

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Epidémiologie appliquée à la santé animale

ENQUETE SUR LES ENTEROCOQUES (*E.FAECIUM* ET
E.FAECALIS) ETL'ETUDE DE LEUR RESISTANCE AUX
ANTIBIOTIQUES DANS LA REGION DE TIZI OUZOU

Par

Safia YOUSFI

Devant le jury composé de :

A. YAHIA	MCA, U. de Blida	Président
N. A. KHELIFI	MCA, U. de Blida	Examinatrice
A. DEBIB	MCA, C. U. de Tipaza	Examinatrice
D. BAROUDI	MCA, ENSV d'Alger	Examinateur
C.R. MESSAI	MCA, ENSV d'Alger	Examinateur
N. HAMMAMI	MCA, U. de Blida	Directrice de thèse
M. BACHIR PACHA	Professeur, U. de Blida	Invité

Blida, Décembre 2020

ملخص

المكورات المعوية هي جزء من الكائنات الحية المعوية الطبيعية للحيوانات والبشر. أظهرت العديد من الدراسات أن المكورات المعوية ذات الأصل الحيواني يمكن أن تمثل خزانًا من جينات مقاومة المضادات الحيوية للمجتمع البشري والحيواني.

كانت أهداف هذه الدراسة هي جمع المعلومات المتعلقة باستخدام المضادات الحيوية في تربية الدواجن ، بالنظر إلى أن الإفراط في استخدام المضادات الحيوية هو عامل الخطر الرئيسي لتطوير مقاومة المضادات الحيوية. ثم ، في الخطوة الثانية ، قمنا بتقييم النقل الهضمي لسلاسل المكورات المعوية المختلفة في الدواجن ودراسة مقاومتها للعائلات المختلفة من المضادات الحيوية. أظهر الاستبيان الذي أجري على 134 ممارسًا بيطريًا أن الفشل العلاجي قد واجه في ما يقارب 90% من الحالات وأن التشخيص المخبري يتم غالبًا بعد الفشل العلاجي.

أظهرت دراسة النقل الهضمي لأنواع المكورات المعوية في الدواجن هيمنة نوعين هما

E.faecium و *E.faecalis*.

تم اختبار مجموعه 278 سلالة من المكورات المعوية المعزولة من الدواجن من أجل الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة نشر على الآجار. تم اختبار عشرة مضادات حيوية. لوحظت نسب عالية من مقاومة التتراسيكلين والإريثروميسين (% 90.65 و % 69.06 على التوالي) ، مستويات منخفضة من المقاومة للبنسلين والسيبروفلوكساسين والنيتروفورانتوين والكلورامفينيكول بمستويات % 07.91 و % 04.68 و % 03.60 و % 01.08 على التوالي. تم تسجيل مقاومة للتركيزات العالية من الأمينوغليكوزيدات (ستربتوميسين % 17.99 و جنتاميسين % 04.32). ومع ذلك، كانت جميع السلالات حساسة لفانكوميسين وأمبيسيلين.

الكلمات المفتاحية: المكورات المعوية *Enterococcus faecalis* ، المكورات المعوية *Enterococcus faecium* ، مقاومة المضادات الحيوية ، الدواجن.

RESUME

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

Les objectifs de la présente étude ont été de récolter des informations concernant l'utilisation des antibiotiques en élevage avicole, étant donné que l'utilisation abusive des antibiotiques est le facteur de risque majeur d'apparition des antibiorésistances. Puis dans un second temps, évaluer le portage digestif des différentes souches d'entérocoques chez la volaille et l'étude de leurs résistances aux différentes familles d'antibiotiques.

L'enquête par questionnaire auprès de 134 vétérinaires praticiens a montré que les échecs thérapeutiques sont rencontrés dans près de 90 % des cas et que le recours au diagnostic de laboratoire se fait le plus souvent après échecs thérapeutiques.

L'étude du portage digestif des espèces d'entérocoques chez la volaille a montré la prédominance de deux espèces à savoir l'*E.faecalis* et l'*E.faecium*.

Au total, 278 souches d'entérocoques isolées de la volaille ont été testées pour leurs susceptibilités aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur gélose. Un panel de dix antibiotiques a été testé.

De hauts pourcentages de résistance à la Tétracycline et à l'Erythromycine ont été observés (90.65% et 69.06% respectivement), des bas niveaux de résistances aux Pénicillines, Ciprofloxacine, Nitrofurantoïnes et Chloramphénicol avec des taux de 07.91%, 04.68%, 03.60% et 01.08% respectivement. Des résistances à des concentrations élevées aux Aminoglycosides ont été enregistrées (Streptomycine à 17.99% et Gentamycine à 04.32%). Cependant, toutes les souches ont été sensibles à la Vancomycine et à l'Ampicilline.

Mots-clés : *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Résistance aux antibiotiques, Volaille.

ABSTRACT

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

The objectives of the present study were to gather information on the use of antibiotics in poultry farming, as overuse of antibiotics is the major risk factor for the development of antibiotic resistance. Then, in a second step, to evaluate the digestive carriage of the different strains of enterococci in poultry and to study their resistance to the different families of antibiotics.

The questionnaire survey of 134 practicing veterinarians showed that therapeutic failures are encountered in nearly 90% of cases and that laboratory diagnosis is most often used after therapeutic failures.

The study of the digestive carriage of *Enterococcus* species in poultry showed the predominance of two species, namely *E.faecalis* and *E.faecium*. A total of 278 strains of enterococci isolated from poultry were tested for antibiotic susceptibility using the agar diffusion method. A panel of ten antibiotics was tested.

High percentages of resistance to Tetracycline and Erythromycin were observed (90.65% and 69.06% respectively), low levels of resistance to Penicillin, Ciprofloxacin, Nitrofurantoin and Chloramphenicol with levels of 07.91%, 04.68%, 03.60% and 01.08% respectively. Resistance to high concentrations of Aminoglycosides has been recorded (Streptomycin 17.99% and Gentamycin 04.32%). However, all strains were susceptible to Vancomycin and Ampicillin.

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

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur BACHIR PACHA Mohammed de m'avoir accueillie dans le Module de Pathologies Aviaires et d'avoir accepté d'encadrer cette thèse, avant de s'en décharger pour son indisponibilité.

Je voudrais par la suite remercier généreusement Le Dr HAMMAMI Nabila, qui a accepté de diriger ce travail de recherche. Elle a été pour moi plus qu'une directrice de thèse, soit une amie, une sœur.

Je suis également reconnaissante auprès du Dr MSELA Amine pour m'avoir initiée à la Microbiologie, et également pour l'analyse statistique et les informations qu'il a pu me fournir concernant les antibiotiques utilisés en production aviaire. Je le remercie également pour ses conseils et ses encouragements.

J'exprime également tous mes remerciements aux membres de jury : Dr YAHIA Achour en sa qualité de président, Dr DEBIB Aicha, Dr KHELIFI Nadjet Amina, Dr BAROUDI Djamal et Dr MESSAI Chafik Redha qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Un remerciement spécial aussi au Professeur KEBBOUR Djamila, Directrice de notre Institut des Sciences Vétérinaires, pour sa disponibilité et son soutien.

Je tiens à remercier tous les vétérinaires qui ont participé à l'enquête et le personnel des abattoirs qui m'ont facilité l'accès et la réalisation des prélèvements.

Je remercie toutes les personnes qui ont apporté leur contribution à ce travail et en particulier les Docteurs MAGHRICI Aghilas, SADI Madjid et ADDI Ahcene.

Je remercie toute ma famille, sans qui je n'aurais pas pu effectuer ma thèse dans de si bonnes conditions. Je remercie particulièrement ma Mère et mon Père, je ne vous dirai jamais assez Merci d'avoir été là pour moi. Votre Amour et votre Soutien sont indéfectibles.

Last but not least, je remercie mon conjoint et mes deux choux pour leur présence à mes côtés, vous avez dû subir pendant des années mon stress et ma mauvaise humeur, je vous aime tellement.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ILLUSTRATIONS	4
LISTE DES TABLEAUX	6
INTRODUCTION	7
1. GENRE <i>ENTEROCOCCUS</i>	
1.1. Taxonomie	9
1.2. Caractères culturaux et biochimiques	11
1.3. Niches écologiques	12
1.3.1. Chez l'homme	12
1.3.2. Chez la volaille	13
1.4. Pouvoir pathogène des entérocoques et les signes cliniques associés	15
1.4.1. Chez l'homme	15
1.4.2. Chez les animaux	16
1.4.2.1. Volaille	16
1.4.2.2. Autres	16
1.5. Facteurs de virulence	17
1.5.1. Facteurs liés à la membrane	17
1.5.2. Facteurs sécrétés	17
2. ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE	
2.1. Antibiotiques	20
2.1.1. Définitions	20
2.1.2. Antibiotiques utilisés en production aviaire	24
2.2. Résistance aux antibiotiques	25
2.2.1. Résistance naturelle	26
2.2.2. Résistance acquise	26

2.2.2.1. Mutation, transformation, transduction et Conjugaison	27
2.2.2.2. Persistance de la résistance dans l'environnement	27
2.2.3. Éléments génétiques mobiles	29
2.2.3.1. Plasmides	29
2.2.3.2. Transposons	30
2.2.3.3. Intégrons	32
2.2.3.4. Îlots génomiques	33
2.2.4. Types de mécanismes de résistance	35
2.3. Microorganismes indicateurs de résistance aux antibiotiques	40
2.3.1. Méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques	40
2.3.2. Méthodes génotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques	41
3. ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES ENTEROCOQUES	
3.1. Résistance intrinsèque	44
3.2. Résistance acquise	47
3.2.1. Résistance acquise d' <i>E.faecalis</i> d'origine aviaire	51
3.2.2. Résistance acquise d' <i>E.faecium</i> d'origine aviaire	53
4. ETUDE EXPERIMENTALE	
4.1. Problématique	54
4.2. Objectif	54
4.3. Partie enquête par questionnaire	55
4.3.1. Matériel et méthodes	56
4.3.2. Résultats et discussion	60
4.3.3. Conclusion	72
4.4. Partie isolement bactériologique	73
4.4.1. Matériel et méthodes	73
4.4.2. Résultats	83
4.4.3. Discussion	92
4.4.4. Conclusion	98

CONCLUSION	99
APPENDICE	
A. Liste des abréviations	100
B. Questionnaire auprès des vétérinaires	101
C. Résultats des questionnaires auprès des vétérinaires	103
D. Composition des milieux de culture et produits chimiques	104
E. Table de lecture galerie biochimique	107
F. Table de lecture antibiogramme	108
G. Article I	109
H. Article II	116
REFERENCES	124

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1	Arbre phylogénique du genre <i>Enterococcus</i> reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S	10
Figure 2.1	Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques	27
Figure 2.2	Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négatif	35
Figure 3.1	Evolution de l'antibiorésistance chez les entérocoques au cours des 40 dernières années	47
Figure 3.2	Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre <i>Enterococcus</i>	51
Figure 4.1	Représentation schématique de la démarche générale de préparation d'un questionnaire	57
Figure 4.2	L'importance de l'activité avicole chez les vétérinaires praticiens questionnés	61
Figure 4.3	Type de spéculation suivie par les vétérinaires praticiens questionnés	62
Figure 4.4	Circonstance d'utilisation des antibiotiques	63
Figure 4.5	Les différentes causes d'arrêt d'utilisation des ATB	64
Figure 4.6	La conduite tenue par les vétérinaires praticiens questionnés en cas de persistance des symptômes	65
Figure 4.7	Le recours au diagnostic de laboratoire	66
Figure 4.8	Efficacité de l'antibiogramme	67
Figure 4.9	Conduite à tenir en cas de l'inefficacité de l'antibiogramme	67
Figure 4.10	Les antibiotiques prescrits lors d'affections respiratoires	68
Figure 4.11	Les antibiotiques prescrits lors d'affections digestives	69
Figure 4.12	La fréquence d'échecs thérapeutiques rencontrés	70
Figure 4.13	Les causes des échecs thérapeutiques	71
Figure 4.14	Préparation de la gélose Columbia additionnée de sang de mouton frais à 5%	76
Figure 4.15	Système d'identification : api [®] 20 Strep	78
Figure 4.16	Inoculation de la Galerie api [®] 20 Strep	79

Figure 4.17	Fiche de résultat de la galerie api® 20 Strep	79
Figure 4.18	Antibiogramme d'une souche d'entérocoque sur milieu gélosé	81
Figure 4.19	Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu sélectif BEA	83
Figure 4.20	Aspect des colonies d'entérocoques sur le milieu CHROMagar Orientation	84
Figure 4.21	Aspect des entérocoques sous un microscope optique après Coloration de Gram « Gram positif » (Grossissement X1000)	84
Figure 4.22	Résultat du Test de Catalase	85
Figure 4.23	Résultat test hémolyse γ	85
Figure 4.24	Résultat test hémolyse α	85
Figure 4.25	Résultat test hémolyse β	85
Figure 4.26	Réduction de la Tellurite de Potassium par l'espèce <i>E. faecalis</i>	86
Figure 4.27	Galerie api® 20 Strep après 24 heures d'incubation	86
Figure 4.28	Fréquence du portage digestif des entérocoques chez la volaille.	87
Figure 4.29	Antibiogramme d'une souche d'entérocoque après 18 heures d'incubation à 35°C	87
Figure 4.30	Représentation graphique des pourcentages de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques isolées chez la volaille.	88
Figure 4.31	Comparaison de l'antibiorésistance observée chez <i>E. faecalis</i> (n=176) et <i>E. faecium</i> (n=92).	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Pourcentage des espèces <i>Enterococcus</i> retrouvées chez la volaille	14
Tableau 1.2	Facteurs de virulence chez <i>E.faecalis</i>	19
Tableau 2.1	Principaux mode d'action des grandes familles d'antibactériens	21
Tableau 2.2	Types d'utilisation des substances antimicrobiennes chez le bétail	23
Tableau 2.3	Liste des antibiotiques utilisés en production aviaire	24
Tableau 2.4	Caractéristiques de différents éléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes de résistance	34
Tableau 2.5	Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques	39
Tableau 3.1	Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques	46
Tableau 3.2	Les phénotypes de résistance aux glycopeptides	50
Tableau 3.3	Résistance observée chez les <i>E.faecalis</i> de la volaille	52
Tableau 3.4	Résistance observée chez les <i>E.faecium</i> de la volaille	53
Tableau 4.1	Tableau récapitulatif des différentes étapes d'élaboration de notre questionnaire	58
Tableau 4.2	Liste des antibiotiques testés	80
Tableau 4.3	Distribution des souches d'entérocoques isolées selon le type de spéculation	86
Tableau 4.4	Pourcentages (%) de résistance aux antibiotiques des souches d'Entérocoques isolées chez la volaille	89
Tableau 4.5	Souches d'entérocoques présentant une multirésistance aux antibiotiques	91
Tableau 4.6	Profil phénotypique de la multirésistance observée chez <i>E.faecalis</i> et <i>E.faecium</i>	92

INTRODUCTION

L'antibiorésistance est un problème mondial tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. La présence de microorganismes résistants aux antibiotiques dans les matières fécales d'animaux suscite de vives inquiétudes, car ces microorganismes pourraient être transmis à l'homme via la chaîne alimentaire contaminée [1]. Parmi ces micro-organismes, les entérocoques qui font partie de la flore commensale du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux [2], et qui ne sont pas connus pour être particulièrement pathogènes. Cependant, leur rôle dans les infections opportunistes et nosocomiales a considérablement augmenté ces dernières années. Les deux principales espèces responsables d'infections chez l'homme sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

Le choix de ce modèle d'étude est conforté par le fait qu'actuellement, la prévention des maladies nosocomiales et la résistance aux antibiotiques deviennent des problèmes majeurs de santé publique.

Aujourd'hui trois éléments conduisent à un regain d'intérêt pour les entérocoques, à savoir l'augmentation croissante de leur isolement au cours d'infections diverses, l'importance de la place qu'ils occupent en pathologie nosocomiale et l'émergence et l'accumulation de mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Outre leur résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques, y compris la résistance aux Céphalosporines, à la Clindamycine, aux Aminoglycosides et autres Bêtalactamines, les entérocoques ont la capacité d'acquérir d'autres résistances aux antibiotiques via des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les transposons, les échanges ou mutations chromosomiques [3]. Le dernier développement en matière de résistance, à savoir l'acquisition de la résistance aux Glycopeptides (ERG), a également été le plus impressionnant et le plus surprenant. C'est ce qui explique leur suivi dans les programmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens en tant qu'indicateurs de la résistance aux antibiotiques des bactéries Gram positif.

La plus grande menace que présentent ces entérocoques résistants aux Glycopeptides est sans doute leur capacité à transférer les gènes de résistance à des bactéries Gram positif plus pathogènes comme les staphylocoques dorés.

La synthèse bibliographique présentée dans ce manuscrit est divisée en trois parties. La première résume les connaissances actuelles sur le genre *Enterococcus*, son environnement, son pouvoir pathogène et ses facteurs de virulence. La seconde partie se veut être sur les antibiotiques utilisés en production aviaire et sur l'émergence des résistances aux antibiotiques. Dans la dernière partie sont décrites les résistances aux antibiotiques rencontrées chez les entérocoques.

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

1. Récolter des informations sur l'utilisation des antibiotiques en élevage avicole.
2. Evaluer le portage digestif des différentes espèces d'entérocoques chez la volaille.
3. Etudier la résistance des différentes espèces isolées aux antibiotiques et en particulier aux Glycopeptides.

CHAPITRE 1

GENRE *ENTEROCOCCUS*

1.1. Taxonomie:

Le nom « Entérocoque » a été pour la première fois utilisé en 1899 par THIERCELIN. Ce nom a été proposé pour préciser l'origine intestinale d'un nouveau diplocoque à Gram positif [4]. Les entérocoques ont subi par la suite de considérables changements dans leur taxonomie.

Ceci a commencé par la séparation du genre *Streptococcus* et la reconnaissance des entérocoques comme genre distinct. En 1903, THIERCELIN et JOUHAUD ont introduit le terme de « Genre *Enterococcus* ».

Les entérocoques ont été séparés des streptocoques, dans un premier temps sur la base d'études d'hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr. Cette séparation a été confirmée par la suite par l'analyse de séquences de l'ARNr 16S qui a montré que les entérocoques différaient aussi des lactocoques et de certains autres coques à Gram positif [5] [6] [7]. Les streptocoques et les lactocoques avec qui les entérocoques étaient liés dans le passé sont plus distants.

Le genre *Enterococcus* est placé dans la famille des *Enterococcaceae*. Aux deux espèces initialement placées dans le genre *Enterococcus* (*E.faecalis* et *E.faecium*) se sont rajoutées de nombreuses espèces. Le genre *Enterococcus* comptait 37 espèces en 2011, 47 espèces en 2013 (Voir figure 1.1) et 55 espèces en 2017 [8] [9] [10].

Classification [5] :

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	<i>Enterococcaceae</i> .
Genre	<i>Enterococcus</i>

1.2. Caractères cultureux et biochimiques:

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, catalase négative, non-sporulant, anaérobie facultatif, qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %) [17].

Certaines souches de *Enterococcus faecalis* sont β -hémolytiques sur gélose au sang (*E.faecalis* var. zymogènes), alors que les autres espèces d'entérocoques sont généralement α -hémolytiques ou non hémolytiques.

Quelques espèces sont mobiles (*E.casseliflavus* et *E.gallinarum* qui sont mobiles à 30°C). Les entérocoques ont une température de croissance optimale de 35 °C bien que la plupart des espèces de ce genre peuvent croître et résister à des conditions hostiles. En effet, ces microorganismes sont habituellement capables de pousser sous des températures allant de 10 à 45 °C. Ils peuvent aussi croître en présence de 6.5 % de NaCl, à pH 9.6, et ils survivent à un traitement de 60°C pendant 30 minutes [18].

Les entérocoques sont aussi capables d'hydrolyser l'esculine en présence de sels biliaires (test bile-esculine), ainsi que la leucine-p-naphthylamide (LAP) par la production de leucine aminopeptidase (LAPase).

La plupart des entérocoques, à part *E.cecorum*, *E.columbae*, *E.pollens*, *E.saccharolyticus*, et certaines souches des espèces *E.canintestini*, *E.devriesei* et *E.moraviensis*, hydrolysent aussi la L-pyrrolidonyl-P-naphthylamide (PYR) par la production de pyrrolidonyl arylamidase (Pyrrolidonase (PYRase)) [18].

Ces caractéristiques biochimiques et en particulier la dégradation de certains sucres ont permis la mise au point en bactériologie clinique de milieux « sélectifs » pour les entérocoques (Milieux dits bile-esculine) mais aussi de dépistage rapide par méthode chromogène, intéressants dans un contexte d'épidémie à ERV. Enfin l'identification des entérocoques est aisée par la technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF ou par certaines techniques moléculaires comme le séquençage du gène *sodA* codant pour l'ARNr 16S [19] [20] [21].

1.3. Niches écologiques :

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes dans différentes niches écologiques telles que l'intestin de l'homme et des animaux dont les reptiles, les oiseaux et même les insectes [22] [23] [24] [25].

Leur présence a même été démontrée chez certaines espèces animales préhistoriques auxquelles ils ont su s'adapter en évoluant avec les habitudes de vie au long des âges [11] [26]. On les retrouve également dans le milieu extérieur (Plantes, sols, eaux...) [27].

La plupart des espèces du genre *Enterococcus* participent à la composition des flores intestinales. Ils sont de bons indicateurs de contamination fécale [28].

Plusieurs espèces peuvent cohabiter au sein d'une même niche écologique mais il existe une relative spécificité d'hôte.

