37°C pendant 18h-24h.

Lecture et interprétation :

T(+) : poussé } On peut valider le test
T(-) : pas de poussé }

- Souche(s) testée(s) : la présence d'une culture est le signe d'un test positif (présence d'entérocoque) à confirmer par les tests d'identification biochimique.



Figure 14 : Aspect des colonies des entérocoques sur milieu GN additionné de 6.5% de NaCl après incubation (originale)

- Chauffage 30min à 60°C :

Les entérocoques peuvent survivre à un chauffage de 60 °C pendant 30 min.

Mode opératoire :**Préparation de l'inoculum :**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, prélever à l'aide d'un écouvillon sec stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml de BHIB (Brain Heart Infusion Broth : milieu d'enrichissement).
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, elle doit être riche.
- Mettre la suspension dans un bain marie ajusté à 60°C pendant 30min.

Ensemencement :

- Ensemencer par la technique de trois cadrans à l'aide d'un écouvillon sec stérile sur GN et un milieu à base de sang (GSF ou GSC).
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.
- Incuber aussi les suspensions utilisées dans les mêmes conditions.

Lecture et interprétation :

- Suspensions troubles : présence de bactérie.
- Une poussé sur les milieux appropriés est le signe d'un test positif (les souches testées ont résisté à un chauffage de 30min à 60°C).



Figure 15 : Aspect de la suspension bactérienne avant et après incubation (originale)



Figure 16 : Aspect des colonies des entérocoques sur GSC après chauffage 30 min à 60°C (originale)

- **Identification de l'espèce :**

L'identification de l'espèce a été faite à l'aide des tests suivants :

- **Ré-isolément sur milieu tellurite de potassium :** (Annexe IV)

Ce test permet la différenciation entre l'*E.feacalis* (résistant au tellurite) des autres entérocoques.

Mode opératoire :

Ensemencement :

Sur chaque boîte ensemencer :

- Un témoin positif : *E.feacalis* ATCC 51299 (résistant au tellurite).
- Un témoin négatif : *E.coli* ATCC 25922 (sensible au tellurite).
- La souche à tester (si on a plusieurs souches à tester, on peut diviser la boîte en portion de fromage).
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

T(+) : colonies noires } on peut valider le test

T(-) : pas de colonies noires }

- Souche(s) testée(s) : l'apparition de colonies noires est le signe d'un test positif (présence d'*E. feacalis*) à confirmer par les tests d'identification biochimique.

- **Ré-isolément sur milieu MH additionné d'imipénème :** (Annexe IV)

Ce test permet la différenciation entre l'*E.faecium* (résistant à l'imipénème) et les autres entérocoques ainsi que l'inhibition des entérobactéries (sensibles à l'imipénème).

Mode opératoire :

Ensemencement :

- Ensemencer par la technique de trois cadrans à l'aide d'un écouvillon sec stérile ou une pipette pasteur stérile.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

La présence d'une culture est en faveur d'*E. faecium* à confirmer par la coloration de Gram et les tests d'identification biochimique.

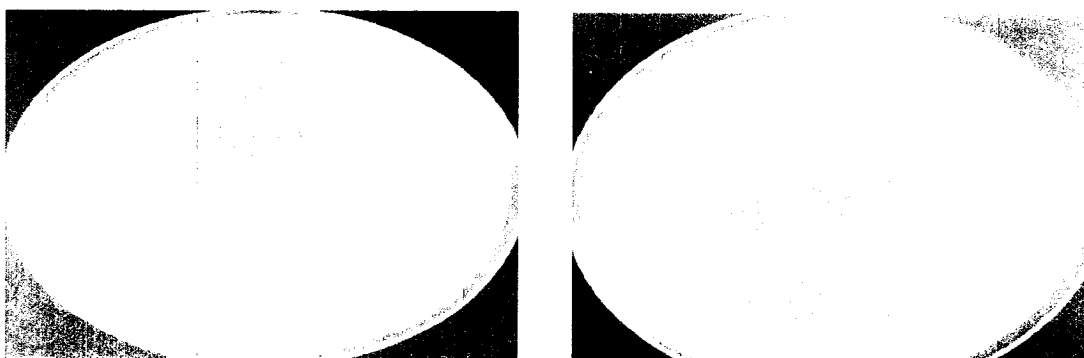


Figure 17 : Aspect des colonies des entérocoques sur milieu MH additionné d'imipénème (originale)

- Identification biochimique : Galerie API

L'identification de l'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, par l'utilisation des tests qui étudient le métabolisme protéique (la production de leucine aminopeptidase LAP, la pyrrolidonyl-arylamidase Pyr A, hydrolyse de l'arginine,), la fermentation des sucres, ainsi que l'hydrolyse de l'esculine.

Ces caractères sont mis en évidence par des galeries API 20 Strep. (Annexe V)



Figure 18 : Galerie API 20 Strep après incubation (originale)

API 20 Strep

Figure 19 : Fiche de résultat de la Galerie API 20 Strep (originale)

V.3.1.2. Recherche de la résistance des entérocoques aux glycopeptides :

L'organigramme suivant résume la démarche adoptée :

Recherche de la résistance

Antibiogramme standard :
Méthode par diffusion des disques

Détermination de la CMI

E-Test

Dilution en gélose de la
vancomycine

Figure 20: Recherche de la résistance des entérocoques aux glycopeptides (originale)

V.3.1.2.1. Antibiogramme standard : Méthode par diffusion des disques :

La recherche des souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides a été déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de disque de vancomycine charge de 30ug (VAN) et un disque de ticoplanine charge de 30ug (TEC) simultanément au niveau de l'antibiogramme standard des entérocoques.

L'antibiogramme a été effectué par la méthode de diffusion des disque préconisé par CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) 2014 et recommandé par l'OMS. (Annexe VI)

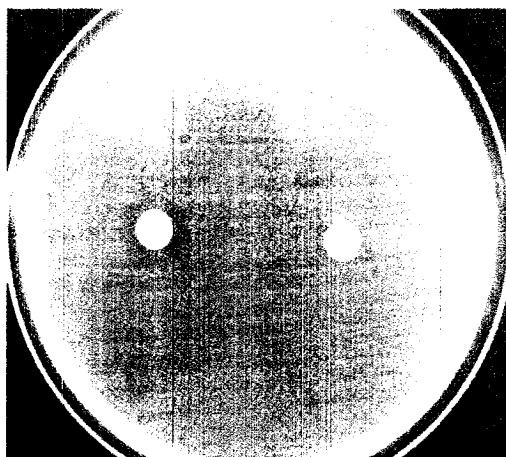


Figure 21 : Antibiogramme standard des entérocoques (VAN et TEC) (originale)

Un entérocoque est susceptible d'être résistant aux glycopeptides s'il présente l'un des signes d'alerte (Voir Chapitre II).

La confirmation de la résistance aux glycopeptides a été effectuée par la détermination de la CMI aux glycopeptide par technique de dilution en milieu gélosé et /ou l'E-test.

V.3.1.2.2. Détermination de la CMI :**-Technique de dilution en gélose de la vancomycine :**

La méthode de dilution est effectuée en milieu solide gélosé. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2. (Annexe VI)



Figure 22 : Préparation des dilutions
(CMI technique de dilution en gélose)
(Originale)

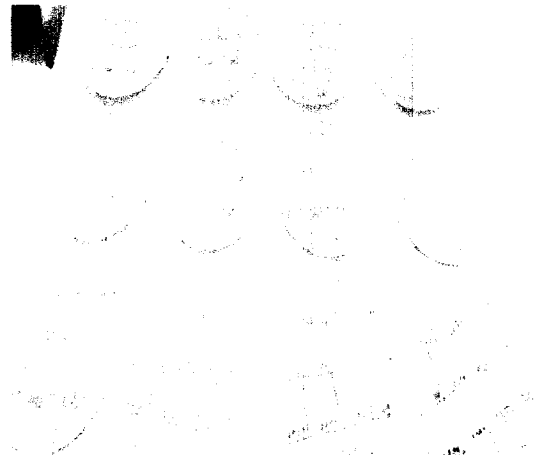


Figure 23 : Préparation des milieux
(CMI technique de dilution en gélose)
(Originale)



Figure 24 : Lecture des CMI
(Technique de dilution en gélose) (Originale)

-Technique de l'E-Test :

Cette technique, utilisant des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration d'antibiotiques, permet d'obtenir simplement et rapidement une détermination de la CMI, dans les mêmes conditions que l'antibiogramme standards. (Annexe VI)



Figure 25 : CMI bandelette de TEC et VAN (originale)

V.3.2. Prélèvements à visée de dépistage :

V.3.2.1. Recherche du portage digestif de l'ERG :

Des prélèvements de dépistage à la recherche du portage digestif de l'ERG ont été réalisés chez les patients cas et les patients contacts par écouvillonnage rectal.

Chez les patients cas le prélèvement a été fait le même jour où l'ERG a été mis en évidence dans le prélèvement à visée diagnostique, par contre chez les patients contacts le dépistage était hebdomadaire (J8, J15).

Mode opératoire :

- Milieu MH additionné d'imipénème (MHI).
- Milieu MH additionné de vancomycine (MHV) : (Annexe IV)

Ce milieu permet l'isolement des entérocoques résistants aux glycopeptides des autres entérocoques sensibles.

Ensemencement :

- Après humidification des écouvillons par du BHIB, ensemercer par la technique de trois cadrans à l'aide de l'écouvillon de prélèvement sur les deux milieux (MHI, MHV).
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

- Les colonies suspectes ont été identifiées selon les techniques conventionnelles disponibles (étude bactériologique).

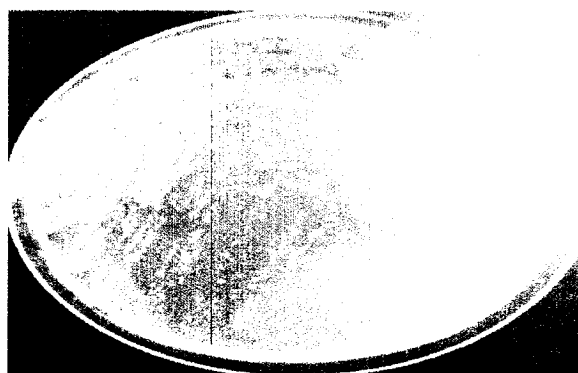


Figure 26 : Aspect des colonies des entérocoques sur milieu MH additionné d'imipénème (prélèvement à visée diagnostique) (originale)

La recherche de la résistance aux glycopeptides a été effectuée de la même manière que pour les souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique.

V.3.2.2. Recherche du portage nasal de SARM chez les patients porteurs connus de l'ERG :

Des écouvillonnages nasaux ont été réalisés chez les patients cas à la recherche du portage nasal de SARM.

Mode opératoire :

Après humidification des écouvillons par du BHIB, ensemercer par la technique de trois cadrans à l'aide de l'écouvillon du prélèvement sur milieu Chapman (milieu sélectif des staphylocoques).

- Incuber à 35-37°C pendant 36-48h.

- Si présence de culture et virage du milieu au jaune (fermentation du mannitol) : suspicion de *staphylococcus aureus* à confirmer par la galerie API Staph.

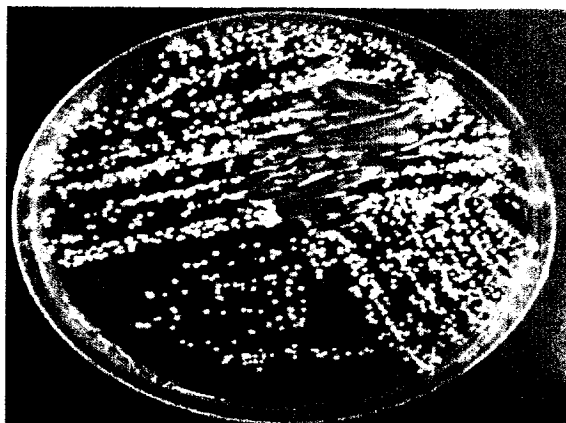


Figure 27 : Aspect des colonies des staphylocoques sur milieu Chapman (originale)

- Si présence du *Staphylococcus aureus* : rechercher la résistance à la méticilline.