1.3.1. Chez l'homme :

Les entérocoques sont des membres minoritaires de la communauté bactérienne du tractus gastro-intestinal chez l'homme adulte. Les analyses moléculaires ont démontré que ces bactéries ne formaient qu'environ 1% de la microflore intestinale chez un adulte [29].

De nombreuses études ont établi qu'*E.faecalis* est l'espèce la plus communément retrouvée parmi les entérocoques [30] [31], suivie par l'espèce *E.faecium*. On retrouve généralement de 10^5 à 10^7 et 10^4 à 10^5 *E.faecalis* et *E.faecium*, respectivement, par gramme de fèces humaines. Par contre, l'observation de ces deux espèces est beaucoup moins prévalente chez le bétail [32]. Ces deux espèces vont être retrouvées en plus grand nombre dans le colon, mais les entérocoques peuvent être détectés tout le long du tractus gastro-intestinal ainsi qu'en faible nombre dans la cavité orale [33].

D'autres espèces, tel que *E.casseliflavus*, *E.durans* et *E.gallinarum*, sont aussi retrouvées dans des proportions variables dans le tractus gastro-intestinal humain [34] [35].

Les entérocoques peuvent aussi se retrouver dans d'autres sites corporels que le tractus gastro-intestinal tel que la cavité buccale (La gorge) et le tractus génito-urinaire humain (Le vagin) [35] [36].

La composition de la microflore intestinale est régulée par des facteurs autogéniques et allogéniques [37]. De façon générale, les facteurs autogéniques, qui régulent la communauté bactérienne, consistent en la compétition (Deux ou plusieurs microbes en rivalité pour un facteur qui n'est pas présent en quantité suffisante pour satisfaire à la demande) et en l'amensalisme (Inhibition des activités d'un ou plusieurs organismes par la production de substances toxiques, le parasitisme, et la prédation). D'un autre côté, les facteurs allogéniques sont des changements provenant de l'extérieur de la communauté et qui ont des effets directs ou indirects sur l'écosystème. Dans le cas de la population des entérocoques, celle-ci va fluctuer en taille, selon l'âge de l'hôte, dans le tractus intestinal de l'homme [38]. Ces changements se font particulièrement remarquer suite à un traitement aux antibiotiques de par l'augmentation des bactéries anaérobies facultatives. Parmi les bactéries entériques, les entérocoques sont celles étant retrouvés en plus grand nombre chez un individu traité aux antibiotiques [39]. L'observation de ces résultats peut être liée à l'augmentation des anticorps du sérum face aux microorganismes commensaux de l'intestin tels qu'*Escherichia coli* et *E.faecalis* [40].

1.3.2. Chez la volaille :

Chez les volailles, les entérocoques les plus fréquemment isolés sont : *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* chez les animaux jeunes et *Enterococcus cecorum* chez les animaux âgés de plus de 12 semaines [41].

L'espèce *E.columbae* est quand à elle l'espèce prédominante de la flore intestinale des pigeons ; l'espèce *E.cecorum* est l'espèce principale de la flore entérococcale des volailles et les bovins adultes ainsi que des porcs [42] [43].

Contrairement à son nom, l'espèce *E.avium* est rarement isolée à partir des intestins d'oiseaux, de même, l'espèce *E.gallinarum*, n'est pas un membre important de la flore des poulets. L'habitat des membres du groupe *Avium*

(*E.avium*, *E.malodoratus*, *E.raffinosis* et *E.pseudoavium*) est largement inconnu [35].

Des variations âge-dépendant dans la distribution des espèces entérocoquales ont été observées dans la flore des poulets. Les espèces *E.faecalis* et *E.faecium* prévalent ainsi lors des premiers jours de vie des poussins, puis *E.faecalis* diminue, suivie par *E.faecium*, pour être remplacée par *E.cecorum*, et dans une moindre mesure, par *E.hirae* et *E.durans*, dans la flore entérocoquale des poulets adultes [44] [42].

D'autres espèces sont occasionnellement retrouvées chez la volaille telles qu'*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus mundtii* [44] [41]. Le tableau 1.1 résume les principales espèces d'entérocoques retrouvées chez la volaille en fonction de l'âge.

Tableau 1.1 : Pourcentage des espèces *Enterococcus* retrouvées chez la volaille (Adapté de [45]).

Espèces <i>Enterococcus</i>	Age		
	1 jour	3-4 semaines	> 12 semaines
<i>E.avium</i>	0	0	1
<i>E.casseliflavus</i>	0	1	0
<i>E.cecorum</i>	0	9	68
<i>E.durans</i>	2	10	0
<i>E.faecalis</i>	47	4	14
<i>E.faecium</i>	47	60	14
<i>E.gallinarum</i>	0	1	0
<i>E.hirae</i>	0	13	1
<i>E.malodoratus</i>	-	-	-
<i>E.mundtii</i>	3	1	1
<i>E.pseudoavium</i>	-	-	-
<i>E.raffinosis</i>	-	-	-
Autres	-	-	-

1.4. Pouvoir pathogène des entérocoques et les signes cliniques associés :

La facilité avec laquelle les entérocoques acquièrent des résistances à des antibiotiques, couplée à leur capacité de survie dans l'environnement, les rend spécialement adaptés pour devenir des pathogènes opportunistes.

1.4.1. Chez l'homme :

Les entérocoques sont des agents pathogènes opportunistes principalement responsables d'infections nosocomiales chez les individus immunodéprimés hospitalisés pour de longues périodes, traités avec des dispositifs invasifs, et/ou avec des thérapies antimicrobiennes à large spectre [34].

Les infections à entérocoques en pathologie humaine sont principalement dues à deux espèces, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, qui représentent 95% des isolats cliniques de ce genre bactérien [46] [47]. D'autres espèces mineures peuvent causer des infections chez l'homme comme *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae* ou *E. raffinosus* [48] [49].

Aux Etats-Unis, les entérocoques sont le troisième genre bactérien isolé lors de bactériémies [46] et la seconde cause d'infections nosocomiales [50]. C'est aussi le genre le plus souvent cité lors d'infections de plaies chirurgicales dans les unités de soins intensifs [51].

Les infections à entérocoques peuvent provenir de nombreuses sources, comme les cathéters intraveineux, urinaire ou biliaire, les corps étrangers, les plaies chirurgicales ou encore via la cavité buccale [34] [52].

Certaines études ont aussi montré que les entérocoques pouvaient être transmis par les mains du personnel soignant, le matériel clinique [53] ou encore de patient à patient [33].

Les facteurs de risques de développer une infection à entérocoques ont été largement analysés et incluent une hospitalisation supérieure à 15 jours, l'administration prolongée d'antibiotiques ou l'existence d'une pathologie sous-jacente comme le diabète [47] [54].

1.4.2. Chez les animaux :

L'importance des entérocoques en tant que cause d'infections chez l'animal n'a cependant pas atteint le niveau de préoccupation retrouvé en médecine humaine. Dans plusieurs laboratoires de diagnostic vétérinaire, les infections à entérocoques ne sont pas toujours rapportées [55].

1.4.2.1. Volaille :

Les entérocoques les plus associés aux infections chez la volaille incluent *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.durans*, *E.cecorum*, *E.avium* et *E.hirae* [56].

Des souches d'*Enterococcus faecalis* ont été ainsi associées à des cas d'amylose chez les volailles et notamment chez les poules pondeuses. Les animaux présentent un retard de croissance et des dépôts de substance amyloïde dans de nombreux organes et tout particulièrement dans les articulations ce qui conduit à des polyarthrites et à des boiteries.

Un manque d'hygiène lors de la vaccination des poussins contre la maladie de Marek peut conduire à une contamination des aiguilles et des suspensions vaccinales par des souches d'*E.faecalis* ce qui expliquerait la survenue de l'affection dans certains élevages [57] [58].

L'espèce *E.hirae* est à l'origine d'un retard de croissance chez les volailles, et a été rendue responsable de troubles nerveux chez des poussins âgés de 3 à 8 jours, se traduisant par des torticolis [42]. Cette espèce est aussi impliquée en tant que cause de septicémie et de nécrose du cerveau chez les oiseaux.

Les entérocoques sont susceptibles de contaminer les aliments. Leur présence sur la coquille ou dans l'environnement, pourrait contaminer l'ovoproduit lors de sa fabrication [59].

1.4.2.2. Autres :

Les entérocoques peuvent être responsables de mammites, de pneumonies, de vaginites, d'arthrites, d'endocardites, de septicémies, de conjonctivites et de blépharites chez différentes espèces animales [60].

1.5. Facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence sont définis comme des éléments qui augmentent la capacité du microorganisme à provoquer la maladie : ils ne sont pas indispensables à la survie de la bactérie mais diminuent son potentiel pathogène lorsqu'ils sont absents [61].

Ces facteurs ont pour rôle de permettre l'adhérence aux cellules hôtes et à la matrice extracellulaire, faciliter l'invasion des tissus, moduler la réponse immunitaire et inflammatoire et causer des dommages par l'intermédiaire de toxines.

Les facteurs de virulence des entérocoques sont sujets à davantage d'études étant donné leur présence de plus en plus inquiétante lors d'infections nosocomiales et à leur résistance accrue aux antibiotiques.

L'espèce dominante des isolats cliniques est *E.faecalis* [62].

Ces facteurs sont représentés par ceux liés à la membrane et ceux sécrétés par la bactérie [63].

1.5.1. Facteurs liés à la membrane :

La substance d'agrégation est une adhésine de nature protéique qui vient tapisser la surface cellulaire de la cellule donatrice sous l'influence d'une phéromone produite par les cellules réceptrices et permet ainsi la formation d'agrégats cellulaires améliorant le transfert plasmidique qui se fait à haute fréquence par conjugaison [64] [52] [65].

1.5.2. Facteurs sécrétés :

L'hémolysine-bactériocine est un complexe cytolytique protéique produit par les souches d'*E.faecalis* sous espèces zymogènes. Cette hémolysine est une toxine oligomérique formée par l'association de deux protéines distinctes mais inséparables : une hémolysine Bêta bifactorielle formée du composant A (Pour activateur) et du composant L (Pour lytique) et d'une bactériocine [64] [52] [65].

Ce complexe lytique provoque une lyse cellulaire : érythrocytes humains, de lapin ou de cheval, et de nombreuses bactéries à Gram positif (Effet bactériocine) [52] [65].

D'autres substances sont élaborées par *E.faecalis* notamment une protéase (Zinc-endopeptidase) une hyaluronidase (Mucopolysaccharidase) [52].

En plus de ces facteurs de virulence, l'espèce *E.faecalis* possède des capacités physiologiques lui permettant d'accroître son caractère pathogène. Parmi ces capacités on peut citer celles :

- De passer à un état viable mais non cultivable (VBNC) [66] qui semble lié à la capacité de persister dans l'organisme lors d'infections chroniques [67].
- De former des biofilms qui permet entre autre de coloniser des surfaces, de se protéger de l'action des substances antimicrobiennes, de médier l'adhésion et l'invasion aux cellules hôtes [68].

Toutefois, les résultats obtenus lors de l'infection avec des souches portant ou non trois facteurs de virulence (Hémolysine, substance d'agrégation et gélatinase) montrent que ces facteurs, bien qu'aggravant la maladie, n'expliquent pas à eux seuls le pouvoir pathogène des entérocoques [69]. De plus, la relation entre présence du facteur de virulence et gravité de la maladie n'est que peu soulignée.

Les principaux facteurs de virulence identifiés chez *E.faecalis* sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 1.2 : Facteurs de virulence chez *E.faecalis* (Adapté de [70]).

Facteur de virulence	Rôle
Phéromones	Conjugaison : dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques et facteurs de virulences
Substance d'agrégation (AS)	Conjugaison : Protéine de surface dont l'expression est inductible par les phéromones et qui permet l'agrégation des cellules et l'adhésion aux cellules intestinales de l'hôte
EfaA	Adhésine : Antigène de surface, intervient lors d'endocardites
Ace	Adhésine : Adhésion au collagène, exprimée en conditions de stress
Esp	Adhésine : Adhésion et contournement du système immunitaire de l'hôte et formation de biofilms
Acides lipotéichoïques (LTA)	Récepteurs de l'AS, adhésion aux cellules eucaryotes, rôle dans l'apoptose de certaines lignées cellulaires comme les macrophages
Gélatinase (GelE)	Endopeptidase extracellulaire : hydrolyse la gélatine, le collagène et l'hémoglobine. Gène co-transcrit avec sprE, codant une sérine protéase
Cytolysine/hémolysine	Lyse cellulaire : activité sur les macrophages, les érythrocytes ou les bactéries à Gram positif
Epa, Cps	Biosynthèse de polysaccharides : rôle dans la survie dans les cellules phagocytaires
FsrAC	Système à deux composants : contrôle l'expression de gelE et sprE.
Gls24	Protéine générale de stress

CHAPITRE 2

ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE

2.1. Antibiotiques :

2.1.1. Définitions :

Le terme «antibiotique» (Issu des termes grecs anti, signifiant «Contre» et bios, «Vie») a été créé à la fin du 19^e siècle. Il désignait initialement toute substance faisant preuve «D'antagonisme», en faible concentration, envers les organismes vivants en général. Au milieu du 20^e siècle, la définition a été restreinte à toute substance d'origine naturelle produite par un microorganisme (Habituellement une bactérie ou une moisissure) capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autres microorganismes. Depuis, de nombreuses molécules antibiotiques ont été synthétisées ou modifiées en laboratoire [71].

Les antibiotiques peuvent être « Naturels », semi-synthétiques ou synthétiques. Les premiers sont obtenus par des procédés de fermentation par diverses espèces de microorganismes, notamment des moisissures et des bactéries. Les antibiotiques semi-synthétiques sont dérivés d'antibiotiques naturels, mais obtenus par une modification de leur structure en laboratoire. Les composés synthétiques sont exclusivement synthétisés en laboratoire [72].

Les antibiotiques diffusent généralement à travers la paroi bactérienne pour ensuite diffuser à travers l'espace intra-bactérien et finalement se fixent sur leur cible. Ils peuvent être bactériostatiques ou bactéricides [73].

Les antibiotiques agissent également sur différents groupes de bactéries et selon la proportion de ces groupes nous pouvons déterminer si l'antibiotique a un spectre d'action étroit, moyen ou large [74].

Les interactions qui se produisent entre les différents antibiotiques et les bactéries se nomment mécanismes d'action des antibiotiques. Ces derniers sont notamment influencés par les différences structurales et métaboliques entre les cellules microbiennes et animales.

Le tableau suivant donne la liste des cinq principaux modes d'action et présente les grandes familles chimiques d'antibiotiques associées à chacun d'eux.

Tableau 2.1 : Principaux modes d'action des grandes familles d'antibactériens [75] [76] [77] [72].

Mode d'action	Familles d'antibiotiques impliquées
Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.	β -lactamines, Glycopeptides (Vancomycine), Polypeptides (Bacitracine)
Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de la membrane plasmique.	Polymyxines
Inhibition de la synthèse des protéines.	Aminosides, Tétracyclines, Macrolides et Lincosamides
Inhibition de la synthèse de l'acide nucléique (ADN).	Quinolones et certains Ansamycines
Inhibition du métabolisme intermédiaire (acide folique, impliqué dans la synthèse des nucléotides)	Sulfamides, Triméthoprim

En élevage, les antibiotiques restent parmi les molécules les plus utilisées. Leur utilisation peut être prophylactique, thérapeutique ou strictement zootechnique (Promoteur de croissance) en vue d'améliorer les performances animales [78].

A titre prophylactique et curatif, les antibiotiques servent à guérir ou prévenir les infections. L'usage prophylactique est souvent employé à l'échelle d'un troupeau ou d'un élevage complet lorsqu'il y a une menace d'infection généralisée, ou parce qu'il est connu que, de manière générale, les animaux d'un groupe d'âge ou d'un site d'élevage particulier, sont hautement susceptibles d'être atteints par une infection (Par exemple, l'entérite nécrotique chez les poulets).

Les lignes directrices pour une utilisation judicieuse des antibiotiques sont basées sur trois principes:

- L'antibiotique doit être efficace contre le microorganisme pathogène visé;
- La dose utilisée doit être suffisante pour tuer ou inactiver le microorganisme pathogène;
- La durée du traitement doit permettre l'élimination du microorganisme visé [79].

L'usage le plus controversé des antibiotiques, tant au niveau de la population que la communauté scientifique, est celui des promoteurs de croissance. La raison de cette controverse consiste en leur utilisation à de faibles concentrations sur une période de temps plus élevé, et cela principalement pour obtenir un meilleur rendement de production et une meilleure conversion des aliments chez l'animal.

Les promoteurs de croissance ont été préconisés dans le milieu des années 50, lorsqu'il a été découvert que de petites quantités sous-thérapeutiques d'antibiotiques, tels que la Pénicilline procainique et la Tétracycline (1/10 à 1/100 de la dose thérapeutique), délivrées aux animaux par l'alimentation, pouvaient augmenter le ratio aliments/poids de la volaille, du porc et des bovins [80].

Les différents types d'utilisation des antimicrobiens chez le bétail sont représentés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Types d'utilisation des substances antimicrobiennes chez le bétail [81].

Utilisation	But	Voie d'administration	Groupes d'animaux visés
Thérapeutique*	Traiter une infection en cours	Ingestion (Aliments et eau d'abreuvement) ou injection	Animaux malades. Lorsqu'administré par voie orale, il arrive que tous les animaux du groupe soient traités, incluant ceux sans signe clinique
Prophylactique*	Prévenir une infection chez un lot d'animaux avant l'apparition des premiers signes cliniques.	Habituellement par ingestion (Surtout par la nourriture, mais aussi parfois par l'eau); possibilité par injection (Comme les œufs en couvoir).	Groupes spécifiques (Porcelets en post-sevrage) ou avec un statut sanitaire particulier (Traitement préventif de l'entérite nécrotique dans des élevages de poulets où la maladie s'est manifestée antérieurement)
Facteur de Croissance	Favoriser le gain de masse de l'animal.	Habituellement par les aliments	Tous les animaux d'un groupe d'âge, d'un lot ou d'un troupeau donné

* Une utilisation combinant un usage thérapeutique et prophylactique est appelée «métaphylactique ».

2.1.2. Antibiotiques utilisés en production aviaire :

Les antibiotiques utilisés à titre curatif en production aviaire sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 2.3 : Liste des antibiotiques utilisés en production aviaire [82].

Classe antibiotique	Antibiotique	Observations particulières
β Lactamines	Ampicilline Amoxicilline	Ces antibiotiques sont utilisés pour traiter les cas de septicémies, d'infections respiratoires et urinaires
Aminoglycoside	Néomycine	Les Aminoglycosides sont utilisés dans le traitement des septicémies; des affections digestives, respiratoires et urinaires.
Sulfamides et associés	<u>1 Sulfonamides :</u> Sulfadimérazine Sulfadiméthoxine Sulfadiméthoxazole Sulfaméthoxine <u>2 Diaminopyrimidines :</u> Triméthoprime	Les Sulfamides seuls ou en combinaison avec les diaminopyrimidines sont très utilisés pour le traitement de beaucoup de pathologies
Quinolones	<u>1 Quinolones 1^{ère} génération</u> Fluméquine <u>2 Quinolones 3^{ème} génération:</u> Enrofloxacin	Les Quinolones de 1 ^{ère} et 3 ^{ème} génération sont utilisées dans le cas des colibacillooses et des septicémies. Les Fluoroquinolones sont très utilisées dans le traitement des maladies respiratoires chroniques chez la volaille.

Tableau 2.3 (Suite).

Classe antibiotique	Antibiotique	Observations particulières
Cyclines	Doxycycline Oxytétracycline	Antibiotiques très utilisés dans le traitement de nombreuses maladies bactériennes
Polypeptides	Colistine	Antibiotique indiqué dans le traitement des affections digestives telles que la colibacillose.
Macrolides	Erythromycine Tylosine	Antibiotiques utilisés pour traiter les infections à mycoplasmes chez la volaille.
Lincosamides	Lincomycine	Antibiotiques essentiels dans le traitement des pneumonies à mycoplasmes, et de l'entérite hémorragique.

Les antibiotiques comme facteurs de croissance ne sont plus incorporés dans l'alimentation animale et sont interdits d'utilisation depuis Avril 2007 (Décision interministérielle du 24 Décembre 2006) [82].

Par ailleurs, il importe de souligner que tout usage d'antibiotiques, même justifié et judicieux, entraîne éventuellement le développement ou la sélection de souches microbiennes résistantes. Il ne faut donc pas seulement imputer le développement de l'antibiorésistance à des pratiques inappropriées ou abusives. Le risque de développement de la résistance sera d'autant plus important que l'usage sera fréquent (En continu ou répété) et étendu à une forte proportion d'un troupeau [81].

2.2. Résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. La résistance peut être naturelle ou acquise [73].

2.2.1. Résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (Elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (D'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes). Cette résistance naturelle confère une certaine tolérance, voir une insensibilité totale vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antimicrobiens.

L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à :

- Un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (Par exemple, la faible affinité de l'Acide Nalidixique pour la gyrase des entérocoques),
- Une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (Imperméabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatif aux Glycopeptides comme la Vancomycine),
- Une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (Résistance aux Tétracyclines, au Chloramphénicol et aux Quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*), ou encore,
- Une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (La production d'une Bêta-lactamase chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae*) [83].