V.3.3. Etude du prélèvement d'environnement :

Des prélèvements d'environnement ont été effectués au niveau de la chambre d'un patient cas. (Annexe VII)

Mode opératoire :

Prélèvement :

- Humidification des écouvillons par du BHIB, écouvillonnage des surfaces de la chambre.

- Décharger les écouvillons dans 5-10 ml de BHIB.

- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

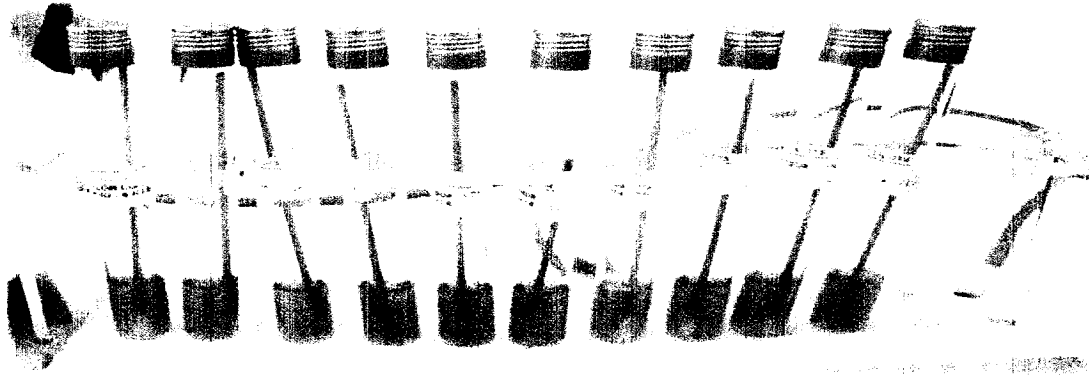


Figure 28 : Les différents prélèvements réalisés au niveau de la chambre (originale)

Ensemencement :

L'ensemencement a été effectué par la technique de trois cadrans sur :

- GN.
- Milieu MH additionné d'imipénème.
- Milieu MH additionné de vancomycine.

Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

Les colonies suspectes ont été identifiées selon les techniques conventionnelles disponibles (étude bactériologique), la recherche de la résistance aux glycopeptides a été effectuée de la même manière que pour les souches isolées à partir des prélèvements à visées diagnostique.

V.3.4. Etude moléculaire :

Les souches d'ERG identifiées ont été adressées à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour confirmation de l'identification et caractérisation du gène de résistance aux glycopeptides. La détermination du génotype a été effectuée par PCR conventionnelle.

V.3.5. Conservation des souches :

Les souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides isolées sont conservées dans des tubes contenant 0,5 ml de milieu de conservation, pour des études ultérieures.

CHAPITRE VI : RESULTATS

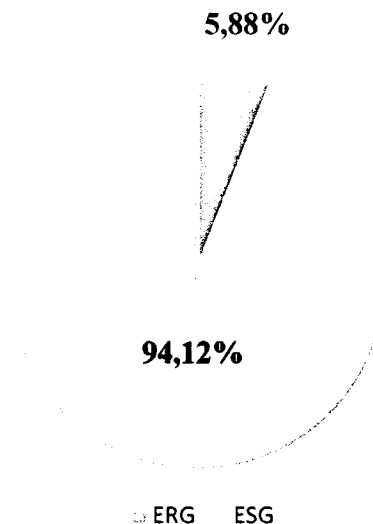
Les résultats obtenus se répartissent en trois volets :

- Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique.
- Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage.
- Résultats de l'enquête de l'environnement.

Pour l'étude rétrospective, les résultats étaient exploités à partir des registres et grâce au logiciel WHONET 5.6, qui est un logiciel utilisé pour la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

VI.1. Taux des ERG isolés au CHU Blida

Durant la période de l'étude, sur un total de 323 souches d'entérocoques isolées des différents types de prélèvement, 19 souches se sont révélées résistantes aux glycopeptides (13 souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique et 6 souches isolées à partir des prélèvements à visée de dépistage) soit un taux de 5,88%.



N=323

Figure 29 : Taux des ERG isolés au CHU Blida

ERG : entérocoques résistants aux glycopeptides

ESG : entérocoques sensibles aux glycopeptides

VI.2. Résultats de l'étude des prélèvements à visée diagnostique :

VI.2.1. Aspects épidémiologiques :

Parmi les souches d'entérocoques isolées à partir de différents types de prélèvement à visée diagnostique, 13 souches étaient résistantes aux glycopeptides.

Ces ERG sont issus des prélèvements de sujets hospitalisés ou externes, le tableau ci-après résume les résultats obtenus :

Tableau IX : Répartition des ERG selon le service et le type de prélèvement

Période de l'étude	Numéro de souches	Germe isolé	Prélèvement	Service
ETUDE RETROSPECTIVE	1	<i>Enterococcus. Spp</i>	Pus de plaie	CAC-hématologie
	2	<i>E. faecium</i>	Pus de plaie	CAC-hématologie
			Hémoculture	
	3	<i>E. faecium</i>	Hémoculture	CAC-réanimation
	4	<i>E. faecium</i>	Hémoculture	Réanimation polyvalente
	5	<i>E. faecium</i>	Hémoculture	CAC-chirurgie
	6	<i>E. faecium</i>	Hémoculture	CAC-hématologie
	7	<i>E. faecium</i>	Hémoculture	CAC-hématologie
8	<i>E. faecium</i>	Pus d'abcès	CAC-hématologie	
		Hémoculture		
ETUDE PROSPECTIVE	9	<i>E. faecium</i>	Pus d'abcès	CAC-hématologie
	10	<i>E. faecium</i>	Crachats	CAC-hématologie
	11	<i>E. faecium</i>	Fissure anale	CAC-hématologie
	12	<i>E. faecium</i>	Fissure anale	CAC-hématologie
	13	<i>E. faecium</i>	Coproculture	CAC-hématologie

VI.2.1.1. Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon la provenance des prélèvements (externe/interne) :

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides ont été isolées chez des patients hospitalisés (internes).

VI.2.1.2. Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon le service :

Sur les 13 souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides isolées, 12 souches provenaient du Centre Anti-Cancer (CAC) à savoir :

- 10 souches de l'unité d'hématologie ;
- 1 souche de l'unité de réanimation ;
- 1 souche de l'unité de chirurgie.

Et une souche provenait du service de la réanimation polyvalente du CHU.

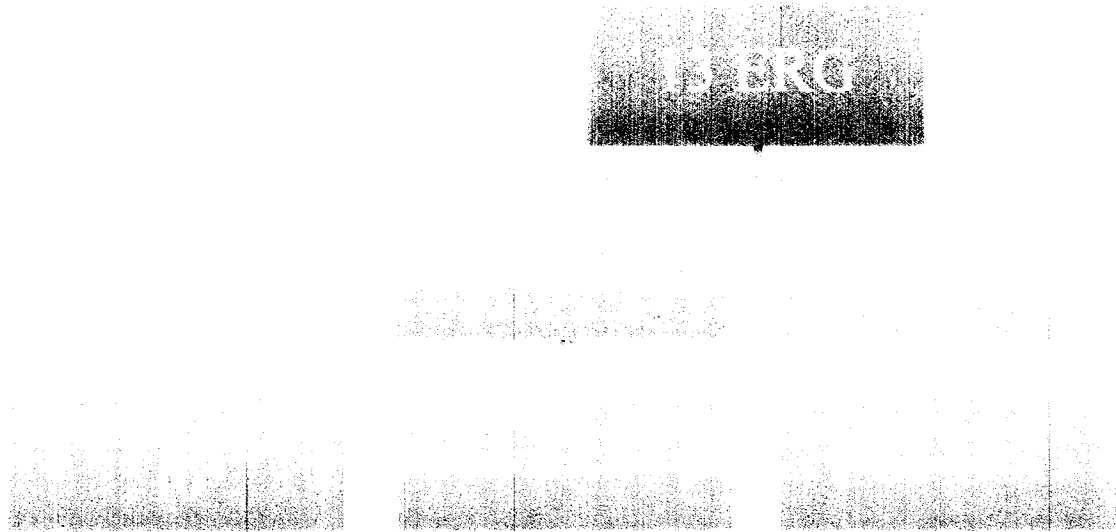


Figure 30 : Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon le service

VI.2.1.3. Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon le type de prélèvement :

La grande majorité des souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides isolées durant la période de notre étude provenait des hémocultures, suivi des pus.

VI.2.1.4. Répartition des entérocoques résistants aux glycopeptides selon l'espèce :

Dans cette étude, on note une nette prédominance de l'espèce *E. faecium* avec 12 souches sur les 13 souches isolées.

VI.2.2. Entérocoques résistants aux glycopeptides et résistances associées :

Le tableau ci-après résume les résultats de l'antibiorésistance des souches d'ERG aux antibiotiques testés :

Tableau X : Entérocoques et antibiorésistance

Molécule	Nombre de souches		
	Résistantes	Sensibles	Non testées
Ampicilline (AMP)	13	0	0
Tétracycline (TCY)	4	2	7
Gentamycine haut niveau (GHN)	13	0	0
Streptomycine haut niveau (SHN)	13	0	0
Ciprofloxacine (CIP)	5	0	8
Lévofloxacine (LVX)	7	0	6
Erythromycine (ERY)	13	0	0
Nitrofuranes (NIT)	3	8	2
Rifampicine (RIF)	7	0	6
Fosfomycine (FOS)	0	3	10
Quinupristine-Dalfopristine (QDF)	7	0	6
Chloramphénicol (CHL)	2	6	5
Vancomycine (VAN)	13	0	0
Teicoplanine (TEC)	13	0	0

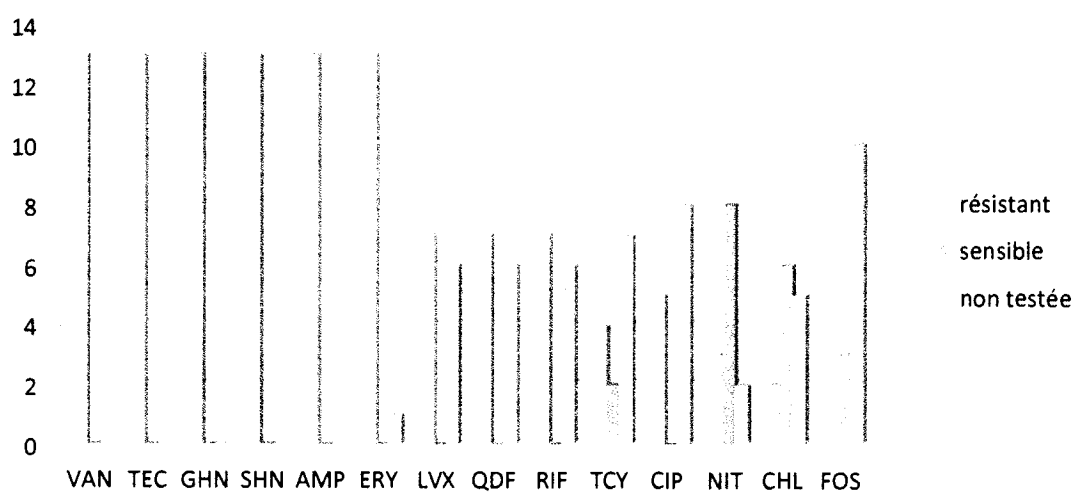


Figure 31 : Profil de résistance aux antibiotiques des ERG

Toutes les souches d'entérocoques isolées durant la période de l'étude, étaient résistantes aux deux glycopeptides testés (la vancomycine et la teicoplanine).

Nous remarquons que l'ensemble des souches ERG isolées étaient résistantes à la gentamycine haut niveau, streptomycine haut niveau, l'érythromycine et l'ampicilline.

VI.3.Résultats de l'étude des prélèvements à visée de dépistage :

Durant cette étude, nous avons recherché, le portage digestif des ERG et le portage nasal des SARM :

VI.3.1.Etude rétrospective :

La recherche du portage de l'ERG et de SARM a été effectuée chez deux patients cas sur sept à J₈ seulement.

VI.3.2.Etude prospective :

Nous avons recherché :

- Le portage digestif de l'ERG chez deux patients cas sur quatre et un patient contact à J₈ et J₁₅.
- Le portage digestif de l'ERG chez deux patients cas à J₈.
- Le portage nasal de SARM chez deux patients cas à J₈ et J₁₅ et chez les deux autres patients cas à J₈ uniquement.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Tableau XI : Résultats de dépistage de l'ERG et de SARM

Patients			Recherche de l'ERG		Recherche de SARM	
			J ₈	J ₁₅	J ₈	J ₁₅
Cas	Etude rétrospective	1	+	/	-	/
		2	+		-	
	Etude prospective	1	+	+	-	-
		2	+	+	-	-
		3	+	/	-	/
		4	+		-	
	Contact	1	-	-	/	

La recherche de l'ERG au niveau rectal était positive pour les patients cas et négative pour le patient contact, alors que la recherche de SARM au niveau nasal s'est révélée négative pour l'ensemble des patients.

VI.3.3.Antibiorésistance :

Les ERG isolées à partir des prélèvements à visée de dépistage présentaient le même profil d'antibiorésistance (antibiotype) que les souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique pour chaque patient.

VI.4.Résultats de l'enquête de l'environnement :

Nous avons mené une enquête de l'environnement au niveau de la chambre occupée par les deux premiers patients cas de l'étude prospective à la recherche de l'ERG.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XII : Résultats de l'enquête de l'environnement

Numéro de prélèvement	Site du prélèvement	Résultats
1	Lit + couverture	SCN Bacillus ESG
2	Potence	Bacillus SCN
3	Table	Bacillus SCN
4	Lit (bords + partie inferieure)	Bacillus SCN
5	Murs	Bacillus ESG SCN
6	Porte de la chambre + poignet	Bacillus SCN
7	Porte des sanitaires	<i>Pseudomonas. Spp</i> SCN ESG
8	Robinet	Bacillus SCN
9	Siphon	Bacillus

SCN : staphylocoque à coagulase négative

ESG : entérocoque sensible aux glycopeptides

La recherche de l'ERG au niveau des prélèvements de l'environnement s'est révélée négative.

VI.5.Résultats de l'étude moléculaire :

Parmi les 19 souches de l'ERG identifiées, 7 souches ont été adressées à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour confirmation de l'identification et caractérisation des gènes de résistance aux glycopeptides (4 souches de l'étude rétrospective et 3 souches de l'étude prospective), il s'agit d'*E.faecium* porteur de gène van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine.

CHAPITRE VII : DISCUSSION

- Les entérocoques sont des bactéries opportunistes, pouvant entraîner des infections invasives à la faveur d'une diminution des moyens de défense chez l'hôte. Ces bactéries peuvent acquérir une résistance aux glycopeptides (ERG) qui sont souvent la dernière alternative thérapeutique des infections sévères dues à des entérocoques multirésistants.

- Les ERG ont récemment fait leur apparition en Algérie, le premier cas d'entérocoque résistant aux glycopeptides a été rapporté en Algérie en 2007 (N.AGGOUNE et al 2008), alors qu'ils sont déjà présent à l'état endémique aux États-Unis et épidémique en Europe depuis quelques années (CDC 2013).

- La surveillance des entérocoques résistants aux glycopeptides est primordiale dans la prise en charge des infections générées par ces bactéries multirésistantes et dans la maîtrise de leur dissémination.

- C'est dans ce but que nous avons réalisé cette étude, qui s'est étalée sur une période de cinq ans et quatre mois allant de janvier 2011 à avril 2016 nous permettant d'actualiser les données épidémiologiques récentes au niveau du CHU Blida sur la dissémination des ERG.

- Notre étude a démontré que le taux des ERG au sein du CHU Blida est de 5.88%, ce taux est élevé par rapport :

✓ Aux données du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN) où sur un total de 4358 souches d'entérocoques isolées entre 2008 et 2014, 45 souches sont revenues résistantes à la vancomycine soit un taux de 1.03% et sur un total de 2517 d'entérocoques isolés 117 étaient résistantes à la teicoplanine soit un taux de 4.64% (AARN 2009, 2010, 2011, 2012, 2015, 2016).

Par ailleurs ce taux est considérablement bas par rapport à celui retrouvé :

✓ Dans l'étude effectuée au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie sur une période de dix ans (de janvier 2005 à décembre 2014)

Où sur un total de 330 souches d'entérocoques, 26 souches étaient résistantes à la vancomycine et 30 souches étaient résistantes à la teicoplanine soit un taux respectivement de 7.87% et 9.09% (S.BOUHERAOUA et al 2015).

✓ dans d'autres pays :

- En Europe par exemple, la prévalence des ERG varie entre 28% et 33% pour l'*Enterococcus faecalis* et entre 6,2% et 7,9% pour l'*Enterococcus faecium* au cours de la période allant de 2011 à 2014 (EARSS 2014), elle est de 20% en 2011 en France et diminue pour atteindre les 13% en 2014 pour l'espèce *Enterococcus faecalis* et chute de 1,4% à 0,5% pour l'*E.faecium* (InVS 2014, EARSS 2014).

- À la même période, le Royaume Uni a enregistré un taux oscillant entre 16% en 2011 et augmente vers les 30% à la fin de 2014 pour la première espèce et de 8,9 % à 21,3% pour la seconde espèce (EARSS 2014).

- Tous les entérocoques résistants aux glycopeptides ont été isolés chez des patients hospitalisés, ce qui concorde avec les données du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN) où sur un total de 162 souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides isolées entre 2008 et 2014, 140 souches ont été isolées chez des patients hospitalisés (AARN 2009, 2010, 2011, 2012, 2015, 2016). Laissant suggérer que l'acquisition a lieu probablement en milieu hospitalier.

- Les entérocoques sont isolés de prélèvements issus des patients hospitalisés au Centre Anti-Cancer (12 souches sur les 13 isolats) et au service de la réanimation polyvalente.

Ce taux élevé peut être expliquée par la présence des facteurs favorisant l'émergence des infections à l'ERG :

- ✓ La longue durée d'hospitalisation (> 15 jours) (V.SAKKA et al, 2008).
- ✓ L'hospitalisation en oncologie plus particulièrement en onco-hématologie (M-A.MONTECALVO et al, 1994).
- ✓ L'hospitalisation en réanimation (B-E.OSTROWSKY et al, 1999).
- ✓ L'utilisation massive de certains antibiotiques à large spectre comme les glycopeptides, les céphalosporines de 3^{ème} génération et les nitro-imidazolés (qui agissent sur la flore fécale mais sont inactifs sur les entérocoques), par conséquent ils exercent une pression de sélection sur les entérocoques et induisent l'émergence de résistances (C.RABAUD et al 2008, S.HENARD et al 2009).
- ✓ L'immunodépression.

- La majorité des ERG isolés dans notre étude provenait d'hémocultures ceci peut être expliqué par le fait que les entérocoques sont des bactéries opportunistes, pouvant entraîner des infections invasives à la faveur d'une diminution des moyens de défenses chez l'hôte (B-D.JETT et al 1994, N.BEN-OMAR et al 2004). A savoir que toutes les souches isolées dans cette étude provenaient des patients hospitalisés au sein des services du CAC-hématologie et du service de réanimation, qui sont des patients immunodéprimés.

- Sur le plan microbiologique, il ressort que l'*E.faecium* est l'espèce la plus fréquemment isolée (12 souches sur les 13 isolats), cette fréquence a été également rapportée par d'autres études :

- ✓ L'étude faite à l'Institut Pasteur d'Algérie entre janvier 2005 et décembre 2014 (21 souches sur les 26 isolats) (S.BOUHERAOUA et al 2015).
- ✓ L'étude faite au CHU de Constantine entre janvier 2011 à décembre 2014, 27 souches d'*Enterococcus faecium* résistantes aux glycopeptides ont été isolées

(H.LAOUAR et al 2015).

- Pour ce qui est de l'antibiorésistance, nous avons pu constater que les souches de l'ERG isolées présentent une résistance très importante à la gentamycine haut niveau, streptomycine haut niveau, l'érythromycine et l'ampicilline, cette multirésistance a été également rapportée dans une étude similaire de 33 souches d'*E.faecium* résistantes à la vancomycine isolées de septembre 2010 à février 2015 de plusieurs hôpitaux du centre, de l'est et de l'ouest d'Algérie qui a révélé que tous les isolats étaient résistants à au moins cinq familles d'antibiotiques en plus des glycopeptides (N.BENAMROUCHE et al 2015).

- La colonisation digestive précède l'infection, elle est à l'origine de la dissémination à bas bruit de l'ERG faisant craindre un risque d'épidémie. Au cours de notre étude, la recherche de l'ERG au niveau rectal était positive pour les patients cas.

Les ERG isolées à partir du prélèvement rectal présentaient le même antibiotype que les souches isolées à partir des prélèvements à visée diagnostique pour chaque patient. Ce qui nous informe sur l'origine probablement endogène de la bactérie.

L'absence de l'ERG au niveau du prélèvement rectal d'un seul patient contact n'est pas suffisante pour conclure qu'il n'y a pas eu de transmission (faible effectif).

- La recherche de SARM au niveau nasal s'est révélée négative pour l'ensemble des patients. La résistance aux glycopeptides a un impact non négligeable posant le risque redouté de transfert de cette résistance au *Staphylococcus aureus* suite à la co-colonisation des patients par ERG et SARM : plusieurs souches de SARM ayant acquis une résistance plasmidique à la vancomycine ont déjà été rapportées aux Etats-Unis (**HCSP 2010**).

En Algérie, aucun cas de SARM résistant aux glycopeptides n'a été détecté.

- L'environnement constitue un moyen non négligeable dans la dissémination des ERG (**O.LESENS 2009**). L'exposition à une chambre préalablement occupée par un patient ERG positif est un facteur prédictif significatif d'acquisition ultérieure des ERG. Sachant que deux patients cas porteurs d'ERG ont occupé la même chambre. Pour cela nous avons effectué des prélèvements d'environnement au niveau de cette chambre.

La recherche de l'ERG au niveau des prélèvements d'environnement, s'est révélée négative. Ceci peut être expliqué par le succès de la décontamination de la chambre vu que les prélèvements ont été réalisés après décontamination (**E.TACCONELLI et M-A.CATALDO 2008**).

- Parmi les 19 souches de l'ERG identifiées, 7 souches étaient d'*E.faecium* porteur de gène van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. Le même constat a été observé dans l'étude de **N.BENAMROUCHE et al** (septembre 2010 à février 2015) où tous les isolats étaient de génotype vanA. Le même génotype prédomine aux Etats-Unis et en Europe, alors que pour les pays asiatiques et l'Australie, c'est le phénotype VanB qui prédomine (**K-S.YANG et al 2007**).

Notre travail a eu pour but de déterminer le taux des entérocoques résistants aux glycopeptides, leurs caractéristiques épidémiologiques et de suggérer les facteurs favorisant l'émergence des infections à l'ERG au niveau du CHU Blida durant la période allant de janvier 2011 à avril 2016.

Sur un total de 323 souches d'entérocoques isolées, 19 souches ont été résistantes aux glycopeptides soit un taux de 5.88%.

Les sujets hospitalisés sont plus exposés aux ERG et plus particulièrement ceux qui proviennent des services du Centre Anti-Cancer.