2.2.2. Résistance acquise :

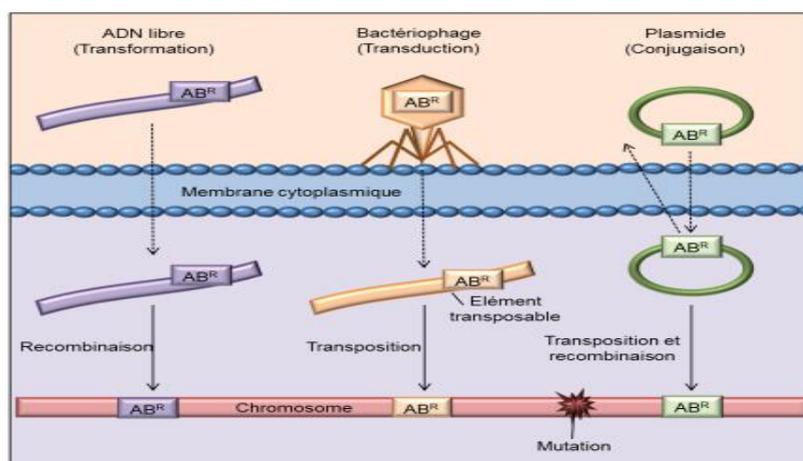
Résistance qui apparaît chez des bactéries jusqu'alors sensibles aux ATB, consécutives à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou plasmidique. Elles ne concernent que quelques souches d'une même espèce mais peuvent s'étendre.

On décrit deux phénomènes majeurs à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes.

2.2.2.1. Mutation, transformation, transduction et Conjugaison :

Une bactérie peut devenir résistante à un antibiotique par mutation survenant au niveau du gène codant pour la cible de l'antibiotique au sein du chromosome.

Une bactérie peut également acquérir du matériel génétique étranger par incorporation de segments d'ADN libre dans leur chromosome (Transformation). Des gènes de résistance peuvent aussi être transférés lors d'une infection par un bactériophage (Transduction) et lors de phénomène de conjugaison de transposons conjugatifs et de plasmides. Le terme général élément transposable désigne une séquence d'insertion, ou un transposon qu'il soit composite, complexe ou conjugatif, ou un bactériophage transposant, ou encore un intégron. La figure 2.1 illustre les différentes voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques.



AB^R : gène de résistance à un antibiotique.

Figure 2.1 : Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques [84].

2.2.2.2. Persistance de la résistance dans l'environnement :

L'augmentation de la prévalence et la dissémination des résistances était une issue prévisible du recours croissant à l'antibiothérapie, un exemple du principe Darwinien de la survie du plus adapté.

Dans toute grande population bactérienne, quelques individus possèdent des caractéristiques qui leur permettent de survivre en présence d'une substance toxique, alors que les organismes sensibles (Qui n'ont pas ou qui ont perdu cette caractéristique) sont éliminés, laissant une population résiduelle de germes résistants.

L'usage, à long terme, des antibiotiques contribue à modifier fortement l'écologie microbiologique d'un environnement donné, en permettant aux éléments les moins sensibles de la population microbienne de devenir prédominants [85] [86] [87] [88]. De cette façon, les bactéries commensales et opportunistes résistantes deviennent rapidement les composants essentiels des flores normales de nombreuses espèces hôtes en déplaçant progressivement le niveau de sensibilité des populations. De plus, le regroupement de multiples gènes de résistance sur des plasmides, des transposons et des intégrons rend le problème d'autant plus préoccupant, du fait notamment, des phénomènes de co-sélection de résistances. Ajoutons à cela une complication supplémentaire, lorsqu'une co-sélection peut également s'exercer sur des gènes de résistance aux antibiotiques liés physiquement à d'autres gènes sélectivement avantageux dans certaines circonstances, tels que des caractères de virulence [89], ou encore une résistance à des antiseptiques, des métaux lourds, et des désinfectants [86] [88].

Porter et répliquer des gènes de résistance lorsqu'ils ne sont plus nécessaires représente, par contre, un fardeau pour une bactérie. Ainsi, en absence de pression de sélection exercée par un antibiotique, les bactéries sensibles possèdent un avantage sélectif et assurent lentement un retour de la population à un niveau de sensibilité global [90] [91]. Cependant, des travaux récents montrent que les bactéries sont également capables de conserver les traits de résistance à un antibiotique en l'absence de pression de sélection exercée par ce dernier, notamment par les événements de co-sélection décrits plus haut. Les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène ne sont pas élucidés. Ils semblent multifactoriels et font probablement intervenir des mécanismes de compensation de la charge métabolique imposée à la bactérie par la présence des gènes de résistance, ou encore une régulation de l'expression des gènes en présence ou non de l'antibiotique [88].

Enfin, le réservoir des gènes de résistance aux antibiotiques a deux localisations principales, à savoir les microflore commensales des organismes

vivants et les bactéries environnementales. En effet, les foies commensales gastro-intestinales et de toute autre zone non stérile du corps des hommes et des animaux sont le siège de transferts permanents de gènes de résistance entre les bactéries résidentes et les germes pathogènes [92]. D'ailleurs, il semblerait que ces échanges constants représentent plus un danger pour la santé publique que la pression de sélection exercée directement sur les agents pathogènes lors des traitements.

Le second réservoir majeur des gènes de résistance aux antimicrobiens est composé des microbiotes environnementaux, où la plupart des gènes transférables de résistance aux antibiotiques sont apparus pour ensuite être acquis par les germes pathogènes et commensaux [93].

L'ère moderne d'utilisation des antibiotiques, telle que nous la connaissons aujourd'hui, représente en quelque sorte, une pression de sélection artificielle s'opérant sur les transferts naturels. En outre, l'usage intensif actuel des antibiotiques occasionne d'importantes perturbations des écosystèmes microbiens environnementaux via les nombreux résidus rencontrés dans les eaux usées, les fermes et les effluents d'aquaculture pour ne citer qu'eux [94].

2.2.3. Éléments génétiques mobiles :

Les mouvements des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent se produire à deux niveaux distincts, à savoir intra et intercellulaire, impliquant chacun des éléments de mobilité différents. Ces derniers incluent les séquences d'insertion, les transposons, les intégrons, les bactériophages, les îlots génomiques (Tels que les îlots de pathogénie), les plasmides et des combinaisons de ces éléments [95].

2.2.3.1. Plasmides :

Par définition, les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques se répliquant de façon semi-autonome. Les différences dans les mécanismes de réplication et les structures modulaires affectent profondément les

propriétés du plasmide, telles que sa taille, son nombre de copie, sa dépendance à un hôte et sa distribution à travers ceux-ci [96].

Les plasmides ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie. Cependant, ils sont porteurs de gènes conférant un avantage sélectif à la cellule qui les possède. En effet, les fonctions codées par les plasmides se répartissent en fonctions de base qui leur sont essentielles, telles que la réplication, la partition, la conjugaison et autres modes de transfert, et en fonctions non essentielles, conférant un phénotype particulier à la bactérie hôte, telles que des résistances à des antibiotiques, à des métaux lourds ou aux ultra-violets, des facteurs de virulence (Adhésines, toxines), des propriétés de fermentation, des propriétés de dégradation, des propriétés métaboliques, des bactériocines, ou encore la capacité de fixer l'azote atmosphérique.

Des plasmides de résistance sont identifiés à la fois parmi des bactéries pathogènes et commensales, gram positives et gram négatives. Ils sont porteurs de gènes de résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques disponibles pour un usage clinique actuellement, y compris les fluoroquinolones [97] [98] [99], et il n'est pas rare qu'un seul plasmide soit simultanément porteur de gènes de résistances vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de familles différentes, et qu'il soit porté par des genres bactériens différents [100] [101]. Par conséquent, les plasmides offrent, aux cellules hôtes, la capacité d'occuper une grande variété de niches écologiques, et contribuent dès lors à l'évolution, non seulement des espèces bactériennes, mais également des plasmides au sein de ces espèces.

2.2.3.2. Transposons :

Contrairement au plasmide, le transposon ne peut se répliquer de façon autonome, il doit donc se retrouver dans un plasmide ou un chromosome bactérien. Cet élément est composé d'une courte séquence d'ADN qui peut se déplacer entre des plasmides, entre un plasmide et le chromosome bactérien ou entre un plasmide et un virus bactérien (Bactériophage). La présence des antibiotiques peut permettre l'expression des gènes de résistance présents sur le transposon et augmenter le taux de transfert de ces gènes [102].

La transposition quant à elle, consiste en l'insertion, en un site du génome de la bactérie (Le chromosome ou un plasmide), d'une unité discrète d'ADN (Transposon) ou séquence d'insertion (SI). Le mouvement effectué par le transposon est appelé transposition et les enzymes qui en sont responsables sont nommées transposases.

Le transposon, également surnommé « Jumping gene », code pour ses propres transposases et conserve sa capacité à « Sauter » d'une région à l'autre du génome lorsqu'il se déplace. Tous les transposons bactériens sont constitués au niveau de leurs extrémités, de séquences d'ADN inversées et répétées, cibles des transposases et de courtes séquences répétées de l'ADN cible qui encadrent le transposon. Les plus petits transposons bactériens, nommés séquences d'insertion (SI), contiennent très peu d'informations génétiques outre les gènes codant pour les transposases. Ces séquences d'insertion ne codent d'ailleurs pas pour des gènes sélectifs, et leur découverte tient, dès lors, de l'inactivation des gènes qu'elles produisent lorsqu'elles s'intègrent dans ceux-ci et des modifications phénotypiques qu'elles causent.

Lorsque deux séquences d'insertion de séquences similaires, généralement en orientation inversée, encadrent d'autres gènes que ceux requis pour la transposition, comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques, on parle de transposon composite. Les transposons non composites complexes ne sont pas associés à des séquences d'insertion, et se composent quant à eux, de courtes séquences répétées inversées encadrant une région centrale composée notamment des gènes nécessaires à la transposition et des gènes de résistance, qui ne représentent qu'une petite partie de l'unité transposable [103] [86] [104] [101].

Les transposons conjugatifs diffèrent des autres transposons car, d'une part, ils possèdent des fonctions de transfert, faisant d'eux une sorte d'hybride entre le transposon et le plasmide, et par, d'autre part, l'absence de séquences répétées inversées. Le transposon conjugatif est capable de promouvoir son excision du génome de la cellule hôte, pour former une structure intermédiaire circulaire d'ADN bicaténaire, suivie ensuite d'une étape de conjugaison à une bactérie voisine. Cette étape de conjugaison peut, en fait, être vue comme une forme de réplication. En effet, au cours de ce processus, l'intermédiaire circulaire est scindé en deux, une structure simple brin maintenue dans la bactérie donneuse et l'autre

fournie à la bactérie receveuse, qui doivent encore être dupliquées pour former à nouveau une structure double-brin essentielle à l'intégration ultérieure au chromosome ou dans un plasmide. Les transposons conjugatifs ont été identifiés parmi les bactéries gram négatives et gram positives [103] [86] [104] [101].

Enfin, un dernier type d'élément génétique mobile aux caractéristiques proches de certaines séquences d'insertion a été découvert récemment. Ces structures particulières, nommées ISCR (IS pour insertion séquence soulignant l'étroite relation entre ces éléments et les séquences d'insertion, et CR pour common region soulignant la présence de séquences conservées de recombinaisons), réalisent une transposition répllicative, et se composent d'un gène codant pour une enzyme analogue des transposases, délimité par des séquences d'initiation et de terminaison de réplication. Ces éléments s'insèrent de façon aléatoire dans le génome bactérien, et disposent d'un mécanisme de réplication imprécis se poursuivant généralement au-delà du site de terminaison, et permettant ainsi une mobilisation des séquences adjacentes aux ISCR [105] [106] [107].

2.2.3.3. Intégrons :

L'intégron est un élément génétique susceptible d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques. Les intégrons peuvent contenir des éléments mobiles, nommés cassettes, possédant la plupart du temps des gènes de résistance aux antibiotiques. Les cassettes sont intégrées ou excisées par un système de recombinaison spécifique à l'aide d'une intégrase. On retrouve principalement les intégrons au niveau des bactéries à Gram-négatif, mais parfois également chez celles à Gram positif. On retrouve les intégrons tant au niveau des plasmides, des transposons que du chromosome bactérien [108].

Ils sont dotés d'une structure spécifique, composée de deux segments conservés encadrant une région centrale dans laquelle peuvent s'insérer les cassettes de gène de résistance aux antimicrobiens. Actuellement, quatre classes d'intégrons ont été identifiées sur base de la structure du gène codant pour l'intégrase, parmi lesquelles les intégrons de classe 1 semblent être les plus largement répandus.

Les cassettes de gènes sont des éléments génétiques circulaires et libres d'environ 500 à 1000 paires de bases qui ne possèdent pas de région promotrice et qui ne peuvent donc pas être exprimées seules.

Les intégrons peuvent incorporer successivement plusieurs cassettes. Ils sont aussi bien répartis parmi les bactéries Gram négatif que Gram positif, et semblent impliqués parmi ces dernières, dans la dissémination de gènes de résistance autrefois supposés restreints aux germes Gram négatif. Des études, réalisées sur des populations de bactéries collectées au niveau d'hôpitaux et de différents site agricoles, ont révélé la présence de nombreux intégrons complets, disposant de cassettes de gènes de résistance, ce qui souligne l'importance du processus de capture de gènes médié par ces éléments particuliers au cours de l'évolution des résistances aux antibiotiques [109] [101] [107] [110].

2.2.3.4. Îlots génomiques :

Un îlot génomique se définit comme une région d'ADN chromosomique de grande taille, généralement comprise entre 10 et 200 kilo bases.

Le premier génome d'*Enterococcus faecalis* séquencé, soit la souche résistante à la Vancomycine V583, est formé de plus de 25 % d'éléments mobiles, dont un grand îlot de pathogénie d'environ 150 kb [111].

Les îlots génomiques contiennent fréquemment des gènes de mobilité impliqués dans leur transfert. Les îlots génomiques sont généralement porteurs d'éléments d'insertion ou de transposons, impliqués dans l'introduction, la mobilisation ou la délétion de matériel génétique à l'intérieur de ceux-ci. Enfin, les îlots génomiques sont souvent porteurs de gènes conférant un avantage sélectif à la bactérie hôte qu'elle soit pathogène ou environnementale, et jouent par conséquent un rôle crucial dans l'évolution de ces dernières en permettant la dissémination de nombreux gènes tels que des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes de virulence, ou encore des gènes codant pour diverses voies métaboliques [112]. Ces éléments sont également capables de se répliquer au cours du processus de conjugaison, cependant ce phénomène n'est pas impliqué dans leur maintien [113].

Le tableau suivant résume les principales caractéristiques de différents éléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes de résistance.

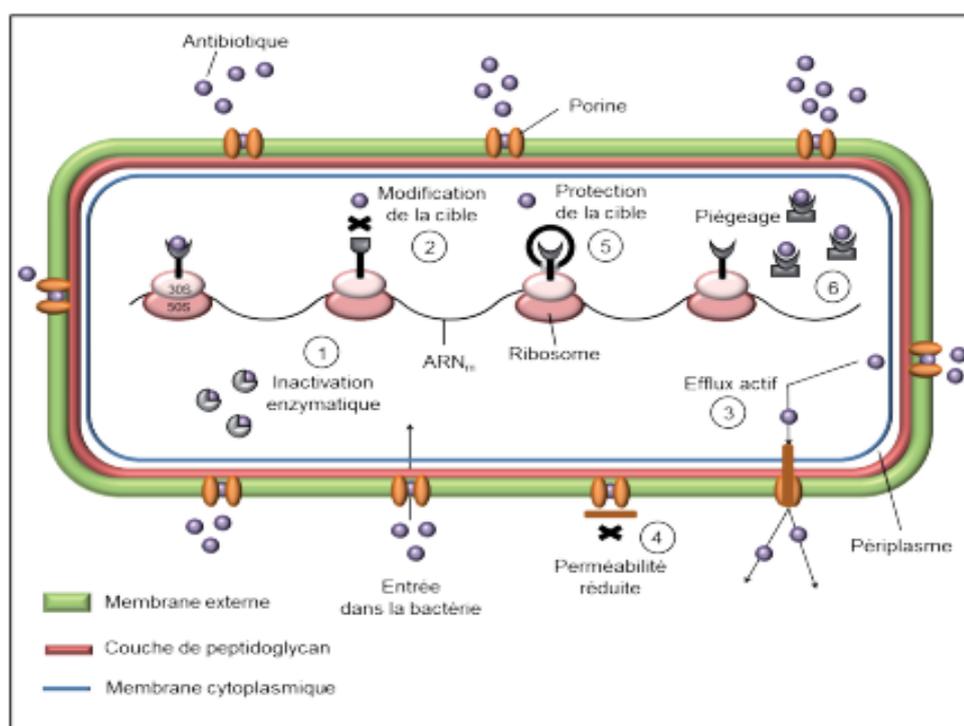
Tableau 2.4 : Caractéristiques de différents éléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes de résistance (Adapté de [83]).

Élément génétique	Caractéristiques	Rôles
Plasmide conjugatif	<ul style="list-style-type: none"> - Circulaire - Élément de réplication autonome - Présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison 	<ul style="list-style-type: none"> - Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Plasmide mobilisable	<ul style="list-style-type: none"> - Circulaire - Élément de réplication autonome - Présence des gènes permettant d'utiliser l'appareil de conjugaison d'un plasmide conjugatif 	Transfert de gènes de résistance
Transposon et ISCR	Capacité de déplacement depuis un segment d'ADN vers un autre à l'intérieur d'une bactérie	Transport de gènes de résistance du chromosome vers un plasmide et vice versa
Transposon conjugatif	<ul style="list-style-type: none"> - Élément intégré pouvant s'exciser pour former un intermédiaire de transfert non répliatif - Présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison 	<ul style="list-style-type: none"> - Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Cassette de gène	<ul style="list-style-type: none"> - Circulaire - Segment d'ADN non répliatif - Présence seulement d'une fenêtre de lecture ouverte - Intégration dans les intégrons 	Porte des gènes de résistance
Intégron	<ul style="list-style-type: none"> - Segment d'ADN intégré - Présence d'une intégrase, d'un promoteur, et d'un site d'intégration pour la cassette de gène 	Groupe de gènes de résistance dont l'expression est sous le contrôle du promoteur de l'intégron
Ilot génomique et EIC	<ul style="list-style-type: none"> - Segment d'ADN chromosomique - Présence des gènes nécessaires aux déplacements et au transfert par conjugaison 	<ul style="list-style-type: none"> - Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Bactériophage	<ul style="list-style-type: none"> - Virus de bactérie - Circulaire ou non - Élément de réplication autonome 	<ul style="list-style-type: none"> - Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Fragment d'ADN isolé dans le milieu	Transféré par transformation d'une bactérie compétente	Porte des gènes de résistance

2.2.4. Types de mécanismes de résistance :

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. D'autres mécanismes tels que la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés [114].

La figure 2.2 présente une illustration de ces différents mécanismes de résistance au sein des bactéries Gram négatif.



1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique. ARNm : acide ribonucléique messager

Figure 2.2 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négatif (Adapté de [114]).

2.2.4.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles.

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des Bêtalactames, des Aminoglycosides et des Phénicolés [114] [84] [115].

2.2.4.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique :

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux Pénicillines, aux Glycopeptides. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les Sulfamidés, les Diaminopyrimidines (Triméthoprime) et les Bêtalactames dont les *Staphylococcus aureus* résistants à la Méthicilline (SARM) ainsi qu'à toutes les Bêtalactames d'usage vétérinaire sont un exemple remarquable par la synthèse d'une nouvelle PBP (Penicillin Binding Protein) possédant une affinité moindre pour la Méthicilline [114] [84] [115].

2.2.4.3. Pompes à efflux :

Elles sont insérées dans la membrane et capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie grâce un canal ; cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.

2.2.4.4. Perméabilité réduite :

Contrairement aux bactéries Gram positif, dont la structure enveloppante est assez simple, composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycanes que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatif jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. Ainsi, au sein des bactéries Gram négatif, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique.

Des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques.

Citons comme exemple, la réduction de l'expression de la porine OmpF chez *E.Coli* qui entraîne une réduction de sensibilité aux Quinolones, aux Bêtalactames, aux Tétracyclines et au Chloramphénicol. La diminution de la perméabilité est donc un mécanisme de résistance cliniquement très important chez les bactéries Gram négatif et plus précisément chez *P.aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae*, étant donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible [114] [84] [115].

2.2.4.5. Protection de la cible de l'antibiotique :

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des Tétracyclines et plus récemment décrit pour les Quinolones et les Fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux Tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome. Depuis quelques années, des souches présentant des résistances subcliniques dites à bas niveau aux Fluoroquinolones ont été observées. Ces résistances sont notamment dues à la présence de gènes plasmidiques qnr (Pour Quinolone résistance) dont 5 groupes existent.

Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatif à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positif [116].

Les protéines qnr en se fixant sur les topoïsomérasés, cibles des Fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles [117] [118] [19].

2.2.4.6. Piégeage de l'antibiotique :

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des Sulfamidés et du Triméthoprimé ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce mécanisme est également impliqué dans des bas niveaux de résistance aux Glycopeptides chez certaines souches de *S.aureus*, et à la Tobramycine chez *E.coli* [114].

Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries sont représentés dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques [120] [121] [73] [122].

Type de mécanisme de résistance	Mécanisme de résistance spécifique	Classe d'antibiotique (Antibiotique)
Inactivation de l'antibiotique	Dégradation enzymatique (Bêtalactamases)	Bêtalactamines
	Modification enzymatique (Phosphotransférase, adényltrasférase, acétyltrasférase)	Aminoglycosides
	Dégradation enzymatique (CAT)	Phénicoles
	Dégradation enzymatique (Acétyltrasférase)	Streptogramines A
	Dégradation enzymatique (Nitrofurane réductase)	Nitrofuranes
Reflux actif et imperméabilité à l'antibiotique	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Tétracyclines
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Macrolides
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Quinolones
	Diminution de la perméabilité cellulaire	Polymyxines
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Polypeptides
	Changement de la perméabilité de la membrane externe	Aminoglycosides
	Pompe à efflux par transporteur membranaire	Phénicoles
Modification de la cible de l'antibiotique	Méthylation site actif du ribosome	Macrolides, Lincosamides, Streptogramine B
	Modification de la cible (Nucléotidyltrasférase)	Lincosamides
	Méthylation du ribosome	Orthosomycine
	Mutation ou recombinaison des gènes codant pour DHPS	Sulfamides
	Mutation ou recombinaison des gènes codant pour DHFR	Triméthoprimes
	Mutation des gènes codant pour ADNgyrase et topoisomérase IV	Quinolones
	Modification du complexe D-Ala- D-Ala	Glycopeptides
	Modification de la cible PBP et surproduction	Bêtalactamines
	Protection et modification de la cible ribosomale	Tétracyclines
Résistance de la cible	Surproduction de la cible (DHFR)	Triméthoprimes
	Surproduction de la cible dans le peptidoglycane	Glycopeptides
	Surproduction de la cible (Undecaprenol monophosphate) par l'enzyme undecaprenol kinase	Polypeptides (Bacitracine)

CAT : Chloramphénicol acétyltrasférase; DHPS : Dihydroptéroate synthase; DHFR : Dihydrofolate réductase; PBP : Penicillin-binding protein.

2.3. Microorganismes indicateurs de résistance aux antibiotiques :

Les espèces *E.faecalis* et *E.faecium* ont le potentiel de se disséminer facilement à travers la chaîne alimentaire, de contaminer l'eau et l'environnement [123]. Ils sont habituellement retrouvés en très grand nombre dans les aliments d'origine animale tels que les carcasses de bœuf, de porc et de volaille indiquant ainsi une contamination fécale [32] [124]. De plus, ils possèdent une très grande capacité d'acquisition et de transfert de la résistance aux antibiotiques [125]. Toutes ces caractéristiques expliquent leur suivi dans les programmes de surveillance de l'antibiorésistance en tant qu'indicateurs de résistance aux antibiotiques pour les bactéries à Gram positif.

2.3.1. Méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques :

Les tests de sensibilité conventionnels aux antibiotiques dits tests phénotypiques mesurent le phénotype de résistance. Le résultat est habituellement rendu sous une forme qualitative : sensible, intermédiaire ou résistant. Il est obtenu à partir de la méthode de diffusion en gélose, permettant de passer en revue d'éventuelles résistances (Exemple: souches résistantes à la Méthicilline) et de détecter des activations enzymatiques (β -lactamase).

Cette méthode consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une géloseensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après 18 heures d'incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque permettant ainsi de mesurer un diamètre. La comparaison de ce diamètre aux diamètres standards, publiés dans les différents guides, permet de répondre qualitativement si la souche étudiée est sensible, intermédiaire ou résistante.

Le résultat peut également être rendu sous une forme quantitative par la concentration minimale inhibitrice (CMI) correspondant à la plus faible concentration antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne in vitro.

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

Ces tests conventionnels requièrent en priorité l'obtention d'une culture bactérienne et un délai minimum de 48–72 heures. Leur fiabilité peut être irrégulière, car dépendante de la qualité du prélèvement, de la taille de l'inoculum initial et de la variation des conditions de culture qui peuvent modifier l'expression phénotypique de la résistance.

Aussi, ces techniques ont une certaine limitation étant donné que la résistance envers un seul groupe donné de bactéries est déterminée. Elles sous-estiment donc le nombre de bactéries résistantes dans la communauté présente.

Afin d'améliorer l'estimation, il serait mieux d'ensemencer des milieux gélosés supplémentés en antibiotique avec des cultures de bactéries identifiées seulement au genre ou de toucher le centre de plusieurs colonies afin d'obtenir un McFarland 0.5 pour ensuite faire les analyses [126].

2.3.2. Méthodes génotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques :

L'acquisition de gènes de résistance ou de mutations intrinsèques responsables de résistances bactériennes a été décrite pour plusieurs combinaisons microbes-antibiotiques. La détection des déterminants génétiques devrait permettre de contourner la nécessité d'isolement bactérien et d'éviter la dépendance vis-à-vis des conditions de culture. Le risque lié à la culture de bactéries hautement virulentes est alors réduit.

L'avantage est aussi d'obtenir plus facilement des résultats génotypiques sur des micro-organismes qui sont non cultivables, difficilement cultivables ou à croissance lente (*Mycobacterium tuberculosis*).

Un inconvénient majeur des méthodes moléculaires est que le mécanisme génétique responsable de la résistance doit être connu. Si ce mécanisme n'est pas connu, aucun essai moléculaire approprié ne peut être développé. Il est également important de constater que lorsque les méthodes moléculaires sont utilisées seules, la résistance causée par de nouveaux mécanismes génétiques ne sera pas détectée. De plus, même si la présence d'un gène codant pour de la

résistance aux antibiotiques est détectée, celle-ci ne signifie pas nécessairement qu'elle confère un phénotype de résistance [127].

Récemment, GARNEAU et collaborateurs [128] ont mis au point une biopuce à ADN afin de cibler les gènes de résistance aux antibiotiques acquis étant retrouvés dans un large spectre de bactéries. Cette biopuce contient 182 sondes correspondant à 166 gènes de résistance aux antibiotiques et leurs variants retrouvés dans différentes souches de bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Afin de mieux comprendre les mécanismes et l'épidémiologie de la résistance aux antimicrobiens, les éléments génétiques responsables doivent être identifiés. Pour y arriver, FRYE *et al.* [129] ont identifié les gènes de résistance dans la base de données GenBank (NCBI) et les ont compilés en une liste de 775 gènes. Ainsi, une biopuce a été conçue ciblant ces gènes codant pour les résistances envers les Aminoglycosides, les Bêtalactamines, les Phénicoles, les Glycopeptides, les Métaux lourds, les Lincosamides, les Macrolides, les Métronidazoles, les Polyketides, les Ammoniums quaternaires, les Streptogramines, les Sulfamides, les Tétracyclines, et les Triméthoprimes ainsi que les gènes responsables du transfert horizontal. Leurs résultats semblent démontrer la possibilité de détecter virtuellement tous les gènes de résistance aux antimicrobiens et ce, peu importe l'espèce bactérienne [129].

Une biopuce à ADN ciblant les gènes des entérocoques (Enteroarray) a été conçue par l'équipe du Dr. MASSON [130]. Celle-ci contient des sondes ciblant quatre identifiants taxonomiques à l'espèce qui permettent de discriminer 18 espèces différentes d'entérocoques. D'autres sondes ont été conçues afin d'identifier 18 facteurs de virulence et 174 gènes de résistance aux antibiotiques. Au total, 262 gènes ont été utilisés pour une identification rapide des isolats d'entérocoques, tout en caractérisant leur potentiel de virulence via une identification simultanée des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence endogènes [130].

La plupart des tests de sensibilité génotypiques sont fondés sur les méthodes d'amplification d'un segment d'ADN portant sur une partie ou la totalité du gène de résistance. Il peut également s'agir d'une partie intrinsèque de gène bactérien au sein duquel peuvent être repérées des mutations de résistance. L'étape initiale consiste donc à amplifier l'acide nucléique recherché ou acide

nucléique cible. En général, ce processus fait appel à la technique de la polymérase chain reaction (PCR), mais aussi l'amplification par sonde (Exemple: la ligase chain reaction), et l'amplification de signal (Exemple: la technique bDNA, ADN branché) [131].

Le produit obtenu par le biais de cette réaction est appelé un amplicon.

L'étape suivante consiste à confirmer que cet amplicon est l'ADN cible recherché correspondant à une partie ou à la totalité du gène de résistance. Cette étape utilise les techniques d'électrophorèse, analyse par sonde d'hybridation (Southern blot, ELISA= Enzyme Linked Immunosorbent Assay), analyse du polymorphisme de restriction (RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism) ou séquençage de l'ADN [132] [133].

Bien que les résultats puissent être obtenus rapidement, les techniques de biologie moléculaire réclament souvent des conditions de réalisation strictes, des manipulations fastidieuses et représentent un coût financier non négligeable. L'absence de standardisation n'en fait pas encore un examen de pratique courante.

CHAPITRE 3

ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES ENTEROCOQUES

La résistance aux antibiotiques chez les entérocoques peut être divisée en deux groupes : la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

3.1. Résistance intrinsèque :

Les entérocoques sont beaucoup plus résistants de façon intrinsèque envers les antimicrobiens que d'autres bactéries à Gram positif cliniquement importantes, mais la raison de cette observation est encore mal connue. Une des hypothèses est que cette résistance naturelle résulterait de leur besoin de survivre et de persister dans des écosystèmes, hautement compétitifs et potentiellement défavorables, tels que le tractus gastro-intestinal [37].

La résistance intrinsèque est due à des caractéristiques chromosomiques naturellement encodées par tous ou la plupart des entérocoques [134] [135].

Les entérocoques possèdent un bas niveau de résistance aux Aminosides dont le déterminisme s'explique par un mécanisme actif de transport défectueux lié à un défaut d'énergie oxydative au niveau de la paroi [136] [64] [137] [138] [139] [140] [141].

Ce bas niveau de résistance permet cependant une action synergique dans le traitement d'infections sévères à entérocoques avec la Pénicilline ou les Glycopeptides obtenue grâce à l'action préalable des Bêtalactamines ou des Glycopeptides sur la paroi [138] [142] [143] [140] [144] [141].

Les entérocoques présentent une résistance intrinsèque aux β -lactames [145] [135].

La résistance complète ou partielle aux Bêtalactamines, particulièrement les Céphalosporines et les Pénicillines Pénicillinase-résistantes, est une caractéristique du genre *Enterococcus*. Cette résistance aux Bêtalactamines est due à la présence chez les entérocoques d'une PLP, la PLP5, qui possède une faible affinité pour ces antibiotiques [146].

Les entérocoques démontrent aussi une résistance intrinsèque envers la Pristinamicine, les Sulfamides, et les Quinolones.

De plus, il est intéressant d'observer que les entérocoques sont résistants à des niveaux cliniques envers les Lincosamides que sont la Clindamycine et la Lincomycine. Par contre, il faut noter que ce n'est pas toutes les espèces d'*Enterococcus* qui ont des résistances intrinsèques (Exemple : *E. durans*).

L'espèce *E. faecalis* est décrite comme ayant une résistance naturelle aux Streptogramines A. Il semble que cette résistance, tant aux Lincosamides qu'aux Streptogramines A, serait due à la présence du gène *lsa* dont la séquence en acides aminés serait similaire à une protéine transmembranaire de type transporteur ABC à efflux actif [147].

Certaines espèces d'entérocoques, peu fréquentes en pathologie humaine, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*, qui sont des entérocoques mobiles, présentent un phénotype appelé Van C de résistance naturelle de bas niveau à la Vancomycine (Des CMI allant de 8 à 32 µg/ml) mais ayant une susceptibilité à la Tétracycline (CMI < 4 µg/ml) [37].

Ces trois espèces possèdent respectivement les gènes de résistance à la Vancomycine Van C₁, Van C₂ et Van C₃ qui codent pour des ligases sans doute impliquées dans la résistance. Cette particularité d'espèce est liée à la présence d'un opéron chromosomique (Ensemble fonctionnel de gènes) spécifique d'espèce, et responsable de la synthèse de précurseurs du peptidoglycane se terminant en D-alanine-D-sérine ayant une faible affinité pour la Vancomycine, au lieu de D-alanine-D-alanine, cible habituelle de la Vancomycine. L'importance clinique de cette résistance de bas niveau n'est pas connue. Cependant, dans un modèle d'endocardite aortique du lapin due à *E. gallinarum* (CMI de la Vancomycine=8 mg/l), la Vancomycine s'est montrée incapable de diminuer le nombre de bactéries des végétations cardiaques, alors qu'après inactivation du gène Van C₁, l'antibiotique devenait actif in vitro et in vivo contre la souche [148].

Il apparaît donc justifié de déceler au laboratoire cette moindre sensibilité à la Vancomycine et de la rapporter. Or, son identification est en défaut si l'on utilise la méthode d'antibiogramme par diffusion (Méthode des disques) [149]. C'est la détermination des CMI, peu souvent faite en routine, qui permet de la reconnaître. Ici encore, c'est d'abord l'identification de l'espèce qui va permettre de suspecter la moindre sensibilité à la Vancomycine.

Il ne faut toutefois pas oublier que de rares souches de *E.gallinarum* peuvent acquérir une résistance VanA ou VanB [150].

Le tableau suivant démontre bien les antimicrobiens dont la résistance intrinsèque est décrite dans le genre *Enterococcus* ainsi que leur mécanisme de résistance correspondant.

Tableau 3.1 : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques (Adapté de [151]).

Antimicrobiens	Mécanisme de résistance intrinsèque
Bêtalactamines	Surproduction de PBP de faible affinité et/ou diminution d'affinité pour la liaison des Bêtalactamines
Aminoglycosides	Membrane cellulaire imperméable, faible entrée, et manque d'une chaîne de transport d'électrons
Clindamycine et lincomycine (<i>E.faecalis</i>)	Faible entrée et faible perméabilité
Quinolones	Faible perméabilité, entrée réduite et environnement anaérobie
Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	Résistance in vivo par l'utilisation de folates exogènes
Streptogramines A (<i>E.faecalis</i>)	Entrée réduite par transporteur ABC
Glycopeptides (<i>E.gallinarum</i> et <i>E.casseliflavus</i>)	Présence d'une ligase D-Ala-D-Ser (Phénotype VanC)

3.2. Résistance acquise :

La résistance acquise est due à des mutations dans l'ADN chromosomique de la bactérie ou encore à l'acquisition de gènes de résistance portés sur des éléments mobiles (Plasmides ou transposons) [134] [135].

La forte tendance des entérocoques d'acquérir et d'exprimer de nouveaux déterminants de résistance améliore davantage leur habileté à supporter la pression sélective des antibiotiques, permettant ainsi de promouvoir la colonisation gastro-intestinale et déclencher des infections nosocomiales par ces entérocoques. En tant que résidents de la flore intestinale de l'homme et des animaux, les entérocoques sont en position d'acquérir des gènes de résistance provenant d'autres commensaux, qui peuvent être par la suite transférés à d'autres bactéries plus pathogènes [3].

La figure suivante illustre l'évolution de l'antibiorésistance chez les entérocoques au cours des 40 dernières années

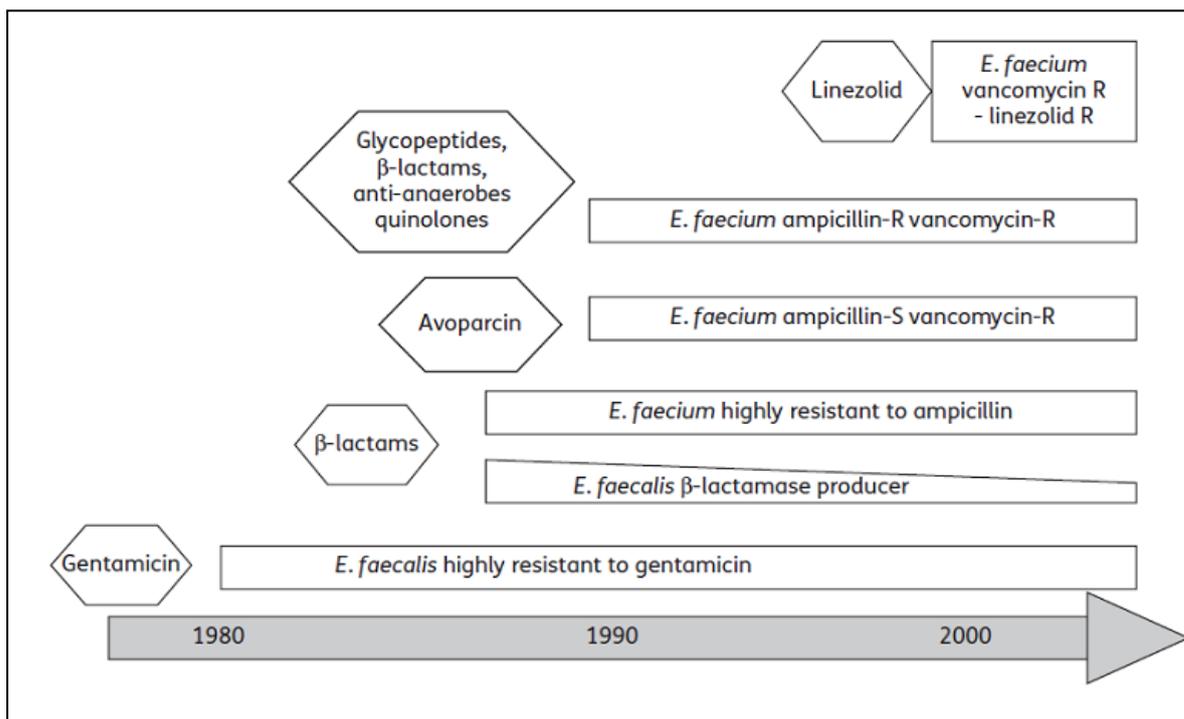


Figure 3.1 : Evolution de l'antibiorésistance chez les entérocoques au cours des 40 dernières années [152].

Le premier mécanisme de résistance décrit en 1970 a été la résistance de haut niveau aux Aminoglycosides, laquelle s'est rapidement répandue sur le globe dès le milieu des années 80. La production d'une enzyme inactivant l'antibiotique est responsable de la résistance et confère une résistance croisée à tous les Aminoglycosides sauf à la Streptomycine. La détection en laboratoire de ce type de résistance doit faire l'objet d'un dépistage particulier, car elle peut passer inaperçue avec les techniques usuelles de détection de sensibilité aux antibiotiques [149] [135].

Le second mécanisme de résistance des entérocoques est la résistance aux Pénicillines. Une résistance de haut niveau à l'Ampicilline est particulièrement associée à *E.faecium* et rarement à *E.faecalis*. Cette résistance attribuable à une modification ou à une surproduction des protéines liant la pénicilline au niveau de la membrane externe (Penicillin Binding Proteins ou PBP) rendant la bactérie résistante aux Pénicillines, aux combinaisons de Pénicilline-inhibiteur de β -lactamase et à l'Imipenème. Le niveau de résistance intrinsèque de *E.faecium* à l'ampicilline a progressivement augmenté. On a également noté la production de β -lactamase par *E.faecalis*. Même si des éclosions ont été rapportées aux États-Unis et ailleurs, ces souches de *E.faecalis* sont rarement isolées et demeurent sensibles aux combinaisons Pénicilline-inhibiteur de β -lactamase [153] [154] [155] [156] [157] [158] [134] [135].

Le troisième mécanisme rapporté de résistance aux antibiotiques pour l'entérocoque est la résistance aux Glycopeptides (Vancomycine, Téricoplanine). La résistance aux Glycopeptides a initialement été décrite en Europe en 1986, mais sans nécessairement impliquer des souches multirésistantes ou des patients hospitalisés. L'apparition de la résistance a été attribuée à l'utilisation de l'Avoparcine, un antibiotique utilisé en médecine vétérinaire comme facteur de croissance [159] [135]. L'entérocoque est la première bactérie connue à avoir acquis une résistance plasmidique transférable aux Glycopeptides. Il est difficile de connaître les raisons qui font que l'entérocoque a été le premier à développer ce type de résistance. Cependant, sa présence dans l'intestin des hommes et des animaux ainsi que l'utilisation croissante de Vancomycine per os chez les premiers pour le traitement d'entéocolites prouvées ou supposées à *Clostridium difficile* et d'un Glycopeptide, l'Avoparcine, comme promoteur de croissance chez les

animaux d'élevage, ont sans doute eu un rôle important dans la sélection des souches résistantes dans ces biotopes.

Neuf types de résistance aux Glycopeptides ont été décrits chez les entérocoques jusqu'à présent. Chaque type est associé avec différents éléments génétiques codant pour un précurseur de la paroi cellulaire de la bactérie ayant une affinité réduite pour la Vancomycine. Chaque type est caractérisé par un gène codant pour une ligase (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM et VanN). Trois de ces types sont rencontrés plus fréquemment : le phénotype VanA qui confère une résistance inductible élevée à la Vancomycine et à la Tétracycline, le phénotype VanB qui confère une résistance inductible de modérée à élevée à la Vancomycine seulement, et le phénotype VanC qui confère une résistance constitutive de bas niveau à la Vancomycine. Six autres phénotypes de résistance sont décrits pour les espèces pathogènes (Principalement *E.faecalis* et *E.faecium*), mais ne sont rencontrés que rarement, soit les phénotypes VanD, VanE, VanG, VanL, VanM et VanN [160] [161] [162] [163] [164] [135].

Le caractère transférable de la résistance aux Glycopeptides des entérocoques à d'autres bactéries à Gram positif comme *Listeria*, les streptocoques et surtout les *Staphylococcus aureus* a été démontré in vitro et constitue probablement la plus sérieuse menace présentée par cette résistance [165].

Devant l'émergence de souches résistantes aux Glycopeptides et en particulier de souches multirésistantes appartenant au complexe clonal CC17, des impasses thérapeutiques ont rapidement été rapportées dès les années 1990, nécessitant la synthèse de nouvelles molécules, efficaces contre ces souches. Ces molécules comme le Linézolide, la Daptomycine, la Quinupristine-Dalfopristine ou encore la Tigécycline ont été développées à cet égard. Cependant, de nouveau, des cas d'échecs thérapeutiques ou l'apparition de souches résistantes ont été rapidement rapportés dans la littérature [166] [167] [168] [169].

Les phénotypes de résistance aux Glycopeptides sont représentés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Les phénotypes de résistance aux Glycopeptides [170] [171].