L'espèce résistante aux glycopeptides la plus fréquente est l'*Enterococcus faecium*.

L'analyse des profils d'antibiorésistance des ERG isolés démontre que les souches, étaient résistantes à au moins quatre familles d'antibiotiques en plus des glycopeptides.

Parmi les 19 souches de l'ERG identifiées, 7 souches étaient d'*E. faecium* porteur de gène van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine.

Le potentiel réel de transfert des gènes de résistance de l'ERG vers des espèces plus virulentes, tel que *Staphylococcus aureus* est inquiétant.

L'isolement d'entérocoque résistant aux glycopeptides dans notre hôpital ainsi que dans d'autres CHU algériens représente une réelle menace. Ces bactéries résistantes aux conditions hostiles du milieu hospitalier sont difficiles à éradiquer une fois disséminées dans un hôpital ou dans un service.

L'amélioration des techniques d'identification bactériologique des entérocoques résistants aux glycopeptides, permettent de détecter à temps les infections dues à ce germe et d'éviter la dissémination des gènes de résistance à la vancomycine aux autres cocci à Gram positifs, notamment les staphylocoques.

La lutte contre ces BHR passe par l'application stricte des mesures d'hygiène, l'isolement des malades et des porteurs et par l'utilisation rationnelle des antibiotiques.

SECRET

CONFIDENTIAL

-A-

- **AGGOUNE.A, CHABANI.A, TIOUIT.D, NAIM.M, RAHAL.K**, octobre 2008. Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. Médecine et maladies infectieuses, vol : 38, p : 557-558.
- **AGUILAR-GALVEZ.A, DUBOIS-DAUPHIN.R, DESTAIN.J, CAMPOS.D, THONART.P**, octobre 2012. Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie. Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement, vol : 16 ; p : 67-76.
- **ALOUF.J**, février 1994. L'entérocoque a-t-il des facteurs de virulence ? . Médecine et maladies infectieuses, vol : 24, p : 149-151.
- **ANDERSON.J-S, MATSUHASHI. M, HASKIN.M-A, STROMINGER.J-L**, juillet 1967. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. The Journal of Biological Chemistry, vol: 242, P: 3180-3190.
- **ARCHAMBAUD.M, CLAVE.D**, juin 2007. *Enterococcus faecalis*, fiche technique Bactériologie 053 / 073, CHU de Toulouse Rangueil, p : 1-3.
- **ARIAS.C-A, PANESSO.D, MCGRATH.D-M, QIN.X, MOJICA.M-F, MILLER.C, DIAZ.L, TRAN.T-T, RINCON.S, BARBU.E-M, REYES.J, ROH.J-H, LOBOS.E, SODERGREN.E, PASQUALINI.R, ARAP.W, QUINN.J-P, SHAMOO.Y, MURRAY.B-E, WEINSTOCK.G-M**, septembre 2011. Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci. the new england journal of medicine, vol: 365, p: 892-900.
- **ARTHUR.M, DEPARDIEU.F, COURVALIN.P**, août 1999. Regulated interactions between partner and non-partner sensors and response regulators that control glycopeptide resistance gene expression in enterococci. Microbiology, vol: 145, p: 1894-1858.
- **ARTHUR.M, MOLINAS.C, BUGG.T-D-H, WRIGHT.G-D, WALSHC-T, COURVALIN.P**, avril 1992. Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol: 36, n°: 4; p: 867-869

-B-

- **BARNA.J-C-J, WILLIAMS.D-H**, octobre 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. Annual Review of Microbiology; Vol: 38, p: 339-357.
- **BEN-OMAR.N, CASTRO.A, LUCAS.R, ABRIOUEL.H, YOUSIF.N-M-K, FRANZ.C, HOLZAPFEL.W-H, PÉREZ-PULIDO.R, MARTÍNEZ-CANAMERO.M, GÁLVEZ.A**, septembre 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. Systematic and Applied Microbiology, vol: 27; p:118-130.
- **BERDAL.J-E, ESKESEN.A**, 2008. Short-term success, but long-term treatment failure with linezolid for enterococcal endocarditis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Vol: 40, p: 765-766.

- **BÉRENGER.R, BOURDON.N, AUZOU.M, LECLERCQ.R, CATTOIR.V**, aout 2011. In vitro activity of new antimicrobial agents against glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from France between 2006 and 2008. Médecine et Maladies Infectieuses. Vol : 41, p : 405–409
- **BIEDENBACHA.D-J, MOETA.G-J, JONES.R-N**, septembre 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among blood stream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol : 50, p: 59-69.
- **BIRGANDA.G, LUCETA.J-C**, juin 2013. Politique de dépistage des BMR : quand et qui faut-il dépister ? . Revue francophone des laboratoires, n° : 453, p : 29-39
- **BONNET.E**, 2008. Endocardite à *Enterococcus faecalis* traitée avec succès par la daptomycine. Médecine et maladies infectieuses, v : 38, p : 4-6.
- **BRYSON.H-M, SPENCER.C-M**, septembre 1996. Quinupristin-Dalfopristin. New Drug Profile, Vol: 52, p 406-415
- **BUDAVARI.S-M, SAUNDERS.G-L, LIEBOWITZ.L-D, KHOOSAL.M, CREWE-BROWN.H-H**, novembre 1997. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in South Africa. South African medical journal, Vol : 87,n° : 11, p : 1557.
- **BUTCU.M, AKCAY.S-S, INAN.A-Z, AKSARAY.S, ENGIN.D-O, CALISICI.G**, aout 2011. In vitro susceptibility of enterococci strains isolated from urine samples to fosfomycin and other antibiotics. Journal of infection and chemotherapy, vol: 17, p: 575-578.

-C-

- **CARBON.C**, 1991. Traitement antibiotique des endocardites infectieuses. L'Information cardiologique, vol : 15, n° : 8, p : 601-605
- **CAVALLO.J-D, FABRE.R, JEHL.F, RAPP.C, GARRABE.E**, aout 2004. Les béta-lactamines. EMC-maladies infectieuses, vol : 1, p : 129-202.
- **CETINKAYA.Y, FALK.P, MAYHALL.C-G**. octobre 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Clinical microbiology reviews, vol: 13, n°: 4, p: 686–707.
- **CHEN.H, HOOVER.D-J**, novembre 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive reviews in food science and food safety, vol: 2; p 82-100.
- **CHOW.J-W**, aout 2000. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. Clinical infectious diseases. Vol: 31, n°: 2, p: 586–589.
- **CHOW.J-W, THAL.L-A, PERRI.M-B, VAZQUEZ.J-A, DONABEDIAN.S-M, CLEWELL.D-B, ZERVOS.M-J**, novembre 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol: 37, n°: 11; p: 2474-2477.
- **COURVALIN.P**, 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. Clinical Infection Diseases, vol: 42, p: 25-34.

-D-

- **DEKEYSERS.S, BECLIN.E, DESCAMPS.D**, Avril 2011. intérêt de la mise en place de la recherche des gènes van A et van B par technique PCR en système clos (Xpert vanA/vanB Cepheid) dans un laboratoire de microbiologie dans le cadre de la gestion d'une épidémie à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (EfrG). Pathologie Biologie ; Vol : 59, p : 73–78.

- **DELAMARE.C, LAMELOISE.B, LOZNIEWSKI.A, PERRIN.M, BAUDIN.C, SELLIES.J, DUMAY.M, M. BEMER.M.** novembre-décembre 2008. Épidémie en réanimation médicochirurgicale d'*Enterococcus faecium* résistants aux glycopeptides (ERG) avec cocirculation de deux clones différents. *Pathologie Biologie*, vol : 56, p : 454-460.
- **DELMAS.C**, décembre 2003. *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, fiche technique *Bactériologie* 34, CHU de Purpan, p : 1-3.
- **DEL-PAPA.M-F, HANCOCKL-E, THOMAS.V-C, PEREGO.M**, Décembre 2007 Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal of bacteriology*, vol: 189, n°: 24; p: 8835-8843.
- **DEPARDIEU.F, COURVALIN.P, KOLB.A**, juillet 2005. Binding sites of VanRB and σ 70 RNA polymerase in the vanB vancomycin resistance operon of *Enterococcus faecium* BM4524. *Molecular microbiology*, vol: 57, p: 550-564.
- **DEPARDIEU.F, KOLBERT.M, PRUUL.H, BELL.J, COURVALIN.P**, octobre 2004. Van D-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol: 48, n°: 10, p: 3892-3904.
- **DEPARDIEU.F, REYNOLDS.P-E, COURVALIN.P**, janvier 2003. Van D-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol: 47, n°:1, p: 7-18.
- **DORTU.D, THONART.P**, 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement*, vol : 13 ; p : 143-154.
- **DOSSO.M, BISSAGNENE.E, COULIBALY.M, PAYE.H-K, N'DOUBA.A, GUESSENND.N, DIAHA.H, BOUZID.S-A, AKOUA-KOFFL.C, M'BENGUE.A, GNAGNE-ADOU.P, FOFANA.K, KADIO.A**, mai 2000. Résistances acquises et prescriptions d'antibiotiques en Afrique : quelles adéquations ?. *Médecine et maladies infectieuses*, vol : 30, p : 197-204.
- **DOUBLET.B, BOUSQUET-MELOU.A, MADEC.J.Y**, 2012. Le concept « One Health » en antibiorésistance et les flux de gènes, *Innovations Agronomiques*, n°24, p : 79-90.
- **DUTKA-MALEN.S, COURVALIN.P**, février 1994. Résistance aux glycopeptides et aux aminosides chez les entérocoques, *Médecine et Maladie Infectieuse*, vol : 24, p : 158-164.

-E-

- **EATON.T-J, GASSON.M-J**, Avril 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, vol : 67, n°: 4; p :1628-1635.
- **EVERS.S, COURVALIN.P**, mars 1996. Regulation of VanB-Type Vancomycin Resistance Gene Expression by the VanSB-VanRB Two-Component Regulatory System in *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of bacteriology*, vol: 178, n°: 5, p: 1302-1309.

-F-

- **FINES.M, LECLERCQ.R, BOURDON.N**, Novembre 2007. Épidémies à entérocoques résistants aux glycopeptides en France-rôle du laboratoire. Revue francophone des laboratoires, vol : 2007, n°396; p : 33-39.
- **FISHER.K, PHILLIPS.C**. juin 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology, vol: 155; p: 1749-1757.
- **FLANNAGAN.S-E, CHOW.J-W, DONABEDIAN.-M, BROWN.W-J, PERRI.M-B, ZERVOS.M-J, OZAWA.Y, CLEWELL.D-B**, décembre 2003. Plasmid Content of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolate from a Patient Also Colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA Phenotype. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol : 47, n°: 12, p : 3954–3959.
- **FORTINEAU.N, LECLERCQ.R, MAUGAT.S, ROBERT.J**, Juin 2008. Entérocoques résistants à la vancomycine : données des réseaux de l'ONERBA et résultats de l'enquête nationale trans-réseaux 2006 sur le portage digestif. Médecine et maladies infectieuses; vol : 38 ; p : 65-67.
- **FRIÃES.A, RESINA.C, MANUEL.V, LITO.L, RAMIREZ.M, MELO-CRISTINO.J**, mars 2015, Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. Epidemiology and Infection, Vol: 143, p : 745-748.

-G-

- **GHOLIZADEH.Y, COURVALIN.P**, novembre 2000. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. International Journal of Antimicrobial Agents, vol : 16, p : 11-17.
- **GODREUIL.S, MARCHANDIN.H, BOULIER.A, BOUMZEBRA.A, CAMPOS.J, JEAN-PIERRE.H**, novembre 2007. Dépistage des entérocoques résistants aux glycopeptides : six ans d'étude dans trois services de réanimation au CHU de Montpellier. Pathologie Biologie, vol : 55, p : 418–423.
- **GOLD.H-S, BYERSA.K-E, ANGLIMA.A-M, ANNESKIA.C-J, GERMANSONA.T-P, DURBINA.L-J, SIMONTONA.B-M, FARR.B-M**, mars 2001, A Hospital Epidemic of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Risk Factors and Control. Infection Control and Hospital Epidemiology, vol: 22, p: 140-147
- **GRAHAM.J-C, GOULD.F-K**, mars 2002. Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol: 49; p : 437-444.
- **GUTMAN.L**, février 1994. Résistance des entérocoques aux bêtalactamines et conséquences sur les synergies. Médecine et maladies infectieuses ; vol : 24, p : 165-171.

-H-

- **HACHEMA.R, RAAD.I**, janvier 2002. Failure of Oral Antimicrobial Agents in Eradicating Gastrointestinal Colonization With Vancomycin-Resistant Enterococci. Infection Control and Hospital Epidemiology, Vol : 23, p : 43-44.

- **HALL.L-M-C, DUKE.B, URWIN.G, GUINEY.M.** aout 1992, Epidemiology of Enterococcus faecalis urinary tract infection in a teaching hospital in London, United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology* . Vol: 30, n°: 8; p: 1953-1957.
- **HAMIDI.M, AMMARI.H, GHAFFOR.M, BENAMROUCHE.N, TALIMAAMAR.H, TALA-KHIR.F, RAHAL.K,** janvier-février 2013. Émergence d'Enterococcus faecium résistant aux glycopeptides en Algérie : à propos d'un cas. *Annales de biologie clinique*, vol : 71, n° : 1, p : 104-106.
- **HARDIE.J-M, WHILEY.R-A,** octobre 1997. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Applied Microbiology*; vol: 83, p: 1-11.
- **HARVEY.B-S, BAKER.C-J, EDWARD.M-S.** septembre 1992 – Contributions of complement and immunoglobulin to neutrophilmediated killing of enterococci. *Infection and Immunity*. vol: 60, n°: 9, p 3635-3640 .
- **HAYDEN.M-K, BONTEN.M-J-M, BLOM.D-W, LYLE.E-A, VAN DE VIJVER DAMC, WEINSTEIN.R-A,** 2006. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant Enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clinical Infectious Diseases*, vol : 42, n° : 11, p : 1552-1560.
- **HENARD.S, CAO-HUU.T, LOOS-AYAV.C, CHANET.P, KESSLER.M, RABAUD.C,** juin 2009. Conduite adoptée face à une épidémie à ERG (ERV) dans un établissement de santé. *Néphrologie et Thérapeutiques*, vol : 5, p : 265-271.
- **HERNANDEZ.E, CAVALLO.J-D, SOULLIE.B, FABRE.R,** 1999. Entérocoques résistants aux glycopeptides en 1999. *Feuillets de biologie*, vol : 40, n° : 227, p : 29-36.

-I-

- **ISAKOW-W, MORROW.L-E, KOLLEF.M-H,** juillet 2007. Probiotics for preventing and treating nosocomial infections. *Chest journal*, vol : 132, n° : 1, p : 286-294.

-J-

- **JACQUELINE.C, CAILLON.J, LE MABECQUE.V, MIEGEVILLE.A-F, DONNIO.P-Y, BUGNON.D, POTEL.G,** mars 2003. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by time-kill curve methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol: 51, n°: 4, p: 857-864.
- **JEHL.C, VOGEL.T, LAVIGNE.T, HITTIA, BERTHEL.M, KALTENBACH.G,** juillet-aout 2011. Suivi prospectif de patients excréteurs d'entérocoques résistants aux glycopeptides en unité de soins de longue durée et efficacité des mesures de précaution « contact », *la presse médicale*, vol : 40, p : 325-332.
- **JETT.B-D, HUYCKE.M-M, GILMORE.M-S.** octobre 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol: 7, n°: 4, p: 462-478.
- **JOHNSON.A-P, UTTLEY.A-H-C, WOODFORD.N, GEORGE.R-C.** juillet 1990. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clinical Microbiology reviews*, vol : 3, n° : 3, p. 280-291.

- **JORDAN.D-C, INNIS.W-E.** décembre 1959. Selective inhibition of ribonucleic acid synthesis in *Staphylococcus aureus* by vancomycin. *Nature*, vol : 184 p : 1894-1895.
- **JORDAN.D-C, MALLORY.H-D-C.** 1964. Site of action of vancomycin on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* , vol: 10, P: 489-494.

-K-

- **KALTENBACH.M-L, VISTELLE.R,** juin 1998. Adaptation de la posologie des antibiotiques II, Les glycopeptides. *Revue française des laboratoires*, vol : 1998, N°304 ; p : 47-54.
- **KAYSER.F-H,** décembre 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*, vol: 88, p: 255-262.
- **KURUP.A, CHLEBICKI.M-P, LING.M-L, KOH.T-H, TAN.K-Y, LEE.L-C, HOWE.B-M,** avril 2008. Control of a hospital-wide vancomycin-resistant Enterococci outbreak. *American Journal of Infection Control*, Vol : 36,P : 206-211.

-L-

- **LAVIGNE.J-P,** janvier 2007. Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. *Bactériologie, Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes.* p : 1-3 .
- **LECLERCQ.R,** janvier 1997. Résistance bactérienne aux glycopeptides. *Médecine thérapeutique*, vol : 3, p : 77-85.
- **LECLERCQ.R,** septembre 2002. Les coques à Gram-positif multirésistants aux antibiotiques : intérêt du linézolide, *Médecine et maladies infectieuses* vol : 32, p : 449-459.
- **LECLERCQ.R, CATTOIRA.V,** septembre-octobre 2012. Bactéries à Gram positif et glycopeptides. *Revue francophone des laboratoires*, vol : 2012, n° 445 ; p : 41-46.
- **LECLERCQ.R, COURVALIN.P,** Avril 1997. Resistance to Glycopeptides in Enterococci. *Clinical Infection Diseases*, vol : 24, n°4 P: 545-554.
- **LEE.K, KIM.Y-A, PARK.Y-J, LEE.H-S, KIM.M-Y, KIM.E-C, YONG.D, CHONG.Y, KOREAN NATION WIDE SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GROUP,** aout 2004. Increasing prevalence of vancomycin-resistant enterococci, and cefoxitin-, imipenem- and fluoroquinolone-resistant Gram-negative bacilli: a KONSAR study in 2002. *Yonsei medical journal*, vol : 45, p : 598-608.
- **LEFLON-GUIBOUT.V, LEGRAND.J, BOURDON.N, NICOLAS-CHANOINE.M-H, BERT.F,** février 2009. Émergence d'entérocoque dépendant de la vancomycine à la suite d'un traitement par glycopeptide : cas clinique et revue. *Pathologie Biologie*, vol : 57 ; p : 56-60.
- **LÉONE.M, AYEM.M-L, MARTIN.C,** mars 2000. Les glycopeptides. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, vol : 19 ; p : 177-187.
- **LESENS.O,** juin 2009. L'entérocoque résistant à la vancomycine (ERV). *Néphrologie et Thérapeutiques*, vol : 5, p : 261-264.
- **LESENS.O, ROBIN.F, CORBIN.V, VIDAL.M, SANCHIS.A-M, JULIEN.F, GOURDON.F, ROMASZKOJ-P, CORMERAIS.L, SOUWEINE.B, TRAOREO, BEYTOUT.J, LAURICHESSE.H,** juillet-aout 2006. Entérocoques résistant aux

glycopeptides dans un contexte endémo-épidémique. Presse Médicale, vol : 35, édition : Masson, p : 1167-1173.

- **LUCET.J-C, ANDREMONT.A, COIGNARD.B**, novembre 2008. Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) : situation épidémiologique, mesures de contrôle actuelles et enjeux à venir. Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH), n° : 41-42, p : 386-390.

-M-

- **MAINARDI.J-L**, mars 2011. Les glycopeptides : stop ou encore ?. La Revue de médecine interne, vol : 32 ; p : 139-141.
- **MAINARDI.J-L, GUTMANN.L, ACAR.J-F, GOLDSTEIN.F-W**, septembre 1995. Synergistic Effect of Amoxicillin and Cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol : 30, n° : 9, p : 1984-1987.
- **MAKINSON.A, LEMOING.V**, avril 2008. Nouveaux antibiotiques anti-gram + dans l'endocardite infectieuse, une place encore difficile à préciser. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie, Vol : 57, p : 88-92.
- **MANLEY.K-J, FRAENKEL.M-B, MAYALL.B-C, POWER D-A**, mai 2007. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci a randomised controlled trial. Medical journal of Australia, vol : 186, n : 9, p: 454-457.
- **MONDY.K-E, SHANNON.W, MUNDY.L-M**, 2001. Evaluation of Zinc Bacitracin Capsules versus Placebo for Enteric Eradication of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium*. Clinical Infectious Diseases, vol : 33, n°: 4, p : 473-476.
- **MONTECALVO.M-A, HOROWITZ.H, GEDRIS.C, CARBONARO.C, TENOVER.F-C, ISSAH.A, COOK.P, WORMSER.G-P**, 1994. Outbreak of vancomycin, ampicillin, and aminoglycoside resistant *Enterococcus* bacteremia in an adult oncology unit. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol : 38, p:1363-1367
- **MONTRAVERS.P, ANDREMONT.A, MASSIAS.L, CARBON.C-L**, 1995. Rôle pathogène de l'entérocoque dans un modèle d'infection intra-abdominale expérimentale. Médecine et maladies infectieuses, vol : 25, n°:10; p: 1038-1039.
- **MONTRAVERS.P, CARBON.C-L**, février 1994. Les modèles expérimentaux permettent-ils de caractériser le rôle pathogène des entérocoques ? .Médecine et maladies infectieuses; vol : 24 ; p : 152-157.
- **MURRAY.B-E**. janvier 1990. The life and time of the *Enterococcus* .Clinical Microbiology Reviews. vol: 3, n°: 1; p: 46-65.

-N-

- **NAGARAJAN.R**, avril 1991. Antibacterial activities and modes of action of vancomycine and related glycopeptides. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol: 35, n°: 4; P: 605-609.