Caractéristiques	Type				
	VAN A	VAN B	VAN C	VAN D	VAN E
Génétique	Acquis Haut niveau	Acquis Niveau variable	Naturel Bas niveau	Acquis Niveau moyen	Acquis
Cible modifiée	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser
Transférable	OUI	OUI	NON	NON	NON
CMI de Vanco (mg/L)	64-1000	04-100	02-32	16-64	16
CMI de Téico (mg/L)	16-512	0.5-1	0.5-1	2-4	0.5
Expression	Inductible (Constitutive)		Constitutive Inductible	Constitutive	Constitutive
Sensibilité à la Vanco	R	R	I-R	R	R
Sensibilité à la Téico	R	S	S	S	S
Espèces	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i> <i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> <i>E.avium</i>	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	<i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> <i>E.flavescens</i>	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice, Vanco : Vancomycine, Téico : Tétracycline, R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire.

Les entérocoques résistent également à d'autres familles d'antibiotiques ; ainsi ils ont acquis des facteurs de résistance aux Tétracyclines et Macrolides (50% des *E.faecalis* et 70% des *E.faecium* sont résistants à ces deux familles), au Chloramphénicol, aux Fluoroquinolones, aux Lincosamides,... [64] [137] [142] [144].

La figure suivante illustre bien les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre *Enterococcus*.

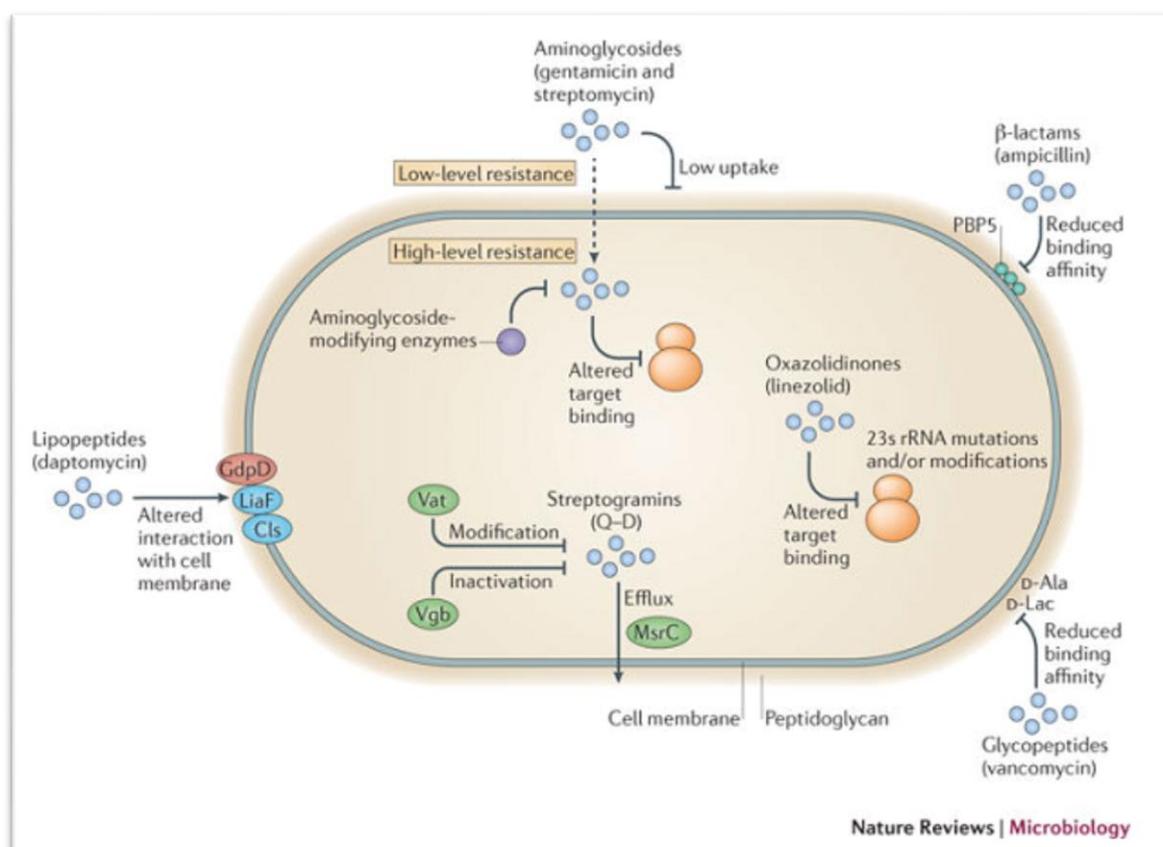


Figure 3.2 : Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre *Enterococcus* [47].

3.2.1. Résistance acquise d'*E.faecalis* d'origine aviaire :

Le tableau suivant démontre et résume les nombreux mécanismes de résistance ayant été acquis par *E.faecalis* chez la volaille jusqu'à ce jour, et ce, peu importe le pays d'origine.

Tableau 3.3 : Résistance observée chez les *E. faecalis* de la volaille [172] [173] [174] [175] [176] [177].

Classe antibiotique	Phénotype	Génotype	Mécanisme de résistance	Localisation
Aminoglycoside	Streptomycine, Kanamycine, Gentamicine, Spectinomycine,	aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(3')-IIIa, aadE, aadA, sat(4)	Modification enzymatique (Adényl-, phospho-, acétyltransférase)	Plasmide, intégron
Glycopeptide	Vancomycine, Avoparcine	vanA	Cible altérée (Peptidoglycan)	Transposon, plasmide
Macrolide	Tylosine, Erythromycine	erm(B), erm(A), erm(C), msrC, mef(A/E)	Cible altérée (Méthylation), pompe à efflux	Transposon, chromosome
Orthosomycine	Avilamycine, Evernimicine	emtA	Cible altérée (Méthylation ribosome)	Transposon, plasmide
Phénicol	Chloramphénicol	cat-pIP501, cat- pSBK, catA	Dégradation enzymatique (CAT)	Plasmide, chromosome
Polypeptide	Bacitracine	bcrRABD	Pompe à efflux, surproduction cible	Plasmide
Quinolone	Ciprofloxacin, Enrofloxacin	gyrA, parC, emeA	Cible altérée (ADN gyrase, topoisomérase IV), pompe à efflux	Chromosome
Tétracycline	Tétracycline	tet(L), tet(M), tet(O), tet(S), tet(W), tet(A)	Pompe à efflux, protection et cible altérée (Modification site liaison ribosome)	Plasmide, chromosome

3.2.2. Résistance acquise d'*E.faecium* d'origine aviaire :

Le tableau suivant démontre et résume les nombreux mécanismes de résistance ayant été acquis par *E.faecium* chez la volaille jusqu'à ce jour, et ce, peu importe le pays d'origine.

Tableau 3.4 : Résistance observée chez les *E.faecium* de la volaille [172] [178] [173] [175] [179] [177] [180].

Classe antibiotique	Phénotype	Génotype	Mécanisme de résistance	Localisation
Aminoglycoside	Streptomycine, Kanamycine, Tobramycine, Gentamicine, streptothricine, spectinomycine	aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aac(6'), aph(3')-IIIa, aadE, aadA, sat(4), aad9, aadB	Modification enzymatique (Adényl-, phospho-, acétyltransférase)	Plasmide
Bêta-lactamine	Pénicilline, Ampicilline	pbp5	Cible altérée (Mutation), surproduction	Chromosome
Glycopeptide	Vancomycine, Avoparcine	vanA, vanB	Cible altérée (Peptidoglycan)	Transposon, plasmide
Macrolide	Tylosine, Erythromycine	erm(B), erm(A), msrC, mef(A)	Cible altérée (Méthylation), pompe à efflux	Transposon, chromosome
Orthosomycine	Avilamycine, Evernimicine	emtA	Cible altérée (Méthylation ribosome)	Transposon, plasmide
Phénicole	Chloramphénicol	cat-pIP501, cat-pSBK, catA	Dégradation enzymatique (CAT)	Plasmide, chromosome
Polypeptide	Bacitracine	bcrRABD	Pompe à efflux, surproduction cible	Plasmide
Quinolone	Ciprofloxacine	gyrA, parC	Cible altérée (Mutation site liaison)	Chromosome
Streptogramine	Virginiamycine, Quinupristine-Dalfopristine	vat(D), vat(E), vat(G), vga(D), vat(H)	Dégradation enzymatique (Acétyltransférase), pompe à efflux	Plasmide
Tétracycline	Tétracycline, Oxytétracycline	tet(L), tet(M), tet(O), tet(S)	Pompe à efflux, cible altérée	Plasmide, chromosome

CHAPITRE 4

ETUDE EXPERIMENTALE

4.1. Problématique :

Les entérocoques sont des bactéries dangereuses de part leur multirésistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques, aggravée ces dernières années par l'émergence de souches résistantes aux Glycopeptides (ERG).

Cette résistance aux Glycopeptides est d'autant plus inquiétante qu'elle peut s'étendre à des germes Gram positif multirésistants comme *Staphylococcus aureus* qui, présentement sont efficacement traitées avec la Vancomycine.

Dans notre pays, l'isolement d'un ERG par le réseau d'Epidémiosurveillance (AARN), en matière de résistance des bactéries aux antibiotiques en médecine humaine, reste rare. Tandis qu'en médecine vétérinaire, nous n'avons pas trouvé de travaux sur l'antibiorésistance de ces germes d'origine animale en Algérie, lors de notre revue bibliographique sur les entérocoques.

Suite au manque de données sur ce sujet, nous avons jugé opportun de faire l'étude de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques d'origine aviaire.

4.2. Objectifs :

Les objectifs de ce projet sont les suivants :

- Récolter des informations sur les pratiques de l'antibiothérapie en élevage avicole (Molécules utilisées, circonstances de leurs utilisation, efficacité de ces molécules...).
- Evaluer le portage digestif des différentes espèces d'entérocoques chez la volaille, puis dans un second temps, étudier leurs résistances aux différentes familles d'antibiotiques.

Conformément à ces objectifs, notre étude expérimentale est divisée en deux parties, la première, enquête sur le terrain, par le biais d'un questionnaire auprès de vétérinaires praticiens, la seconde partie, isolement et identification des entérocoques ainsi que l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques.

4.3. Partie enquête par questionnaire:

Dans le monde entier, la prévalence élevée de la résistance aux antibiotiques suscite de plus en plus d'inquiétude. Il est généralement admis que le principal facteur de risque de cette augmentation de la résistance des bactéries pathogènes est l'utilisation accrue d'antibiotiques, ce qui a engendré plusieurs débats concernant leur utilisation chez les animaux de consommation [123] [181]. Toutefois, l'hypothèse, très répandue, qu'en l'absence de traitement antibiotique, la proportion de bactéries résistantes devrait tendre vers une valeur nulle est très restrictive. Une utilisation raisonnée des antibiotiques est nécessaire pour limiter l'antibiorésistance, mais les règles conçues en ce sens ne sont pas suffisantes pour mettre fin à l'existence de germes résistants. Cette disparition ne pourrait avoir lieu que si aucune autre molécule ne sélectionne de co-résistance et si le gène de résistance n'est pas associé avec des éléments génétiques susceptibles d'aider à son maintien [182]. De plus, il a été démontré que malgré l'absence de pression de sélection par des antibiotiques, la résistance, et même la multirésistance, pouvait continuer à se développer, se maintenir et se disséminer chez les microorganismes.

De ce fait, nous avons jugé utile de mener une enquête de terrain auprès des vétérinaires praticiens à titre privé assurant des suivis d'élevage avicoles, afin de récolter des informations concernant l'utilisation des antibiotiques dans le contrôle du statut sanitaire en élevages avicoles, et apprécier l'importance des échecs thérapeutiques rencontrés en pratique courante.

4.3.1. Matériel et méthodes :

4.3.1.1. Population ciblée :

La population ciblée par l'enquête est constituée de vétérinaires praticiens qui font au moins un suivi sanitaire d'élevage avicole. L'enquête a été menée auprès de vétérinaires qui exercent à titre privé au niveau de la wilaya de Tizi Ouzou.

4.3.1.2. Méthode d'échantillonnage :

Notre enquête n'a pas touché l'ensemble de vétérinaires praticiens mentionnés ci-dessus, mais seulement un échantillon de cette population.

Ce type d'enquête dite par sondage a pour but de rendre l'enquête réalisable en réduisant ses coûts ainsi que sa durée. Néanmoins, cet échantillon doit être représentatif et suffisamment précis pour pouvoir extrapoler les résultats obtenus sur l'ensemble de la population ciblée.

Le facteur conditionnant la représentativité de l'échantillon est le tirage au sort. Celui-ci peut se faire de différentes manières : grâce à une table de nombres au hasard ou à la fonction nombres au hasard d'un logiciel. Cela nécessite d'avoir une base de sondage : liste exhaustive des vétérinaires praticiens de la wilaya d'étude (Base de sondage fournie par la DSA de Tizi Ouzou). Quant à la précision, elle est conditionnée par la taille de l'échantillon.

Pour pouvoir déterminer la taille de notre échantillon, nous avons besoin de connaître la taille de la population. Celle-ci est recensée en 2019 à 201 vétérinaires praticiens, (Source : DSA Tizi Ouzou, 2019).

La formule pour calculer la taille d'échantillon pour des populations infinies est [183]:

$$n = z^2 \times p (1 - p) / m^2$$

n = taille de l'échantillon.

z = niveau de confiance selon la loi normale centrée réduite (Pour un niveau de confiance de 95%, $z = 1.96$).

p = proportion estimée de la population qui présente la caractéristique (Lorsque inconnue, on utilise $p = 0.5$ ce qui correspond au cas le plus défavorable c'est-à-dire la dispersion la plus grande). **m** = marge d'erreur tolérée (5%).

Pour une population finie il faut encore ajuster:

$$\text{Taille de l'échantillon} = (n) / 1 + [(n - 1) / \text{population}]$$

Donc :

$$\text{Taille de l'échantillon} = \frac{(z^2 \times p(1-p) / m^2)}{1 + [(z^2 \times p(1-p) / m^2) - 1] / N}$$

N = taille de la population.

Donc la taille de l'échantillon à étudier est :

$$\text{Taille de l'échantillon} = \frac{(1.96)^2 \times (0,5) (1-0,5) / (0.05)^2}{1 + [((1.96)^2 \times (0,5) (1-0,5) / (0.05)^2) - 1] / 201}$$

Taille de l'échantillon = 133 vétérinaires praticiens.

4.3.1.3. Elaboration du questionnaire :

La démarche générale de conception d'un questionnaire comporte les trois étapes mentionnées sur la figure 4.1 et détaillé dans le tableau 4.1.



Figure 4.1 : Représentation schématique de la démarche générale de préparation d'un questionnaire [184].

Tableau 4.1 : Tableau récapitulatif des différentes étapes d'élaboration de notre questionnaire (Appendice B).

Objectifs de l'enquête	Données à recueillir	Les questions du questionnaire
1. Profil des vétérinaires.	<ul style="list-style-type: none"> - Type de la clientèle. - Type de spéculation 	<ul style="list-style-type: none"> 1. Quelle est l'importance de l'activité avicole dans votre clientèle ? 2. Quel est le type de spéculation suivi ?
2. Avoir des informations sur l'utilisation des antibiotiques	<ul style="list-style-type: none"> - Circonstances d'utilisation des antibiotiques. - Causes d'arrêt d'utilisation des antibiotiques. - Conduite en cas de persistance des symptômes. 	<ul style="list-style-type: none"> 3. Les ATB sont utilisés ? 4. L'utilisation des ATB est arrêtée lors? 5. En cas de persistance des symptômes, quelle a été votre conduite ?
3. Recours au diagnostic du laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Moment d'orientation au laboratoire - Fiabilité de l'antibiogramme 	<ul style="list-style-type: none"> 6. A quel moment vous faites appel au diagnostic de laboratoire ? 7. L'antibiogramme a-t-il répondu à vos attentes ? 8. Si la réponse est Non, qu'elle a été votre conduite ?
4. Avoir des informations sur l'antibiothérapie et les échecs thérapeutiques	<ul style="list-style-type: none"> - Antibiotiques utilisés en thérapie - Fréquence des échecs thérapeutiques - Suspensions causes 	<ul style="list-style-type: none"> 9. Quelles sont les molécules préconisées selon les manifestations cliniques dominantes ? 10. Quelle est la fréquence des échecs thérapeutiques rencontrés? 11. Quelles sont d'après vous les causes de ces échecs thérapeutiques?

Nous avons choisi le face à face comme mode d'obtention des réponses à notre questionnaire (Questionnaire mixte) pour éviter le non retour du questionnaire et les non réponses à certaines questions.

Afin de vérifier la compréhensibilité des questions et d'identifier ce qui doit être amélioré, nous avons procédé à l'épreuve de testage sur un nombre restreint de vétérinaires : nous avons testé le questionnaire à deux reprises avec 10 vétérinaires praticiens dans la région d'étude.

Quant à la distribution et la récolte des questionnaires, elle s'est faite par 07 enquêteurs : vétérinaires exerçant au niveau des subdivisions agricoles. Ces enquêteurs ont été préalablement formés pour cette enquête (Séance explicative), afin de diminuer surtout la variabilité inter-observateurs.

4.3.1.4. Traitement des données et analyse statistique:

Notre enquête sur le terrain auprès des vétérinaires a donné lieu à une quantité importante d'informations qui ont été codifiées puis saisies dans un fichier Excel (Excel 2007) pour pouvoir les exploiter plus facilement.

La précision des résultats sur l'ensemble de la population est accompagnée par le calcul des intervalles de confiance (IC).

Le calcul de l'intervalle de confiance d'une proportion observée implique tout d'abord de fixer le risque d'erreur α que l'on accepte de voir la véritable valeur se situer en dehors de l'intervalle de confiance.

Très souvent, ce risque est fixé à 5%. Il s'agit alors d'un intervalle de confiance à 95% , ce qui signifie que la véritable valeur p a 95% de chances de se situer dans l'intervalle de confiance ainsi calculé et 5% de risques d'être en dehors de cet intervalle.

L'intervalle de confiance (IC) à 95% est : $p \pm 2\sigma$. Avec σ : écart-type.

La formule permettant de calculer l'écart-type pour un taux de sondage supérieur à 10% est la suivante :

$$\sigma = \sqrt{\left(1 - \frac{n}{N}\right) \frac{pq}{n}} \quad \text{lorsque } \frac{n}{N} > 10 \text{ p. cent}$$

N : la population (201).

p : proportion (0 à 1)

q : complément à 1 de la proportion

n : nombre d'unités dans l'échantillon (134).

Condition d'application : $np > 5$ et $nq > 5$.

Les pourcentages n'ayant pas remplis cette condition ne sont pas accompagnés d'un intervalle de confiance.

4.3.2. Résultats et discussion :

Le testage du questionnaire nous a permis l'amélioration de la première version. Toute suggestion de modification de fond ou de forme était soigneusement étudiée et, si jugée fondée, utilisée pour améliorer le questionnaire. En effet, nous avons reformulé certaines questions, ajouté quelques unes et annulé certaines jugées inutiles.

L'enquête a été effectuée auprès de 134 vétérinaires praticiens sur les 140 contactés. On a enregistré donc six cas seulement de refus de participation.

Les résultats des questionnaires auprès des vétérinaires sont en Appendice C.

Cet échantillon de 134 vétérinaires praticiens (Sur une population totale de 201 vétérinaires) ainsi que son mode de sélection (Tirage au sort), est considéré comme un échantillon représentatif de la population étudiée.

Les résultats obtenus sont très précis et peuvent être extrapolés sur l'ensemble des vétérinaires praticiens au niveau de la région d'étude.

4.3.2.1. Nature et importance de l'aviculture dans l'activité des vétérinaires interrogés :

- L'importance de l'activité avicole des vétérinaires enquêtés :

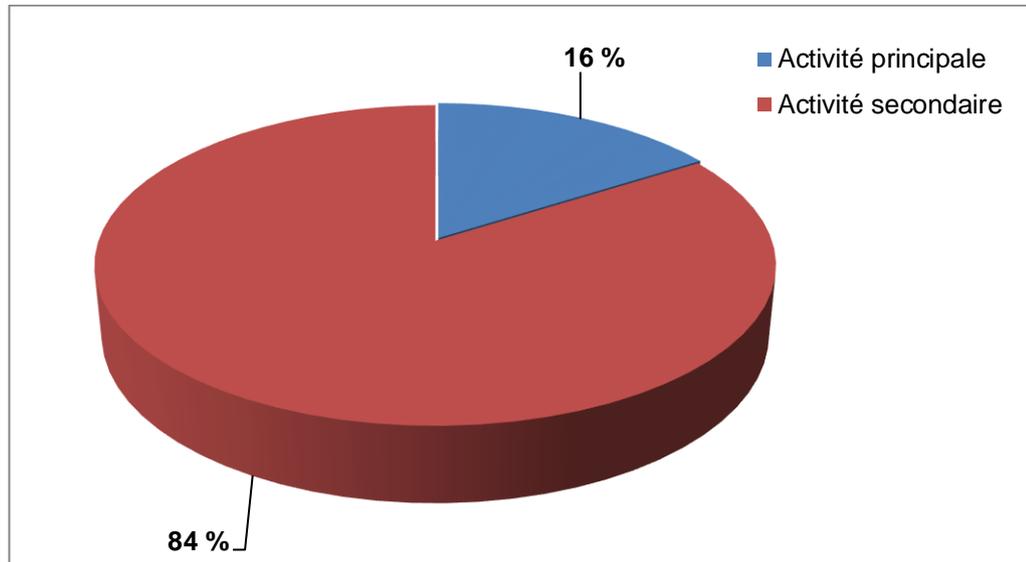


Figure 4.2 : L'importance de l'activité avicole chez les vétérinaires praticiens questionnés.

Les résultats obtenus à travers notre enquête montrent que la majorité des vétérinaires praticiens questionnés ($84 \pm 3\%$), ont l'aviculture comme activité secondaire, et $16 \pm 3\%$ seulement l'ont comme activité principale, cela peut s'expliquer par l'effet région, où prédomine la pratique rurale.