-O-

- **OSTROWSKY.B-E, VENKATARAMAN.L, D'AGATA.E-M-C, GOLD.H-S, DEGIROLAMI.P-C, SAMORE.M-H**, 1999. Vancomycin-resistant enterococci in Intensive Care Units. Arch Intern Med, vol: 159 p :1467-1472

-P-

- **PARENTI.F** mars 1986. Structure and mechanism of action of teicoplanin. Journal of hospital infection, vol: 7, P: 79-83.
- **PARIZE.P, MAINARDI.J-L**, octobre 2011. Les actualités dans l'endocardite infectieuse. La revue de médecine interne, vol : 32 ; p : 612–621.
- **PITTET.D, HUGONNET.S, HARBARTH.S, MOUROUGA.P, SAUVAN.V, TOUVENEAU.S, PERNEGER.T-V**, octobre 2000. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. The lancet, vol: 356, n°: 9238, P: 1307-1312
- **PORWANCHER.R, SHETH.A, REMPHREY.S, TAYLOR.E, HINKLE.C, ZERVOS.M**, novembre 1997. Epidemiological Study of Hospital-Acquired Infection With Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Possible Transmission by an Electronic Ear-Probe Thermometer. Infection Control and Hospital Epidemiology, Vol : 18, p771-773
- **POUJOL.I, THIOLET.J, BERNET.C, CARBONNE.A, DUMARTIN.C, SENECHAL.H**, octobre 2010. Signalements externes des infections nosocomiales, France 2007-2009. Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH), institut de veille sanitaire(InVS), n° : 38-39, p : 393-397

-Q-

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

-R-

- **RABAUD.C, HENARD.S, JOUZEAU.N, VILLAUME.M**, juin 2008. Prise en charge d'une épidémie de colonisation digestive à entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans la région Lorraine. Médecine et maladies infectieuses, vol : 38, p : 103-105 .
- **REYNOLDS.P-E**, novembre 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. European journal of clinical microbiology and infectious diseases, vol: 8, P: 943-950.
- **REYNOLDS.P-E, COURVALIN.P**, janvier 2005. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol: 49, n°: 1, P: 21-25.
- **ROBERT.J**, Juin 2007. Conduite à tenir devant un malade porteur d'un entérocoque résistant à la vancomycine. Réanimation, vol : 16 ; p : 259–262.
- **ROSSI.F, DIAZ.L, WOLLAM.A, PANESSO.D, ZHOU.Y, RINCON.S, NARECHANIA.A, XING.G, DI-GIOIA.S-R, DOI.A, TRAN.T-T, REYES.J, MUNITA.J-M, CARVAJAL.L-P, HERNANDEZ-ROLDAN.A, BRANDÃO.D, VAN DER HEIJDEN.M, MURRAY.B-E, PLANET.P-J, WEINSTOCK.G-M, ARIAS.C-A**, avril 2014. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. The new England journal of medicine, vol : 370, p : 1524-1531.
- **RUBINSTEIND.E, COREYA.G-R, KOLLEF.M-H, SHORR.A-F, STRYJEWSKI.M-E, HOPKINS.A, BARRIERE.S-L**, avril 2014. Telavancin for Hospital-Acquired Pneumonia: Clinical Response and 28-Day Survival. Antimicrobial agents and chemotherapy, vol: 58, n°: 4, p : 2030-2037

-S-

- **SAKKA.V, TSIODRAS.S, GALANIL, ANTONIADOU.A, SOULIM, PANTELAKI.M, SIAFAKAS.N, ZERVA.L, GIAMARELLOU.H**, janvier 2008. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin resistant enterococci. *Clinical Microbiology Infection*, vol : 14, p : 14-21
- **SANCHEZ.J, BASANTA.A, GÓMEZ-SALA.B, HERRANZ.C, CINTAS.L-M, HERNÁNDEZ.P-E**, juillet 2007. Antimicrobial and safety aspects and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *International Journal of Food Microbiology*, vol: 117; p295-305.
- **SCHLEIFER.K-H, KILPPER-BÄLZ.R**, janvier 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus*. *International journal of systematic bacteriology*, vol: 34, n°: 1; p 31-34.
- **SHLAES.D-M, GERDING.D-N, JOHN.J-F**, 1997. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance : Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clinical infectious diseases*, vol : 25, p : 584-99.
- **SHOCKMAN.G-D, BARREN.J-F**, octobre 1983. Structure, function and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, vol: 37, P: 501-527.
- **SINGH.K-V, WEINSTOCK.G-M, MURRAY.B-E**, juin 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol: 46, n°: 6; p. 1845-1850.
- **STUCKI.K, HARBARTH.S, NENDAZ.M**, octobre 2014. Infections à entérocoques : du plus simple au plus complexe. *Revue Médicale Suisse*, vol : 10, n°446 ; p : 1918-1923.
- **SURCOUF .C, FABRE.M, ENOUF.V, CADE.S, SOLER.C, MAC NAB.C, SAMSON.T, FOISSAUD.V**, juin 2011. Portage d'entérocoques résistants aux glycopeptides : les techniques d'isolement et d'identification actuelles sont-elles suffisantes ? *Pathologie Biologie*, vol : 59, p : 146–150.

-T-

- **TACCONELLI.E, CATALDO.M-A**, février 2008. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Antimicrobial agents*, vol : 31, p: 99-106
- **THIOLET.J-M, POUJOLI, VAUX.S, ALLEAUME.S, COIGNARD.B**, 2011. Le signalement des infections nosocomiales: un outil pour la détection et le suivi des infections émergentes en établissements de santé en France. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH), institut de veille sanitaire(InVS)*, n° : 15-17, p : 193-197.
- **TROILLET.N, BALLY.F**, mars 2011. Entérocoques résistants à la vancomycine, *Caduceus express*, vol : 13, n° : 2, p : 1.

-V-

- **VAN-BELKUM.M-J, STILES.M-E**, juin 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. The Royal Society of Chemistry, vol: 17; p : 323-335.
- **VON-GOTTBERG.A, NIEROP.W-V, DUSE.A, KASSEL.M, MCCARTHY.K, BRINK.A, MEYERS.M, SMEGO.R, KOORNHOF.H**, février 2000. Epidemiology of Glycopeptide-Resistant Enterococci Colonizing High-Risk Patients in Hospitals in Johannesburg, Republic of South Africa. Journal of clinical microbiology, vol: 38, n°: 2, p: 905-909.

-W-

- **WACHINO.J-I, ARAKAWA.Y**, juin 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyl transferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update . Drug resistance updates; vol: 15, p: 133-148.
- **WEINSTEIN.M-R, DEDIER.H, BRUNTON.J, CAMPBELL.I, CONLY.J-M**, 1999. Lack of Efficacy of Oral Bacitracin Plus Doxycycline for the Eradication of Stool Colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. Clinical Infectious Diseases, vol : 29, n°: 2, p : 361-366 .
- **WILLIAMS.A-H, GRUNENBERG.R-N**. octobre 1988. Teicoplanin revisited. Antimicrobial Chemotherapy ; vol : 22, n° : 4 ; P : 397-401.

-Y-

- **YALA.D, MERAD.A-S, MOHAMED.I.D, OUAR-KORICHI.M-N**, 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb, n°91 ; p : 5-12 .
- **YAMANE.N, JONES.N-R**, juillet-aout 1991. In vitro activity of 43 antimicrobial agents tested against ampicillin-resistant enterococci and Gram-positive species resistant to vancomycin. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Vol : 14, P : 337-345.
- **YANG.K-S, FONG.Y-T, LEE.H-Y, KURUP.A, KOH.T-H, KOH.D, LIM.M-K**, juin 2007. Predictors of Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) Carriage in the First Major VRE Outbreak in Singapore. Annual Academic Medical Singapore, vol: 36, p: 379-383.

-Z-

- **ZAAS.A-K, SONG.X, TUCKER.P, PERL.T-M**, 2002. Risk Factors for Development of Vancomycin-Resistant Enterococcal Bloodstream Infection in Patients with Cancer Who Are Colonized with Vancomycin-Resistant Enterococci. clinical Infectious Diseases, vol : 35, n°: 10, p : 1139-1146

-B-

- **BENAMROUCHE.N, TALI MAAMAR.H, GUETTOU.B, HENNICHE.F, ASSAOUS.F, LAOUAR.H, BENTCHOUALA.C, DJENNANE.F, ZIANE.H, TIOUIL.D, TAZIR.M, NAIM.M, RAHAL.K**, Mai 2015. Emergence d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine en Algérie : Caractérisation phénotypique et génotypique des isolats. Communication affichée. 8^{ème} Journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de Lutte contre les Infections Associées aux Soins.
- **BOUHERAOUA.S, DJEDJIG.F, BENAMROUCHE.N, TALI MAAMAR.H, RAHAL.K**, Mai 2015. Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérocoques : place de l'*E.faecium*. Communication affichée, 8^{ème} Journée Nationale d'Hygiène Hospitalière et de Lutte contre les Infections Associées aux Soins.

-L-

- **LAOUAR.H, LEZZAR.A, BENTCHOUALA.C, SMATIF, DOUAHLO, ALLEG.H, KHELIFA.F, BENLABED.K**, Mai 2015. Etat des lieux : Les entérocoques résistants à la vancomycine au CHU de Constantine. Communication affichée. VI^{ème} Journée de la SAMIC.

-A-

- **ANDRE.M-H, LORTHOLARY.O, BRYSKIER.A**, 1998. Classification des antibiotiques : relation structure-activité. EMC : AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine, édition : Elsevier, 5-0015, p : 1-6.
- **AVRIL.J-L, DABERNAT.H, DENIS.F, MONTEIL.H**, 1992. Bactériologie Clinique, 2^{ème} édition : Ellipse, p : 31-52.

-B-

- **BARRAUD.O, PESTOURIE.N**, 2011 Chapitre 11 – Rôle du laboratoire dans le dépistage des porteurs de germes à potentiel infectieux ou multirésistants (staphylocoques, salmonelles, Clostridium difficile, BMR, ERV, etc.). Bactériologie médicale, 2^{ème} Edition : Elsevier, p : 117-127.
- **BENSLIMANI.A, BELOUNI.R, SEGHER.M, RAMDANI BOUGUessa.A**, 2011. Manuel de microbiologie ; 3^{ème} édition : OPU, p : 91-134.
- **BERCHE.P, GAILLARD.J-L, SIMONNET.M**. 1988 - Bactériologie: Bactéries des infections humaines. Chapitre 32, édition : Flammarion-Sciences, p:297-303.

-C-

- **CORRIEU.G, LUQUET.F-M**, 2008. Bactéries lactiques de la génétiques aux ferments, Edition : Lavoisier; p : 76.

-F-

- **FAUCHERE.J-L, AVRIL.J-L**, 2002. Bactériologie médicale et générale, 2^{ème} édition : Ellipses, p : 141-158.
- **FRENEY.J, RENAUD.F, LECLERCQ.R, RIEGEL.L**, 2007. Précis de Bactériologie Clinique, édition : ESKA, Paris, p : 845-897.

-G-

- **GAZANGEL.J-M**, 2013. Le préparateur en pharmacie : pharmacologie, édition : OPU, p : 19-28.

-L-

- **LEBLANC.D**, 2006. Prokaryotes, 3^{ème} édition: Springer, p: 175-204.
- **LEMINOR.L, VERON.M**, 1989. Bactériologie Médicale, 2^{ème} édition : Flammarion, Paris, p : 273-352, 810-830.

-N-

- **NAUCIEL.C, VILDE.J-L**, 2007. Bactériologie médicale, 2^{ème} édition : Masson, p 45-63, 88-89.
- **NAGARAJAN.R, YAO.R-C, CRANDALL.L-W**. 1994. Glycopeptide antibiotics. Classification, occurrence, and discovery. Edition: Dekker, New York, P: 1–27.

-P-

- **PRESCOTT.L-M, HARLEY.J-P, KLEIN.D-A**, 2011. Microbiologie, 2^{ème} édition: De Boeck, p : 805-820.

-R-

- **RABAUD.C, MAY.T**, 2000. Glycopeptides. EMC : maladies infectieuses, 8-004-L-10, édition : Elsevier, paris ; p : 1-7.
- **ROUVEIX.B**, 1990. Médicaments en pathologie infectieuse, édition : Masson, p : 42-43.
- **RAHAL.K, BENSLIMANI.A, TALI-MAAMAR.H, MISSOUM.M-F, ABOUN.A, AMMARI.H**, 2014. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 7^{ème} édition, p : 56-58.

-S-

- **SCHAECHTER.M, MEDOFF.G, EISENSTEIN.B-I**, 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. 2^{ème} édition : De Boeck, p : 77-88.
- **SCHORDERT.M**, 1989. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, édition : Slatkine. Genève, p : 655.661.675.691.

-A-

- http://www.medecine.upstlse.fr/DCEM2/module1/sous_module1/011_depistage_CA_SA.pdf
ARNAUD.C, 2006. Evaluation des procédures de dépistage. Deuxième Cycle des Etudes Médicales - Faculté de Médecine de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil

-C-

- http://www.cclin-est.org/UserFiles/File/brochure_prise_en_charge-ERG.pdf
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DE L'EST (C-CLIN EST), décembre 2008. Prise en charge d'une épidémie à ERG (Entérocoque Résistant aux Glycopeptides)
- http://www.cclinparisnord.org/ACTU_DIVERS/actualite.html
CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES (C-CLIN), 2011
- http://www.antibiolor.org/?page_id=1431
COMMISSION SPECIALISEE DES ANTI-INFECTIEUX (CSAI), novembre 2007. Prescription des antibiotiques en situation d'épidémie d'ERV
- https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1555_MesuresPrevContEnteroResisVancomMilieuxSoinsQc.pdf
COMITE SUR LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DU QUEBEC (CINQ), septembre 2012. Mesures de prévention et contrôle de l'entérocoque résistant à la vancomycine dans les milieux de soins aigus du Québec. Institut national de santé publique du Québec.