- Type de spéculation suivi :

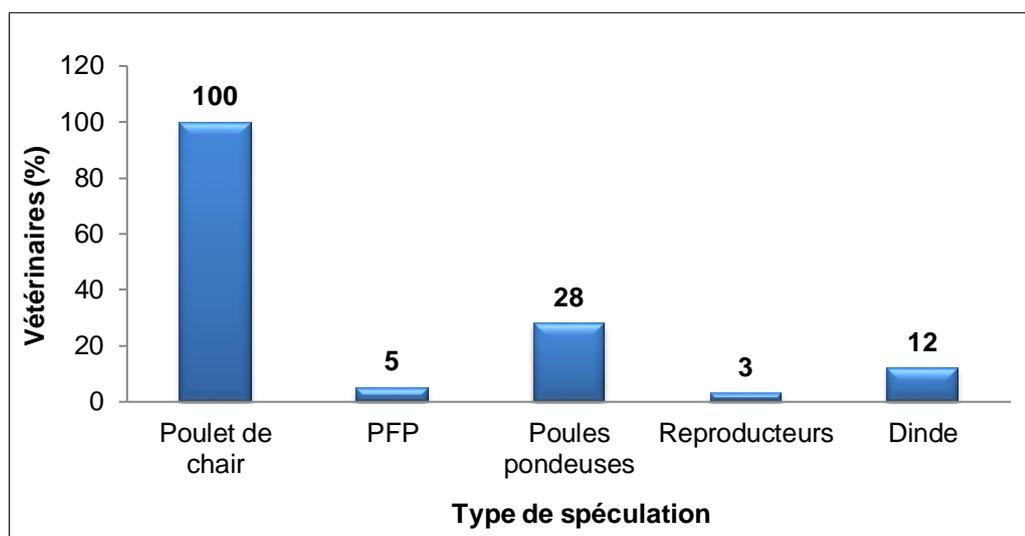


Figure 4.3: Type de spéculation suivie par les vétérinaires praticiens questionnés.

Les résultats obtenus font ressortir que tous les vétérinaires praticiens questionnés assurent des suivis d'élevages de Poulet de Chair (100%), 28±4% des vétérinaires suivent l'élevage de Poules Pondeuses, 12±3% des vétérinaires suivent l'élevage de la Dinde, 5±2% suivent l'élevage de Poulette Future Pondeuse (PFP) et seulement 3% suivent l'élevage des Reproducteurs.

L'élevage de Poulet de Chair est le plus répandu par rapport aux autres types de spéculations. Cette dominance peut s'expliquer par :

- Type d'élevage nécessitant moins d'investissement ;
- La durée du cycle biologique qui est relativement courte (49-56 jours) ;
- Apport en protéines animales de qualité et de moindre coût ;
- Disponibilité et facilité d'approvisionnement en facteurs de production ;
- Etant la plus anciennement introduite en Algérie d'une manière intensive (1974-1977), la conduite d'élevage du Poulet de Chair est, en quelque sorte, maîtrisée par les éleveurs [185].

4.3.2.2. Informations sur l'utilisation des antibiotiques (ATB) :

- Circonstances d'utilisation des antibiotiques :

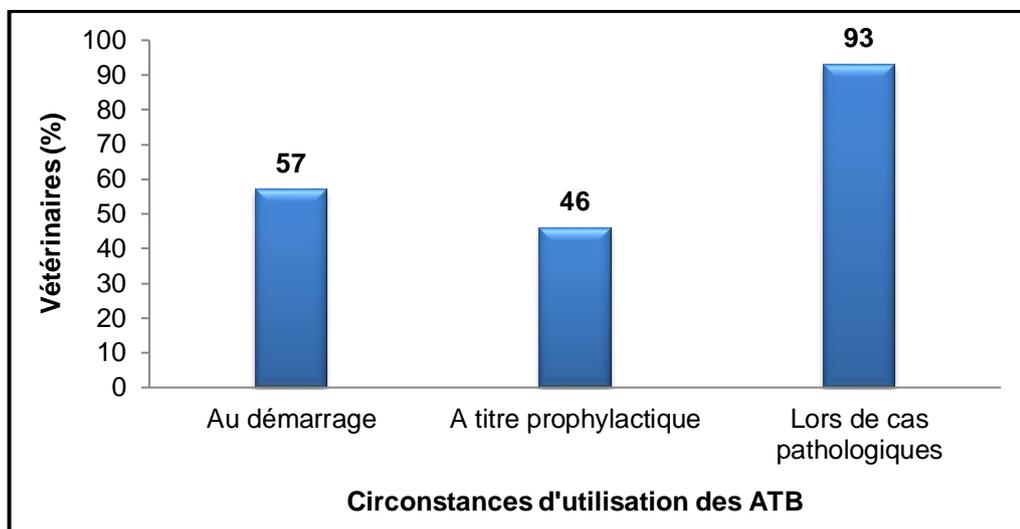


Figure 4.4 : Circonstance d'utilisation des antibiotiques.

L'utilisation des antibiotiques à titre thérapeutique intervient dans $93\pm 2\%$. Cependant, $57\pm 4\%$ des vétérinaires praticiens, utilisent les antibiotiques au démarrage. Cette utilisation systématique d'antimicrobiens comme promoteur de croissance chez les animaux, constitue un grave problème de santé publique, en particulier dans le cas où les mêmes classes d'antimicrobiens sont utilisées chez l'homme.

Aussi, $46\pm 4\%$ des vétérinaires questionnés, utilisent les antibiotiques à titre prophylactique.

L'utilisation non thérapeutique des antibiotiques chez les animaux de consommation semble augmenter le réservoir de gènes de résistance, ainsi que leur densité, puisque les bactéries se disséminent en grand nombre dans l'environnement.

- Les causes d'arrêt de l'utilisation des ATB :

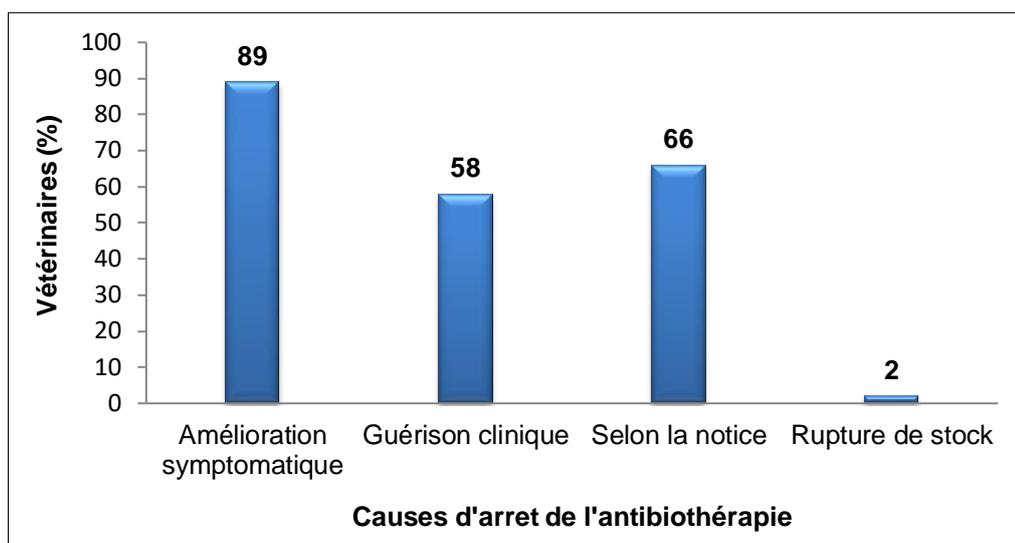


Figure 4.5 : Les différentes causes d'arrêt d'utilisation des ATB.

Les résultats montrent que dans la majorité des cas, les vétérinaires ne respectent pas la durée de l'antibiothérapie, ils ont tendance à arrêter l'antibiothérapie suite à l'amélioration symptomatique dans $89\pm 3\%$ des cas, ou bien après guérison clinique dans $58\pm 4\%$ des cas. Leurs motifs étaient pour accélérer l'élimination des antibiotiques, éviter la toxicité, et du coup diminuer le coût.

Par contre, dans $66\pm 4\%$ des cas, les vétérinaires respectent les règles d'application des médicaments (La durée du traitement).

Enfin, quelques vétérinaires (2% seulement) arrêtent le traitement avec la molécule en question suite à une rupture de stock.

- Conduite à tenir en cas de persistance des symptômes :

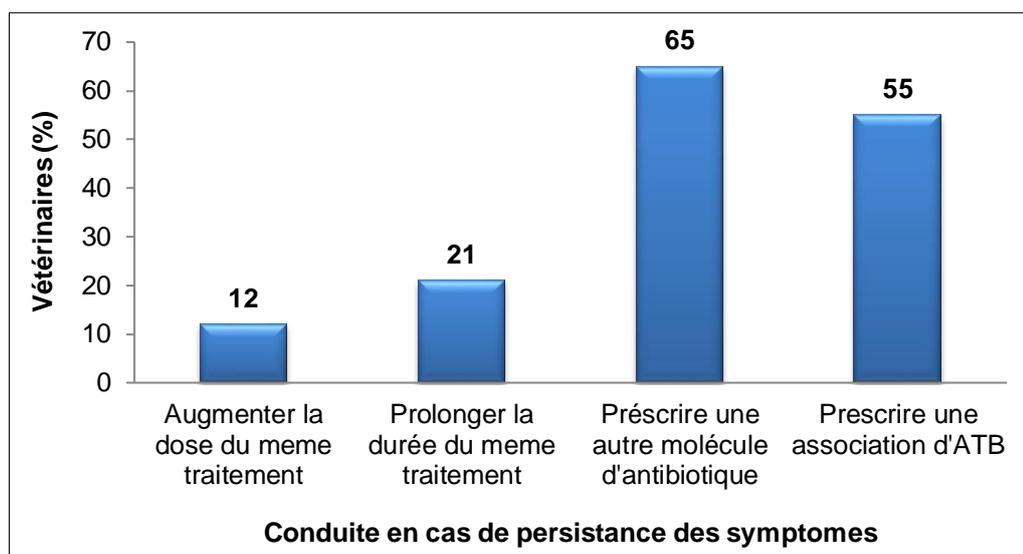


Figure 4.6 : La conduite tenue par les vétérinaires praticiens questionnés en cas de persistance des symptômes.

Les résultats de notre enquête montrent que dans plus que la moitié des cas, les vétérinaires praticiens questionnés réagissent à la persistance des symptômes par la prescription d'une autre molécule antibiotique ($65\pm 4\%$), ou bien une association d'antibiotique ($55\pm 4\%$), dans le but d'élargir le spectre d'activité. Mais cette démarche n'est pas sans conséquence, elle serait au dépend de l'augmentation de la pression de sélection en faveur des souches multirésistantes. Cependant, dans certaines situations, les vétérinaires ont choisi de continuer avec le même traitement, soit en augmentant la dose dans $12\pm 3\%$ des cas, ou bien ils ont prolongé la durée du traitement dans $21\pm 4\%$ des cas.

4.3.2.3. Recours au diagnostic de laboratoire :

- Moment d'orientation au laboratoire :

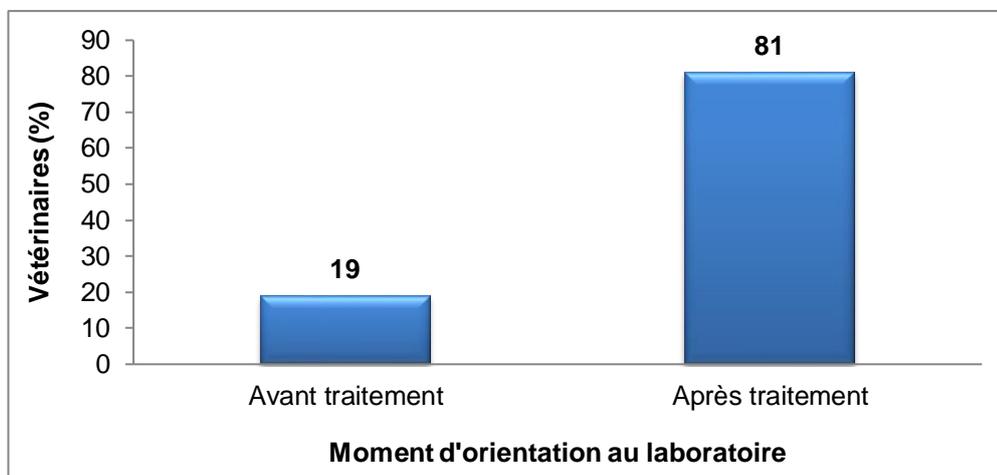


Figure 4.7 : Le recours au diagnostic de laboratoire.

D'après nos résultats, la majorité des vétérinaires, ne font appel au laboratoire qu'après un échec thérapeutique ($81 \pm 3\%$).

Le non recours au diagnostic du laboratoire malgré la présence d'un laboratoire vétérinaire étatique au niveau de la wilaya, pourrait s'expliquer par la réponse non rapide de ce dernier, pour fournir l'antibiogramme aux vétérinaires demandeurs (La technique standardisée prend 72 heures au minimum).

Aussi, la non-association du laboratoire à la démarche diagnostique pourrait être due à la crainte des éleveurs de la mise en évidence par le laboratoire d'agents responsables de maladies légalement réputées contagieuses, et qui impliquent la mise en place de mesures, qui sont le plus souvent drastiques : élimination de tout le cheptel, avec un taux d'indemnisation dérisoire.

- Efficacité de l'antibiogramme :

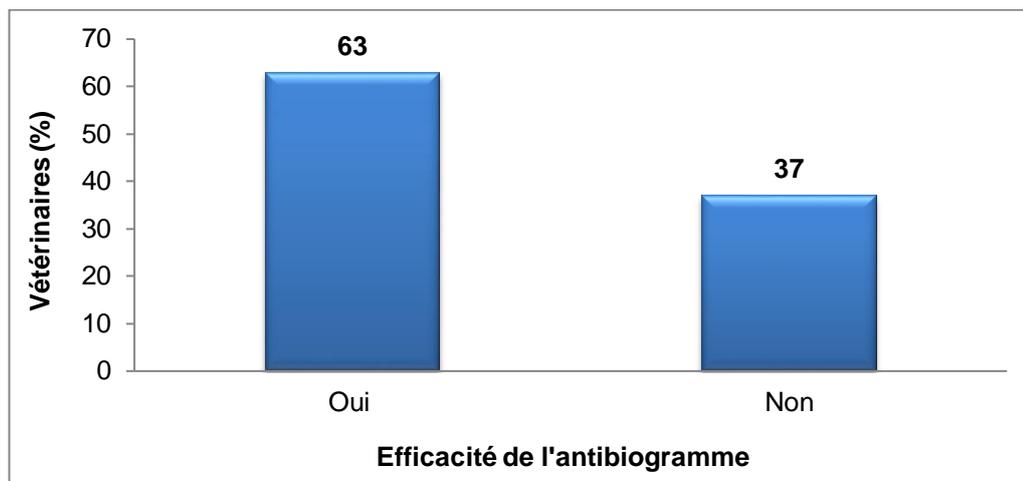


Figure 4.8 : Efficacité de l'antibiogramme.

63±4% des vétérinaires disent être satisfait de l'antibiogramme, alors que 37±4% des vétérinaires disent que l'antibiogramme n'a pas répondu à leurs attentes. Cela pourrait être dû à la qualité du prélèvement : prélèvement mal réalisé, ou bien réalisé après instauration d'un traitement probabiliste, et dans ce cas là les résultats de l'antibiogramme ne seront pas fiables. Aussi, ça pourrait être dû à une biodisponibilité insuffisante de la molécule in vivo.

- Conduite à tenir en cas de l'inefficacité de l'antibiogramme :

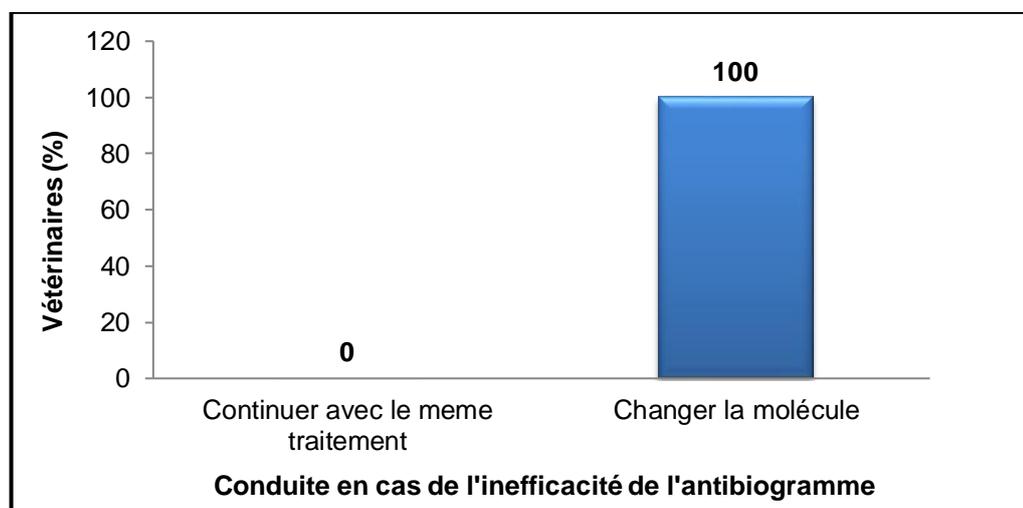


Figure 4.9 : Conduite à tenir en cas de l'inefficacité de l'antibiogramme.

Dans le cas de l'inefficacité de l'antibiogramme, tous les vétérinaires enquêtés disent avoir changé de molécule, au lieu de refaire un autre prélèvement pour le laboratoire !!!

4.3.2.4. Informations sur l'antibiothérapie et les échecs thérapeutiques :

- Molécules antibiotiques prescrites à titre curatif lors d'affections respiratoires et digestives:

Selon les expressions cliniques dominantes, respiratoires ou digestives, le panel d'antibiotiques utilisé est illustré dans les figures 4.10 et 4.11 respectivement.

- Lors de pathologies à expressions cliniques respiratoires :

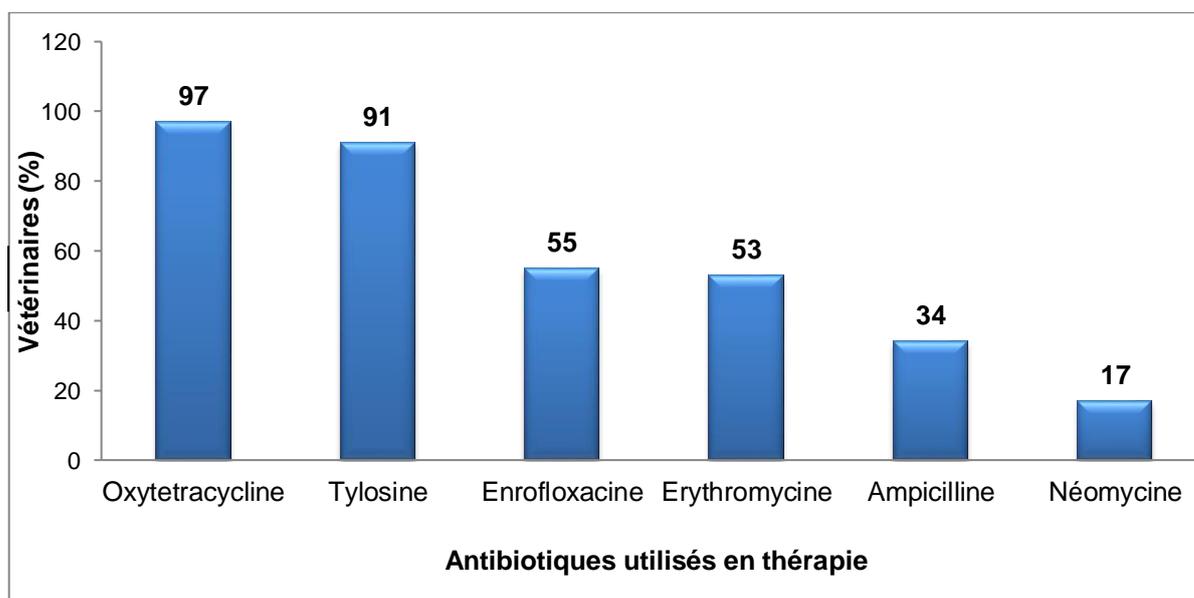


Figure 4.10 : Les antibiotiques prescrits lors d'affections respiratoires.

Pour la prescription des antibiotiques lors d'affection respiratoire, les médecins vétérinaires préfèrent la prescription des Tétracyclines (Oxytétracycline à 97%). L'Oxytétracycline est caractérisée par une excellente fixation tissulaire et

est souvent indiquée dans les Maladies Respiratoires Chroniques, Stress, Sinusite, Synovite, Choléra [186] [187].

L'intérêt des Tétracyclines réside dans leur large spectre d'activité : bactéries à Gram positif et Gram négatif, mycoplasmes [188]. Toutefois, selon RICHARD et collaborateurs [189], l'emploi systématique d'antibiotiques à large spectre est dangereux : l'usage aveugle de ces molécules a, en général, pour résultat de perturber ou de détruire les barrières écologiques et de sélection des souches résistantes.

Après les Tétracyclines, l'autre famille d'antibiotiques la plus utilisée est la famille des Macrolides (Essentiellement la Tylosine à $91\pm 2\%$ et l'Erythromycine à $53\pm 4\%$). Antibiotiques bactériostatiques, à spectre étroit surtout dirigé vis-à-vis des bactéries à Gram positif, des mycoplasmes, et pour certains composés vis-à-vis des Pasteurelles [190], les Macrolides sont en aviculture synonyme de traitement de la Maladie Respiratoire Chronique [186].