-E-

- <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Ne>
EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS), 2004, 2006, 2010, 2013,2014.
- http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance
EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC), 2014. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. P: 65-70

-H-

- http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2581332/fr/sivextro-tedizolide-antibiotique-de-la-classe-des-oxazolidones
HAUTE AUTORITE DE SANTE , novembre 2015. Orbactiv (oritavancine), antibiotique de la classe des glycopeptides.
- http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2581332/fr/sivextro-tedizolide-antibiotique-de-la-classe-des-oxazolidones
HAUTE AUTORITE DE SANTE , novembre 2015. Sivextro (tédizolide), antibiotique de la classe des oxazolidones.
- http://www.hcsp.fr/explore.cgi/hcspr20101116_bmrimport.pdf
HAUT CONSEIL DE LA SANTE PUBLIQUE(HCSP), novembre 2010. Maîtrise de la diffusion des bactéries commensales multirésistantes aux antibiotiques importées

en France lors de la prise en charge de patients rapatriés ou ayant des antécédents d'hospitalisation à l'étranger.

-I-

- <http://www.cclinparisnord.org/CLIN/JourCLIN2014/Vaux.pdf>
INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE (InVS), 2014. Bactéries hautement résistantes et émergentes (BHRe) état des lieux dans le monde et en France.

-J-

- http://www.nosopicard.com/iso_album/diapos_joseph.pdf
JOSEPH.C, octobre 2015. Antibiothérapie des infections à cocci gram + résistants. CHU d'Amiens

-M-

- **MAJDOUB.A**, mars 2015. Les nouveaux antibiotiques. Anesthésie et réanimation, Mahdia ; Tunisie.

-P-

- <http://canadienssante.gc.ca/publications/drugs-products-medicaments-produits/antibiotic-resistance-antibiotique/antimicrobial-surveillance-antimicrobioresistance-fra.php>
PROGRAMME CANADIEN DE SURVEILLANCE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES (PCSIN), 2006. Surveillance des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) chez les patients hospitalisés dans des hôpitaux canadiens de soins de courte durée participant au PCSIN – Résultats pour l'année 2006.

-R-

- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES (AARN), 2009. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 10^{ème} rapport d'évaluation (septembre 2007 à décembre 2008).
- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES (AARN), 2010. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 11^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2009).
- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES (AARN), 2011. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 12^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2010).
- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES (AARN), 2012. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 13^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2011).
- <http://www.sante.dz/aarn>
RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES (AARN), 2015. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 14^{ème} rapport d'évaluation (2012-2013).

- <http://www.sante.dz/aarn>
- **RESEAU ALGERIEN DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES (AARN)**, 2016. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 15^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2014).

-U-

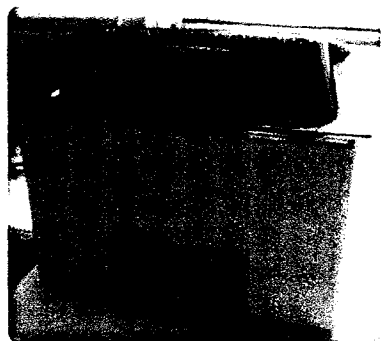
- <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2013."Antibiotic resistance threats in the United States, 2013." Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

-V-

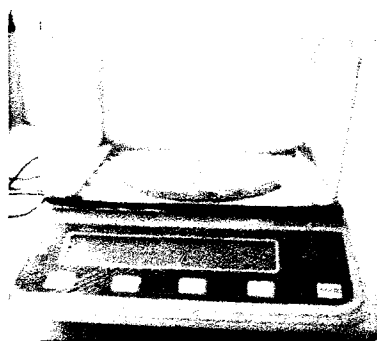
- <https://www.vidal.fr/fiches-medicaments>
VIDAL : Fiches des médicaments, 2013

ANNEXE I : Appareillage	I
ANNEXE II : Matériel non biologique	II
ANNEXE III : Milieux de culture, colorants et réactifs d'identification.....	III
ANNEXE IV : Préparation des milieux.....	VI
ANNEXE V : Galerie API 20 Strep	VII
ANNEXE VI : Recherche de la résistance aux antibiotiques.....	X
ANNEXE VII : Les prélèvements effectués au niveau de la chambre.....	XV

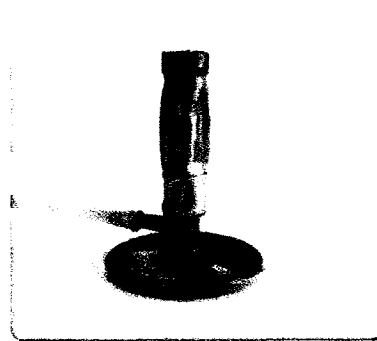
ANNEXE I : APPAREILLAGE



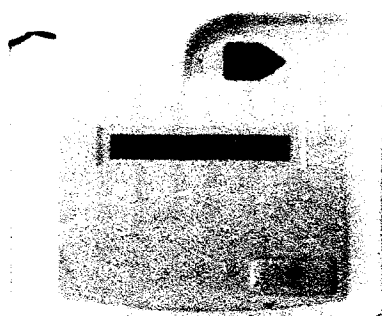
Bain-marie



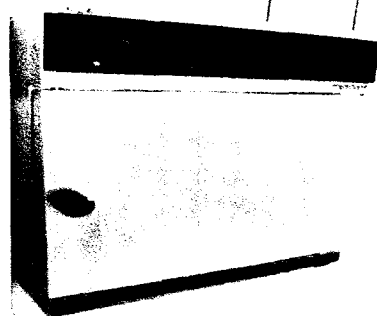
Balance



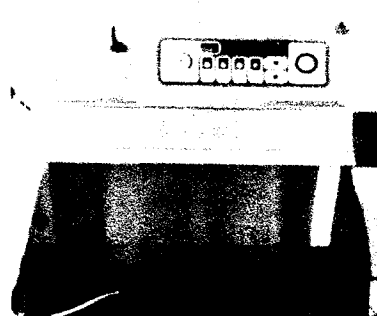
Bec bunsen



Densitomètre



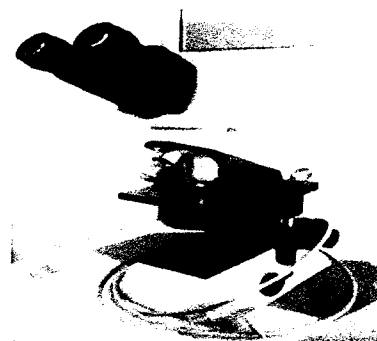
Etuve à 35-37°C



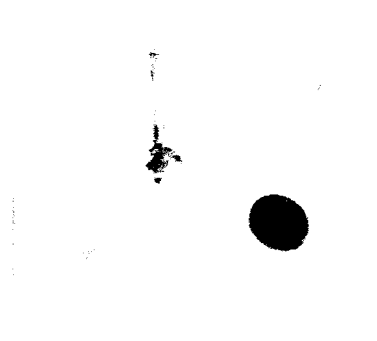
Hotte



Levier et eau courante



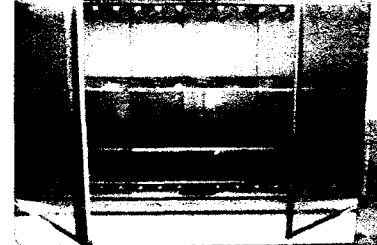
Microscope optique



Pailasse



Réfrigérateur



Séchoir



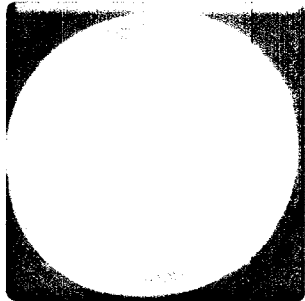
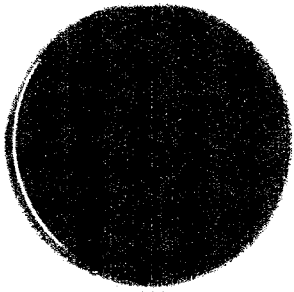
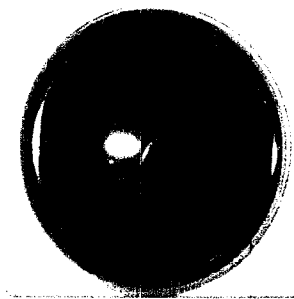
Ordinateur

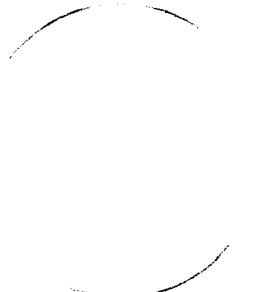


ANNEXE II : MATERIEL NON BIOLOGIQUE

Fournitures	
- Anse de platine	- Huile de vaseline stérile
- Blouse de laboratoire	- Liquide désinfectant
- Bocal	- Marqueurs
- Bougie	- Micropipette
- Briquet	- Pied à coulisse métallique
- Distributeur des disques d'antibiotiques	- Pincés
- Eau physiologique stérile	- Poires
- Ecouillons secs stériles	- Portoirs pour tube
- Gants	- Seringues stériles
- Huile à l'immersion	- Solution hydro-alcoolique

Verrerie
- Boite de Pétri (90mm de diamètre) en plastique
- Lames et lamelles
- Tubes à essai stériles
- Tubes secs
- Pipettes Pasteur stériles

**ANNEXE III : MILIEUX DE CULTURE, COLORANTS ET REACTIFS
D'IDENTIFICATION**
MILIEUX DE CULTURE :

Milieu	Composition	Utilisation
Gélose nutritive 	- Extrait de viande.....1 g - Extrait de levure.....2,5 g - Peptone5 g - Chlorure de sodium5 g - Agar.....15 g <p style="text-align: center;">pH = 7,0</p>	<p style="text-align: center;">Milieu d'isolement des germes non exigeants</p>
Gélose au sang frais 	- Mélange spécial de peptones.....23 g - Amidon.....1 g - NaCl.....5 g - Agar.....10 g - Sang de mouton.....50 ml <p style="text-align: center;">pH = 7,3</p>	<p style="text-align: center;">Milieu d'isolement des streptocoques</p>
Gélose au sang cuit 	- Peptone tryptique de caséine....7,5 g - Peptone pepsique de viande.....7,5 g - Amidon de maïs.....1 g - Hydrogénophosphate de potassium.4 g - Dihydrogénophosphate de potassium 1g - NaCl.....5 g - Hémoglobine.....10 g - Agar.....15 g <p style="text-align: center;">pH = 7,2</p>	<p style="text-align: center;">Milieu d'isolement des germes exigeants</p>

<p>Gélose Muller-Hinton</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Infusion de viande de bœuf.....300 g - Peptone de caséine.....17.5 g - Amidon de maïs.....1.5 g - Agar.....17 g <p style="text-align: center;">PH=7,4</p>	<p style="text-align: center;">Milieu pour antibiogramme</p>
<p>Gélose Chapman</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone10 g - Extrait de viande de bœuf1 g - Chlorure de sodium.....75 g - Mannitol10 g - Rouge de phénol.....0,025 g - Agar-Agar15 g <p style="text-align: center;">pH = 7,4</p>	<p style="text-align: center;">Milieu sélectif de staphylocoque</p>
<p>Gélose de conservation</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone10 g - Extrait de viande5 g - Chlorure de sodium5 g - Agar.....10 g <p style="text-align: center;">pH = 7,3</p>	<p style="text-align: center;">Milieu de conservation de bactéries de culture facile</p>
<p>BHIB (bouillon cœur cervelle)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Protéose-peptone.....10 g - Infusion de cervelle de veau12,5 g - Infusion de cœur de bœuf5 g - Glucose.....2 g - Chlorure de sodium5 g - Hydrogénophosphate de sodium.2,5 g <p style="text-align: center;">pH = 7,4</p>	<p style="text-align: center;">Milieu d'enrichissement</p>

COLORANTS :

- Violet de gentiane
- Lugol
- Fuschine
- Alcool éthylique à 95°C

REACTIFS D'IDENTIFICATION :

Réactif	Composition	Utilisation
NIN	-Ninhydrine -2-méthoxyéthanol	- Mise en évidence de l'hydrolyse d'acide hippurique.
VP I	-Naphtol.....60g -Ethanol.....1 cm ³	- Recherche d'acétoïne
VP II	-Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 4 ml.cm ³ (10%)	- Reherche d'acétoïne
ZYM A	-Tristis hydroxy-méthyl- amino-méthane -Lauryl sulfate -HCl	/
ZYM B	-Fast blue BB -2-méthoxy-éthanol	/

ANNEXE IV : PREPARATION DES MILIEUX**✦ Gélose nutritive additionnée de 6,5% NaCl**

- Peser 3,8 g de poudre titrée de gélose nutritive. Diluer dans 100ml d'eau distillée ;
- Ajouter à cette solution 6,5 g de poudre de NaCl pour obtenir une concentration de 6,5% NaCl, bien homogénéiser ;
- Verser en boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm soit 20 ml ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

✦ Milieu tellurite de potassium

- La gélose nutritive est liquéfiée par ébullition puis maintenue à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.
- Verser une ampoule de tellurite de potassium dans un flacon de 180 ml de gélose nutritive, bien homogénéiser ;
- Verser ce mélange en boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm soit 20 ml ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

✦ Gélose Mueller-Hinton additionnée d'imipénème

- Peser 4 mg de poudre titrée d'imipénème. Diluer dans 10 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 0,4 mg/ml (solution-mère) ;
- A l'aide d'une seringue prélever 1 ml de la solution mère et la diluer dans 9ml d'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 4 µg/ml ;
- Répartir 2 ml de la solution finale, dans les boîtes de Pétri ;
- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

✦ Gélose Mueller-Hinton additionnée de vancomycine

- Peser 8 mg de poudre titrée de vancomycine. Diluer dans 10 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 0,8 mg/ml (solution-mère) ;
- A l'aide d'une seringue prélever 1 ml de la solution mère et la diluer dans 9ml d'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 8 µg/ml ;
- Répartir 2 ml de la solution finale, dans les boîtes de Pétri ;
- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires ;
- Laisser refroidir ;
- Sécher avant l'emploi.

ANNEXE V : GALERIE API 20 STREP

La galerie API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Principe :

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

Mode opératoire :

Préparation de l'inoculum :

Ouvrir une ampoule d'API suspension medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau distillée sans additif. A l'aide d'une pipette pasteur, prélever des colonies parfaitement isolées de la culture préalablement préparée. Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de MacFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation de la galerie :

- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le côté de la cupule) :

Pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule.

Pour le test ADH : remplir uniquement le tube.

- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :

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

Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.

- Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.

- Refermer la boîte d'incubation.

- Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

Lecture de la galerie :

Après 4 heures d'incubation :

Ajouter les réactifs :

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

- Test HIP : 2 gouttes de NIN.

- Tests PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B.

Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture.

Tableau de lecture de la galerie API 20 strep :

TEST	REACTION/ ENZYME	REACTIFS	REACTION	
			POSITIVE	NEGATIVE
VP	production d'acétoïne (voges proskauer)	VP I + VP II	incolore	rose-rouge
HIP	hydrolyse (acide hippurique)	NIN	incolore/bleu pâle gris-bleuté	bleu foncé/violet
ESC	hydrolyse β - glucosidase (esculine)	/	incolore jaune pâle gris clair	Noir
PYR A	pyrrolidonyl arylamidase	ZYM A+ ZYM B	incolore ou orange très pâle	Orange
α GAL	α -galactosidase	ZYM A+ ZYM B	incolore	Violet
β GUR	β -glucuronidase	ZYM A+ ZYM B	incolore	Bleu
β GAL	β -galactosidase	ZYM A+ ZYM B	incolore ou violet très pâle	Violet
PAL	phosphatase alcaline	ZYM A+ ZYM B	incolore ou violet très pâle	Violet
LAP	leucine aminopeptidase	ZYM A+ ZYM B	incolore	Orange
<u>ADH</u>	arginine dihydrolase	/	jaune	Rouge
<u>RIB</u>	acidification (ribose)	/	rouge/orange	Jaune
<u>ARA</u>	acidification (arabinose)	/		
<u>MAN</u>	acidification (mannitol)	/		
<u>SOR</u>	acidification (sorbitol)	/		
<u>LAC</u>	acidification (lactose)	/		
<u>TRE</u>	acidification (trehalose)	/		
<u>INU</u>	acidification (inuline)	/		
<u>RAF</u>	acidification (raffinose)	/		
<u>AMD</u>	acidification (amidon)	/		
<u>GLYG</u>	acidification (glycogène)	/		
β HEM	Hémolyse	/	Hémolyse	Pas d'hémolyse

Une ré-incubation est nécessaire dans les cas suivants :

- Faible discrimination ;
- Profil inacceptable ou profil douteux ;

Si, pour le profil obtenu, la note suivante est indiquée : identification non valide avant 24 h d'incubation, Alors relire après 24 heures les réactions ESC, ADH et RIB à GLYG sans relire les réactions enzymatiques (HIP, PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP) et VP.

Noter toutes les réactions sur la fiche de résultats.

Interprétation :

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données (V7.0)

- * à l'aide du Catalogue Analytique :
- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
- * à l'aide du logiciel d'identification apiweb TM :
- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres

ANNEXE VI : RECHERCHE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Fiche technique 1 : Antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- À la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ;
- À l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

Mode opératoire :

Préparation de la gélose :

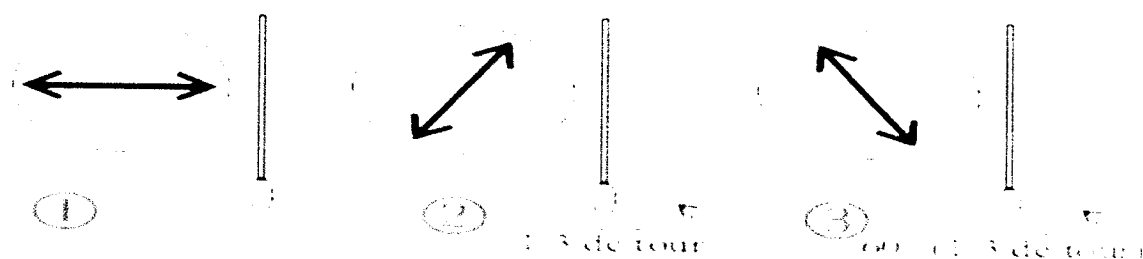
- La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été versée en boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm
- Sécher avant l'emploi.

Préparation et ajustement de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, prélever à l'aide d'un écouvillon sec stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques
- Bien décharger l'écouvillon 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 MF ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

Ensemencement : (Technique par écouvillonnage)

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum ;
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées ;
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 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.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.



Technique d'ensemencement (Antibiogramme standard) (R.MOREDA 2010)

Application des disques d'antibiotiques :

Les disques d'antibiotique à tester sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu et ne

pas déplacer les disques après application. (Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 antibiotiques sur une boîte de 90mm).

- Les disques d'antibiotique doivent être espacés de 24mm, centre à centre.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories " sensible, intermédiaire ou résistante".

Valeurs des diamètres critiques des antibiotiques à tester pour *Enterococcus spp* (K.RAHAL et al 2014)

Antibiotiques	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		
		Résistante (R) ≤	Intermédiaire	Sensible (S) ≥
Ampicilline	10µg	16	–	17
Tétracycline	30µg	14	15 – 18	19
Vancomycine	30µg	14	15 – 16	17
Teicoplanine	30µg	10	11 – 13	14
Gentamicine Haut niveau	120µg	6	7 – 9	10
Streptomycine Haut niveau	300µg	6	7 – 9	10
Ciprofloxacine	5µg	15	16 – 20	21
Lévofloxacine	5µg	13	14 – 16	17
Erythromycine	15µg	13	14 – 22	23
Furanes	300µg	14	15 – 16	17
Rifampicine	5µg	16	17 – 19	20
Fosfomycine	200µg	12	13 – 15	16
Quinupristine-Dalfopristine	15µg	15	16 – 18	19
Chloramphénicol	30µg	12	13 – 17	18

Fiche technique 2 : Détermination de la CMI, technique de dilution en gélose de la vancomycine**Mode opératoire :**Préparation de la gélose :

- Le milieu Mueller-Hinton en gélose est liquéfié par ébullition puis maintenu à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.

Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique :

- Peser 51,20 mg de poudre titrée de vancomycine. Diluer dans 10ml d'eau distillée pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère)

- Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans l'eau distillée, jusqu'à la concentration finale de 1,25 µg/ml

- Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette

- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires.

La dilution obtenue (1/10^{ème}) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées

- Préparer une boîte témoin sans vancomycine en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile

- Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn

Préparation de l'inoculum bactérien :

- Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à 1-2.108 CFU/ml en moyenne

- Diluer l'inoculum au 1/10^{ème} en eau physiologique

Dépôt des spots bactériens :

- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 2µl par spots de 5 à 8 mm

- Déposer les spots dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum

- Pour chaque boîte ensemercer un témoin positif et un témoin négatif

- Marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot

- Commencer par la boîte témoin, puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Terminer en appliquant les spots sur une 2^{ème} boîte témoin

- Etaler une goutte de chaque souche testée, sur une gélose non sélective et incuber une nuit (détection des cultures mixtes, obtention d'une culture jeune).

Incubation :

- Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn)

- Renverser les boîtes et incuber à 35°C ± 2 pendant 16-20 heures

Lecture des CMI :

- Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive

- Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible)

- Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film

- Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classifier la bactérie dans l'une des catégories " sensible, intermédiaire ou résistante"

Schéma pour la préparation des dilutions d'antibiotique (K.RAHAL et al 2014)

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale dans la gélose (µg/ml)
Solution mère	5120	/	/	5120	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0,125

Fiche technique 3 : Détermination de la CMI, technique de l'E-Test

C'est une technique de détermination de la CMI, validée pour les bactéries non exigeantes et pour un certain nombre de bactéries exigeantes.

Mode opératoire :Préparation de la gélose :

- Le milieu Mueller-Hinton en gélose doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm
- Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

Préparation de l'inoculum :

Même méthode que pour l'antibiogramme standard.

Ensemencement :

Même méthode que pour l'antibiogramme standard.

Dépôt de la bandelette E-test :

- Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen, le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E.
- Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondante aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.
- A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte de 90 mm (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).
- Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus.
- Incuber à 35-37°C pendant 18-24h.

Lecture et interprétation :

- La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.
- Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories " sensible, intermédiaire ou résistante"

Concentrations critiques et souches témoins (K.RAHAL et al 2014)

Antibiotiques	Concentrations critiques ($\mu\text{g/ml}$)			Souches témoins	
	Sensible	Intermédiaire	Résistant	T(-) Sensible	T(+) résistante
Vancomycine	≤ 4	8 – 16	≥ 32	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 25922
Teicoplanine	≤ 8	16	≥ 32	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 25922

ANNEXE VII : LES PRELEVEMENTS EFFECTUES AU NIVEAU DE LA CHAMBRE

1	- Le lit + couverture
2	- Potence
3	- Table
4	- Lit (bords + partie inferieure)
5	- Murs
6	- Porte de la chambre + poignet
7	- Porte des sanitaires
8	- Robinet
9	- Siphon