Les vétérinaires questionnés ont aussi prescrit des Quinolones lors d'affections respiratoires (Enrofloxacin à $55\pm 4\%$).

Aussi l'Ampicilline et la Néomycine ont été prescrites à $34\pm 4\%$ et $17\pm 3\%$ respectivement.

➤ Lors de pathologies à expressions cliniques digestives :

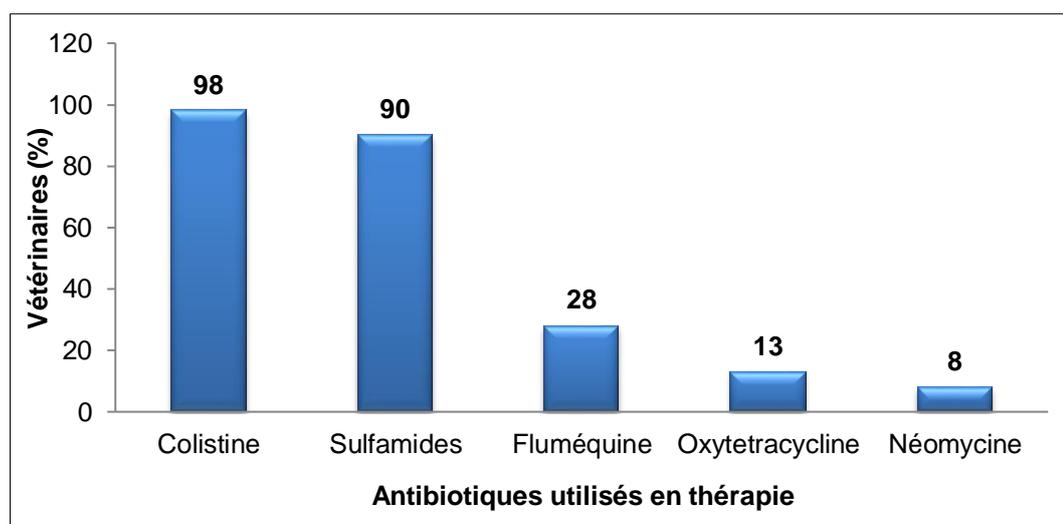


Figure 4.11 : Les antibiotiques prescrits lors d'affections digestives.

Ces résultats montrent que les répondants ont prescrit les Polypeptides et les Sulfamides en première intention vis-à-vis des affections digestives (98% et 90±2% respectivement).

La Colistine est un Polypeptide bactéricide actif surtout contre les bactéries à Gram négatif et principalement contre les salmonelles, les colibacilles et les *Pseudomonas*. Etant non absorbée pratiquement, son action par voie orale est limitée aux pathologies infectieuses du tube digestif [187].

Quant aux Sulfamides, c'est des antibactériens doués de propriétés bactériostatiques à spectre relativement large (Bactéries, protozoaires, champignons) ont été et sont encore très utilisés en pathologie aviaire dans deux indications : anti-infectieux et anticoccidiens [186] [187].

L'association Triméthoprime-Sulfamide confère un effet antibactérien supérieur par la double action séquentielle des composants. Cet effet, fortement synergique vis à vis de la plupart des bactéries, s'étend même aux souches résistantes à l'un des deux produits (*Escherichia coli* ayant une résistance acquise aux Sulfamides) [187].

D'autres molécules antibiotiques sont également utilisées : Fluméquine à 28±4%, Oxytétracycline à 13±3%, et Néomycine à 08±2%.

- Fréquence des échecs thérapeutiques :

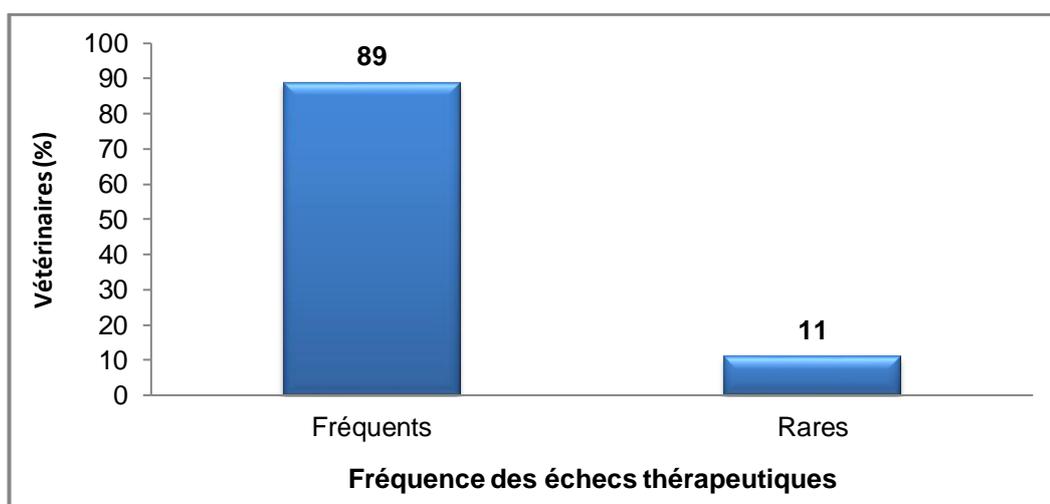


Figure 4.12 : La fréquence d'échecs thérapeutiques rencontrés.

D'après les résultats obtenus, près de 90% des vétérinaires questionnés affirment que les cas d'échecs thérapeutiques sont souvent rencontrés sur le terrain ($89\pm 3\%$).

Ce résultat est proche de celui obtenu par MESSAI en 2006 [191], où il a rapporté un taux de 97% d'échecs thérapeutiques dans son enquête sur les pratiques de l'antibiothérapie en élevage avicole, dans 11 Wilayas, dont la plupart situées à l'est du pays.

- Les causes de ces échecs thérapeutiques :

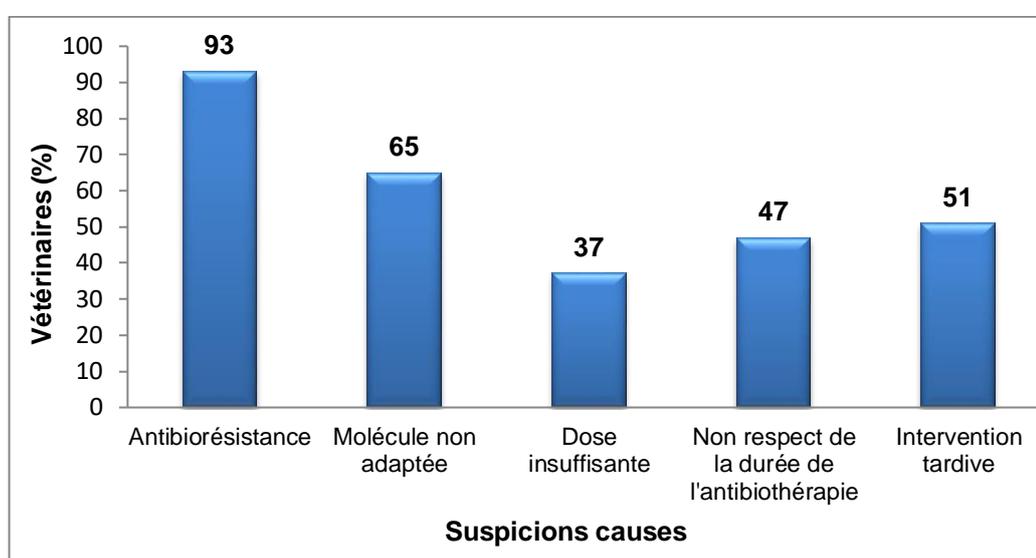


Figure 4.13 : Les causes des échecs thérapeutiques.

Selon notre enquête, l'antibiorésistance est incriminée dans $93\pm 2\%$ des cas d'échecs thérapeutiques. Selon SANDERS [192], la résistance acquise aux antibiotiques est une source importante d'échecs thérapeutiques en médecine humaine comme en médecine vétérinaire.

D'autres facteurs peuvent être incriminés aussi :

- Un diagnostic erroné.
- Une mise en œuvre incorrecte de l'antibiothérapie (Dosage non respecté, instabilité du médicament, insolubilité du médicament, prise insuffisante du médicament) [193].

- Molécule non adaptée (Spectre ou propriétés pharmacocinétiques), d'après nos résultats, la molécule non adaptée est incriminée dans $65\pm 4\%$ des cas des échecs thérapeutiques.
- Intervention tardive, selon les vétérinaires questionnés, dans $51\pm 4\%$ des cas, l'intervention tardive constitue aussi l'une des causes des échecs thérapeutiques.

Frapper vite, fort et longtemps est un slogan de l'antibiothérapie qui est toujours d'actualité [194].

4.3.3. Conclusion :

Les résultats de l'enquête par questionnaire montrent bien que les échecs thérapeutiques sont très fréquents et que l'antibiorésistance est la cause la plus suspectée.

Ce problème des résistances bactériennes aux médicaments antimicrobiens a fait l'objet d'un intérêt scientifique accru, car ces résistances sont potentiellement transmissibles à l'homme via l'alimentation ou par contact avec des bactéries résistantes ou via les mécanismes de transfert entre bactéries.

Un bon usage des antibiotiques est donc indispensable afin de limiter la sélection de bactéries résistantes, de préserver l'efficacité du médicament antibiotique, mais aussi de limiter la présence de résidus médicamenteux dans les denrées alimentaires d'origine animale.

4.4. Partie isolement bactériologique :

L'objectif de cette partie consiste en premier temps, à évaluer le portage digestif des différentes espèces d'entérocoques chez la volaille. Puis étudier leurs sensibilités aux différentes familles d'antibiotiques.

4.4.1. Matériel et méthodes :

4.4.1.1. Techniques de prélèvement :

4.4.1.1.1 Echantillonnage :

Le contenu caecal des oiseaux était recueilli au niveau de quatre abattoirs de volailles (Un abattoir étatique de Tabouqert « ORAC » et trois autres relevant du secteur privé), tous situés dans la wilaya de Tizi Ouzou, durant la période allant de Juillet 2017 à Juin 2018.

Seulement une seule bande par site d'élevage est prélevée durant notre étude. Une bande est définie comme un groupe d'oiseaux issus du même éclosier, élevés dans un poulailler au cours de la même période de temps.

Dans chaque bande prélevée, 30 caeca sont sélectionnés d'une manière aléatoire, et trois lots contenant les caeca de 10 oiseaux sont créés.

La fréquence de visite des abattoirs est d'une visite toute les 04 semaines, et deux bandes sont sélectionnées d'une manière aléatoire pour échantillonnage si le nombre le permettait.

4.4.1.1.2 Protocole de Prélèvement :

Après éviscération, les caeca des oiseaux sélectionnés ont été placés dans des sacs plastiques stériles et conservés dans une glacière pour un maximum de 08 heures avant la mise en culture.

4.4.1.2. Techniques de l'examen bactériologique :

4.4.1.2.1. Méthodes d'isolement et purification:

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

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

L'isolement des bactéries s'est fait sur deux milieux, un milieu chromogène CHROMagar Orientation (Becton Dickinson), et sur un milieu sélectif BEA (IPA). Le CHROMagar Orientation est un milieu électif servant à l'isolement, à l'identification directe. Le mélange chromogène se compose des substrats artificiels (Chromogènes), qui libèrent des composés de diverses couleurs lors de la dégradation causée par des enzymes microbiennes spécifiques, ce qui permet de différencier directement certaines espèces et de détecter certains groupes de microorganismes avec un nombre limité de tests de confirmation. Quant au BEA, c'est un milieu destiné à l'isolement sélectif des streptocoques du groupe D et des entérocoques qui tolèrent la bile et hydrolysent l'esculine en glucose et esculéitine. Cette dernière donne une coloration noire avec le citrate de fer. La sélection se fait grâce à la bile qui est un inhibiteur des bactéries autres qu'intestinales, et l'azide de sodium qui inhibe les bactéries à Gram négatif.

L'inoculum est ensemencé en surface des géloses selon la méthode des quadrants, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

Les entérocoques donnent de petites colonies de couleur Blue-Vert sur le CHROMagar Orientation, et de petites colonies translucides entourées d'un halo noir sur le BEA.

Les colonies suspectes sont ensuite réensemencées à l'aide d'une pipette Pasteur selon la méthode des quatre quadrants sur la gélose Columbia (Oxoid) de telle manière à obtenir des colonies bien isolées en culture pure.

4.4.1.2.2. Identification :

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

Les tests effectués sont les suivant :

- **Coloration de Gram :**

Permet de diviser les bactéries en 02 groupes : Gram positif (Celles qui retiennent le violet de gentiane après le lavage à l'alcool), et Gram négatif (Celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant).

- Technique :

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

- Test de Catalase :

La catalase est une enzyme qui détruit les peroxydes toxiques pour les bactéries. Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau avec libération d'O₂, selon la réaction suivante :



- Technique :

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

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

- Test d'Hémolyse :

Le test d'hémolyse s'effectue sur gélose au sang (Gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton frais « Figure 4.14 »), sur laquelle les colonies d'entérocoques apparaissent translucides de 1-2 mm de diamètre.

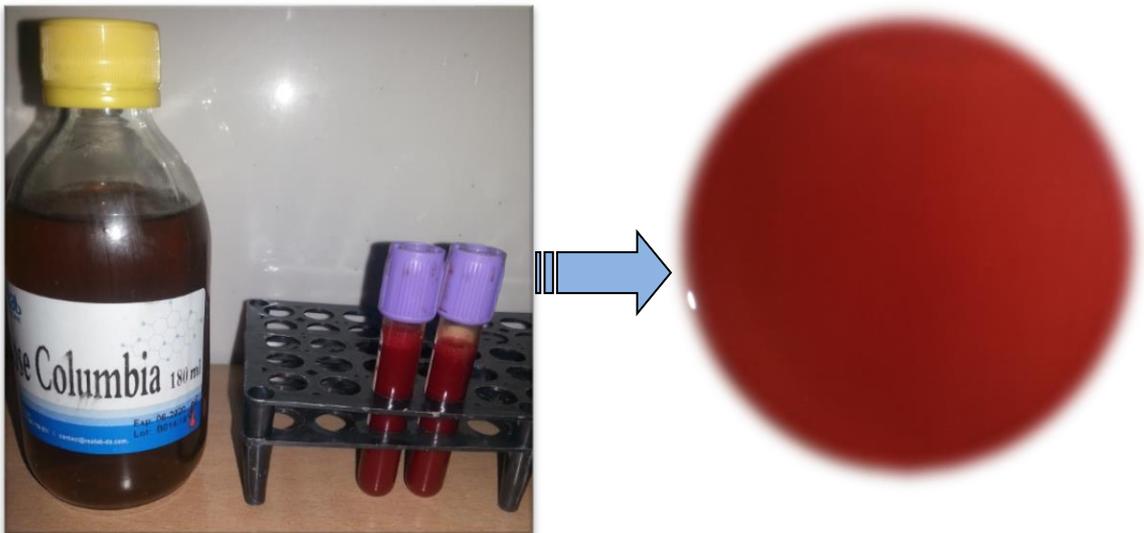


Figure 4.14 : Préparation de la gélose Columbia additionnée de sang de mouton frais à 5% [Photo personnelle].

Ce test est très important dans l'identification ainsi que la classification des entérocoques; il présente « 3 types » d'hémolyses :

- Hémolyse α : Résulte d'hémolyse partielle des hématies au tour des colonies qui leur reflètent une couleur verdâtre.
- Hémolyse β : Résulte de l'hémolyse complète des hématies et qui s'interprète par une zone claire autour des colonies.
- Hémolyse γ (Absence d'hémolyse): Dans ce troisième cas il ya pas d'hémolyse; où la gélose au sang reste totalement rouge.

- Test au Tellurite de Potassium

Test effectué pour l'identification de l'espèce *E.faecalis*. En effet, en plus de propriétés de résistance aux milieux hostiles, propres aux entérocoques, *E.faecalis* possède un pouvoir réducteur très marqué: il est capable de réduire le Tellurite de Potassium, qui constitue souvent une substance inhibitrice pour les autres espèces [34].

Un volume de 4,5 ml de bouillon nutritif est additionné de 0,5ml de Tellurite de Potassium préalablement dilué à 1/250 (01ml de Tellurite de Potassium est dilué dans 249 ml d'eau distillée).

- Réalisation de galeries biochimiques standardisées :

L'identification des autres espèces a été assurée par les tests biochimiques des galeries : «api[®] 20 Strep » et « rapid ID 32 STREP » de bioMérieux.

- Principe de la Galerie api:

C'est un système standardisé associant 20 tests biochimiques pour api[®] 20 Strep et 32 tests biochimiques pour rapid ID 32 STREP, qui présente un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic du groupe ou d'espèce pour la plupart des entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants [196] [197].

La galerie api[®] 20 Strep comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentations de sucre (Figure 4.15).

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

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

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

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



Figure 4.15 : Système d'identification : api® 20 Strep [Photo personnelle].

➤ Préparation de l'inoculum :

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

➤ Inoculation de la galerie :

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

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

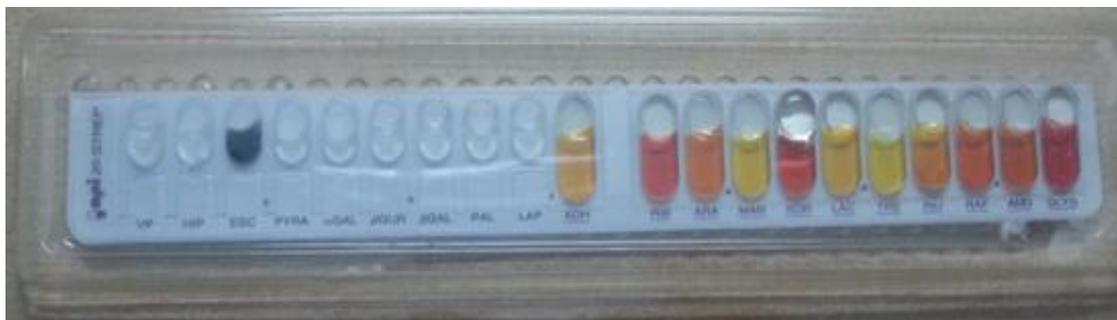


Figure 4.16 : Inoculation de la Galerie api® 20 Strep [Photo personnelle].

➤ Lecture de la galerie :

Après 04 heures d'incubation les boîtes sont retirées de l'étuve et les réactifs suivants sont ajoutés :

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

La lecture est faite 10 minutes après l'ajout des réactifs; quelque fois il est nécessaire d'utiliser une lampe forte (1000W) pour décolorer l'excès de réactif de PYRA à LAP. Et une deuxième lecture est effectuée après 24 heures d'incubation.

➤ Identification :

L'identification de l'espèce est obtenue avec le logiciel APIWEB de bioMérieux, en entrant le profil numérique à 07 chiffres inscrit sur la fiche de résultat (Figure 4.17).

Figure 4.17 : Fiche de résultat de la galerie api® 20 Strep [196].

4.4.1.2.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées:

Le test de Kirby-Bauer ou test de diffusion sur milieu gélosé, est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. La sensibilité aux antibiotiques est déterminée selon les recommandations de CLSI 2017 [198].

➤ Principe :

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité du germe identifié vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques. Pour les entérocoques, les antibiotiques testés ainsi que la charge du disque (Oxoid) sont représentés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.2: Liste des antibiotiques testés.

Familles Antibiotiques	Antibiotiques	Charge du disque
B lactamines	Pénicilline	10 UI
	Ampicilline	10 µg
Aminosides	Gentamycine*	120 µg
	Streptomycine*	300 µg
Tétracyclines	Tétracyclines	30 µg
Macrolides	Erythromycine	15 µg
Nitrofuranes	Nitrofurantoiné	300 µg
Phénicolés	Chloramphénicol	30 µg
Fluoroquinolones 2 ^{ème} génération	Ciprofloxacine	05 µg
Glycopeptides	Vancomycine	30 µg

* : Disque hautement chargé

➤ Technique :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur le milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland.

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en tournant) sur la paroi du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée (Mueller Hinton « IPA »), de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte à 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Il ne faut pas mettre plus de 06 disques d'antibiotique sur une boîte de pétri de 90 mm de diamètre, les disques d'antibiotique doivent être espacés de 24 mm (Voir figure 4.18).
- Les boîtes de Pétri seront ensuite disposées sur la paillasse pendant 30 minutes pour une pré diffusion des antibiotiques. L'incubation est faite à 35°C pendant 16 à 24 heures à l'étuve.



Figure 4.18: Antibiogramme d'une souche d'entérocoque sur milieu gélosé [Photo personnelle].

➤ Lecture de l'antibiogramme :

Elle est effectuée à l'aide d'un pied à coulisse qui mesure les diamètres des zones d'inhibition. Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture correspondante (Voir annexe F).

Les bactéries sont classées dans les catégories : sensible, intermédiaire ou résistant.

4.4.1.2.4 Conservation des souches :

Les souches d'entérocoques isolées, identifiées et testées pour leur sensibilité aux antibiotiques sont conservées à court et à long terme :

➤ Conservation à court terme :

Les souches ont été ensemencées sur gélose nutritive dans des tubes à essais et incubées 24 heures à 37°C ; ensuite, conserver au réfrigérateur à +4°C.

Cette méthode de conservation ne doit pas dépasser 03 mois au réfrigérateur.

➤ Conservation à long terme :

- Remplir des tubes à Eppendorf avec 1ml de bouillon BHIB.
- Stériliser à l'autoclave.
- Ensemencer, ensuite, la souche pure sur tubes à Eppendorf.
- Incuber 24 heures à 37°C.
- Ajouter 01ml de glycérol à 20% stérile directement sur le tube à Eppendorf.
- Passer au vortex plusieurs fois afin de bien homogénéiser la composition.
- Conserver au congélateur à (-70°C).

4.4.1.2.5. Contrôle de qualité :

Les contrôles de qualité ont été effectués à plusieurs niveaux :

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

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

4.4.1.3. Analyse statistique :

L'analyse statistique visant à comparer la performance microbiologique des deux milieux d'isolement utilisés, à savoir, le milieu BEA et le milieu chromogène (CHROMagar Orientation), ainsi que la prévalence du portage digestif des différentes espèces d'entérocoques est effectuée à l'aide du test Khi-Deux.

L'analyse statistique visant à comparer les antibiorésistances observées chez les espèces *E.faecalis* et *E.faecium* est effectuée à l'aide du test Exact de Fisher.

4.4.2. Résultats :

4.4.2.1. Identifications de souches *Enterococcus spp* :

Au total, 99 bandes ont été échantillonnées et 297 lots contenant les caeca des volailles ont été réalisés.

Sur les 297 prélèvements analysés pour la recherche des entérocoques, 278 se sont révélés positifs, soit un taux de positivité de 93.6%.

L'isolement des entérocoques sur gélose sélective BEA a été effectué sur 156 lots, et la présence des germes en question a été confirmée dans 137 lots, représentant 87.82% des échantillons.

L'isolement sur le milieu BEA montre des petites colonies translucides entourées d'un halo noir (Figure 4.19).

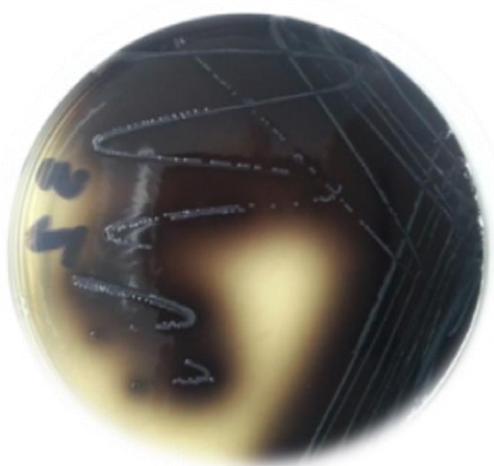


Figure 4.19: Aspect des colonies d'entérocoques sur milieu sélectif BEA [Photos personnelle].

Quant à l'isolement sur gélose chromogène, le CHROMagar Orientation, les entérocoques donnent de petites colonies de couleur Blue-Vert (Figure 4.20). La présence des entérocoques a été confirmée dans tous les lots analysés (141 lots), soit un taux de positivité de 100%.

L'analyse statistique visant à comparer la performance microbiologique de ce milieu chromogène à celle du BEA, a révélé une différence très significative ($P < 0.0001$).

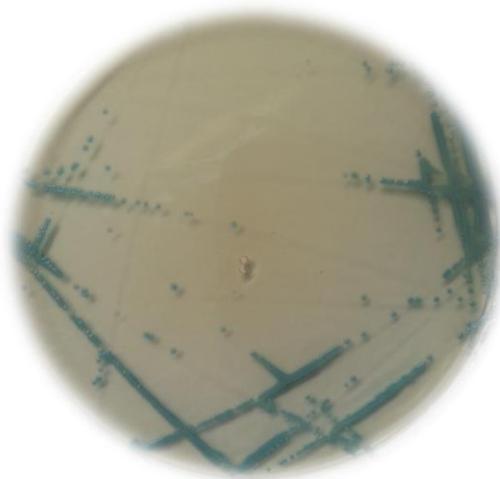


Figure 4.20 : Aspect des colonies d'entérocoques sur le milieu CHROMagar Orientation [Photo personnelle].

L'identification des souches isolées sur le milieu BEA et le milieu CHROMagar Orientation a été faite sur la base de leur aspect microscopique après Coloration de Gram (Figure 4.21) et le Test de Catalase (Figure 4.22).

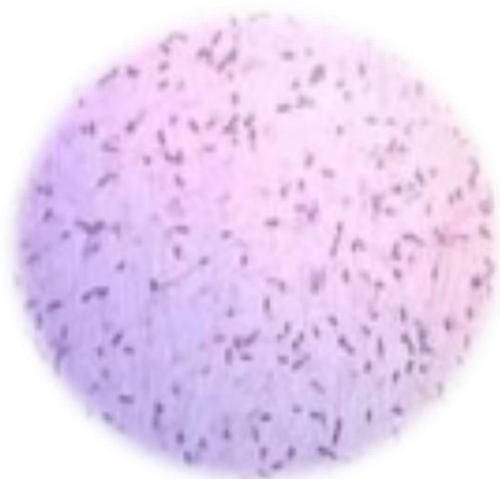


Figure 4.21 : Aspect des entérocoques sous un microscope optique après Coloration de Gram « Gram positif » (Grossissement X1000).

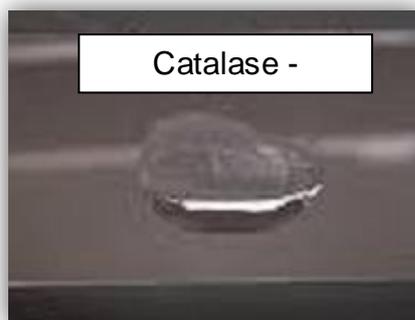


Figure 4.22 : Résultat du Test de Catalase [Photo personnelle].

Le test d'hémolyse effectué sur gélose au sang frais (Gélose Columbia additionnée de sang de mouton frais à 5%), à permis d'avoir les 03 types d'hémolyses, à savoir : hémolyse α (Figure 4.23), hémolyse β (Figure 4.24) et hémolyse γ (Figure 4.25), dont la majorité des souches étaient « γ hémolytique » avec 81%, et 12% des souches de types « α hémolytique », et 7% des souches ont présenté une hémolyse de type « β »



Figure 4.23 : Résultat test hémolyse α .

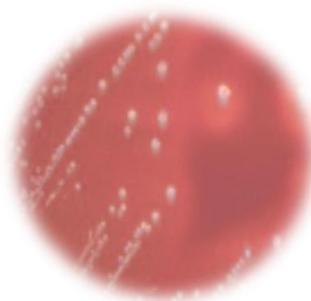


Figure 4.24 : Résultat test hémolyse β .

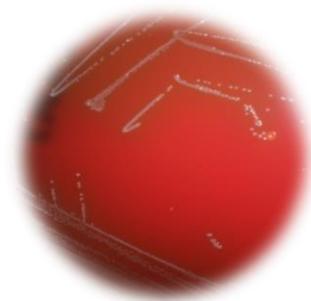


Figure 4.25 : Résultat test hémolyse γ .

[Photos personnelles].

L'espèce la plus communément identifiée est *E.faecalis* avec un taux de 63,30% (Réduction de la tellurite de potassium, voir figure 4.26), suivie d'*E.faecium* avec un taux de 33,10% (Identifiée avec la galerie api 20 Strep, voir figure 4.27). L'analyse statistique a révélée une différence très significative quant à la prévalence de ces deux espèces chez la volaille ($P < 0.0001$).

Les espèces *E.cecorum* et *E.hirae* identifiées à l'aide de galerie ID 32 STREP (bioMérieux) avec des taux de 02,16% et 01,44% respectivement.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.3 et la figure 4.28.



Figure 4.26 : Réduction de la Tellurite de Potassium par l'espèce *E. faecalis* [Photo personnelle].



Figure 4.27 : Galerie api® 20 Strep après 24 heures d'incubation [Photo personnelle].

Tableau 4.3 : Distribution des souches d'entérocoques isolées selon le type de spéculation.

Type de spéculation	Nombre d'élevage	Nombre de lot	Souches isolées				Total
			<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.cecorum</i>	<i>E.hirae</i>	
Poulet de chair	89	267	163	84	-	04	251
Reproducteurs chair	01	03	-	03	-	-	03
Dinde	07	21	10	05	04	-	19
Poule pondeuse	02	06	03	-	02	-	05
Total	99	297	176	92	06	04	278

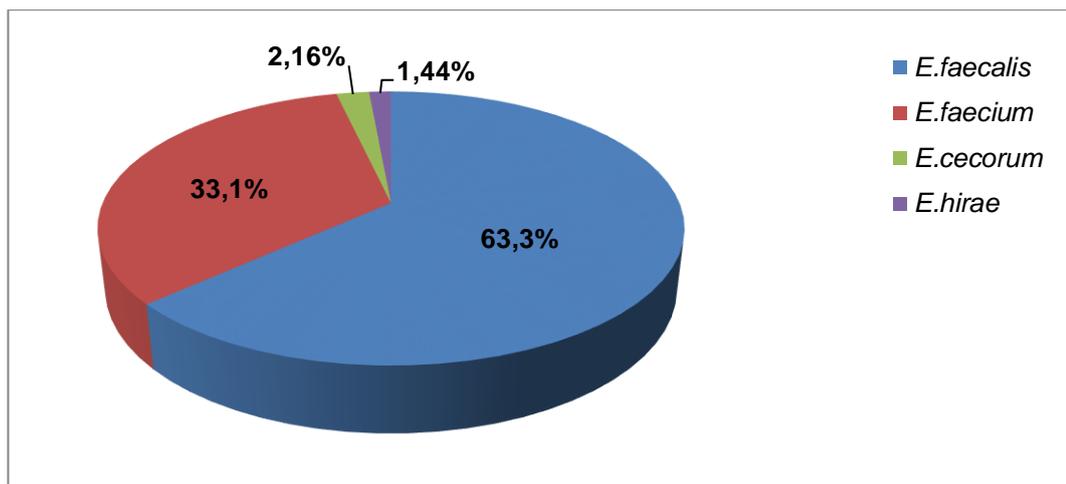


Figure 4.28 : Fréquence du portage digestif des entérocoques chez la volaille.

4.4.2.2. Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches isolées :

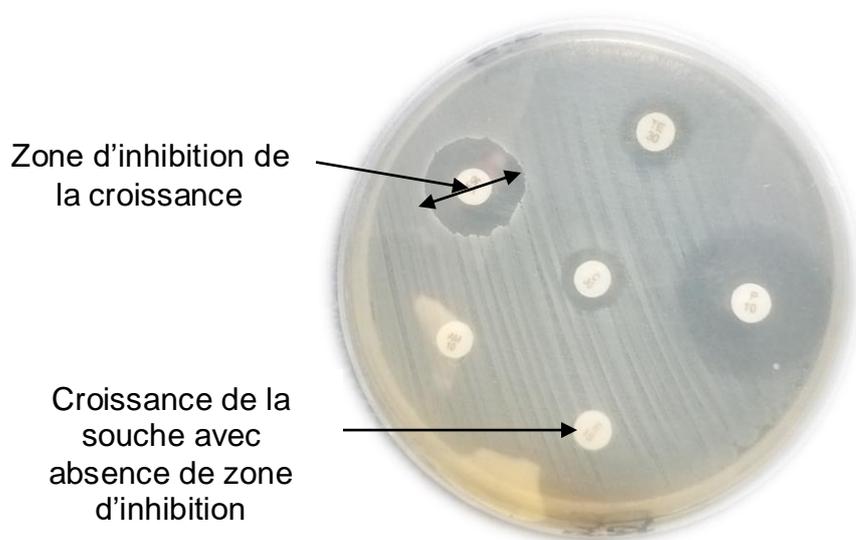


Figure 4.29 : Antibiogramme d'une souche d'entérocoque après 18 heures d'incubation à 35°C [Photo personnelle].

Sur les 278 souches d'entérocoques isolées, nous avons étudié leur sensibilité aux différents antibiotiques et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.30 et le tableau 4.4.

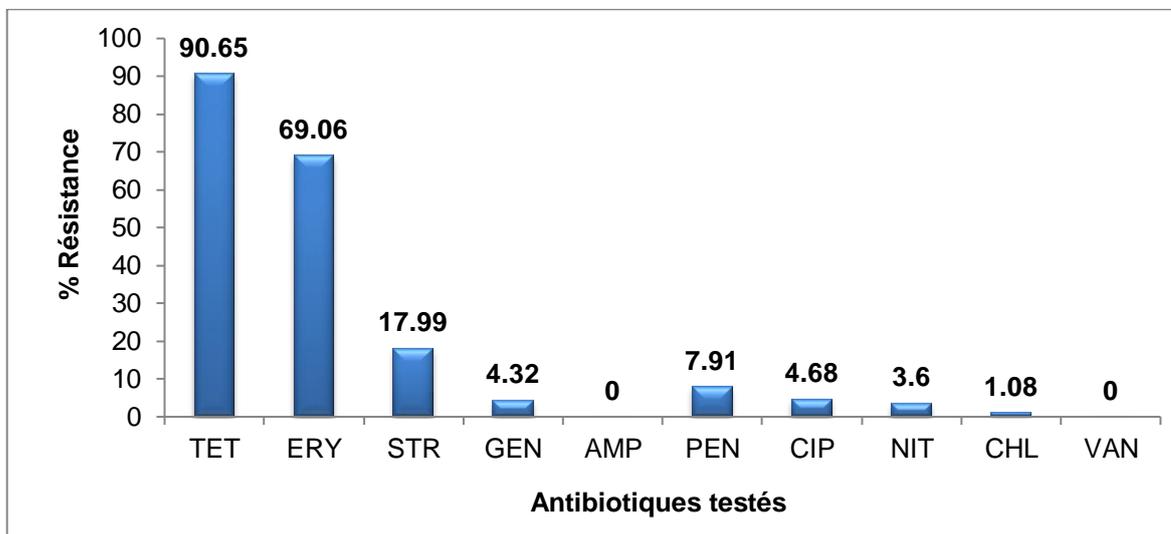


Figure 4.30 : Représentation graphique des pourcentages de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques isolées chez la volaille.

Seulement 03.24% des entérocoques étaient sensibles à tous les antimicrobiens testés.

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

Toutes les souches étaient sensibles à l'Ampicilline.

La plupart des isolats étaient résistants à la Tétracycline (90.65%) et à l'Erythromycine (69.06%). Résistance antimicrobienne faible à intermédiaire à la Nitrofurantoïne (03.60%), Gentamycine (04.32%), Ciprofloxacine (04.68%), Pénicilline (07.91%) et à la Streptomycine (17.99%). Trois isolats ont exprimé un phénotype de résistance au Chloramphenicol (01.08%).

Tableau 4.4 : Pourcentages (%) de résistance aux antibiotiques des souches d'Entérocoques isolées chez la volaille.

ATB	Poulet de chair (n= 251)			Reproducteurs chair (n= 03)	Dinde (n= 19)			Poule Pondeuse (n= 05)		Total (n= 278)
	<i>E.faecalis</i> (n= 163)	<i>E.faecium</i> (n= 84)	<i>E .hirae</i> (n= 04)	<i>E.faecium</i> (n= 03)	<i>E.faecalis</i> (n= 10)	<i>E.faecium</i> (n= 05)	<i>E.cecorum</i> (n= 04)	<i>E.faecalis</i> (n= 03)	<i>E.cecorum</i> (n= 02)	
TET	150	72	03	03	10	05	04	03	02	252 (90.65%)
ERY	112	61	01	03	08	05	01	01	-	192 (69.06%)
STR	20	15	-	03	06	05	-	01	-	50 (17.99%)
GEN	07	04	-	-	-	-	-	01	-	12 (04.32%)
AMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEN	-	12	-	03	02	05	-	-	-	22 (07.91%)
CIP	-	05	-	03	02	03	-	-	-	13 (04.68%)
NIT	04	05	-	-	01	-	-	-	-	10 (03.60%)
CHL	-	-	-	-	03	-	-	-	-	03 (01.08%)
VAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TET : Tétracycline, ERY: Erythromycine, GEN : Gentamicine, STR : Streptomycine, AMP : Ampicilline, PEN : Pénicilline, VAN : Vancomycine, CIP: Ciprofloxacin, CHL: Chloramphénicol, NIT : Nitrofurantoin.

Comparée à *E.faecalis*, les isolats de *E.faecium* étaient significativement plus résistants (Valeurs de *P* des comparaisons suivantes étaient < 0.001) à la Pénicilline (1% versus 22%) et à la Ciprofloxacine (1% versus 12%). Aussi, il y'avait une différence significative ($P < 0.05$) pour la résistance à de haut niveau de Streptomycine (15% versus 25%) (Figure 4.31).

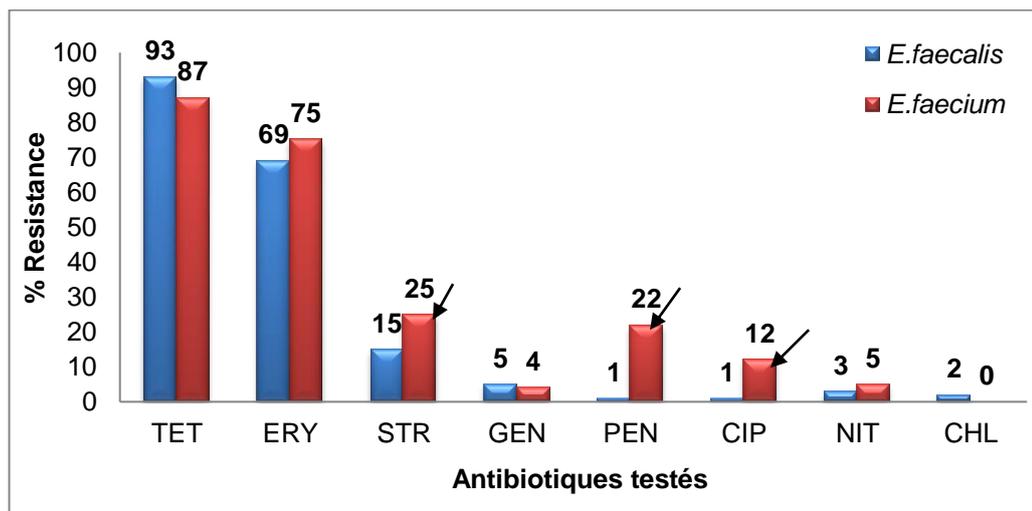


Figure 4.31: Comparaison de l'antibiorésistance observée chez *E.faecalis* (n=176) et *E.faecium* (n=92).

La multirésistance (Résistance à 03 antibiotiques ou plus) [199] [200] est considérée comme une menace réelle.

20.14% des souches isolées présentaient des multirésistances, dont 08.27% des souches étaient résistantes à trois antibiotiques, 06.83% étaient résistantes à quatre antibiotiques, 03.96% étaient résistantes à cinq antibiotiques et 01.08% des souches étaient résistantes à six antibiotiques.

Les résultats sont représentés dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5: Souches d'entérocoques présentant une multirésistance aux antibiotiques.

Nombre d'antibiotiques	Nombre de souches n=278	Taux (%)
03	23	08.27
04	19	06.83
05	11	03.96
06	03	01.08
Total	56	20.14

Un total de 13 profils de multirésistance aux antibiotiques ont été obtenus dans notre étude et sont rapportés dans le tableau 4.6.

Les isolats d'*E.faecium* avaient plus de profils phénotypiques de multirésistance (11 profils différents) qu'*E.faecalis* (08 profils).

Aussi, les isolats d'*E.faecalis* avaient plus de souches multirésistantes (32 souches) qu'*E.faecium* (24 souches), mais la différence n'est pas significative.

Le profil de multirésistance le plus rencontrés était TET ERY STR chez 16 souches d'*E.faecalis*.

Tableau 4.6 : Profil phénotypique de la multirésistance observée chez *E.faecalis* et *E.faecium*.

Espèce	Profil phénotypique des multirésistances	Total des isolats
<i>E.faecalis</i>	TET ERY STR	16
	TET ERY GEN	02
	TET ERY NIT	03
	TET ERY NIT STR	02
	TET ERY GEN STR	06
	TET ERY STR CIP	01
	TET ERY STR PEN	01
	TET ERY STR PEN CIP	01
<i>E.faecium</i>	TET ERY STR	01
	TET ERY PEN	01
	TET PEN STR GEN	02
	TET ERY NIT STR	02
	TET ERY GEN STR	01
	TET ERY STR PEN	03
	TET ERY STR CIP	01
	TET ERY NIT PEN STR	02
	TET ERY NIT PEN GEN	01
	TET ERY STR PEN CIP	07
	TET ERY STR PEN CIP CHL	03

4.4.3. Discussion :

Sur le milieu BEA, 87.82% des échantillons étaient positifs à la recherche des entérocoques, alors que le milieu chromogène CHROMagar Orientation a permis l'isolement des entérocoques sur tous les échantillons analysés (100%). Les caractéristiques de couleur et de morphologie des colonies d'entérocoques sur le CHROMagar Orientation ont permis de les différencier facilement des autres germes présents dans l'échantillon.

E.faecalis est l'espèce prédominante avec 63.3% des isolats, récupérée à partir d'échantillons de Poulet de Chair, de Poule Pondeuse, des Reproducteurs

Chair et de la Dinde, conformément à certains rapports, où *E.faecalis* a été signalée comme étant l'espèce la plus répandue [32] [201] [199] [202] [203], mais en contraste avec d'autres, indiquant qu'*E.faecium* est l'espèce d'entérocoque la plus fréquente isolée de la volaille [1] [204] [205]. Aussi, une étude menée au Nigeria [206], a montré qu'*E.faecium* était l'espèce prédominante (49%) dans les fèces de poulet. Un résultat similaire a également été observé par ALI *et al.* [207] et ÜNAL *et al.* [208], avec une prévalence de 66% et 33.6%, respectivement. Ces différences de prédominance peuvent être attribuées à des divergences géographiques ou aux méthodes d'échantillonnage et d'isolement [209] [210]. Ces deux espèces représentaient une proportion importante (96.4%) des isolats d'entérocoques de la volaille dans cette étude.

Les données sur la résistance phénotypique aux antimicrobiens ont révélé qu'un grand nombre d'isolats d'*E.faecalis* et d'*E.faecium* étaient résistants à différentes classes d'antimicrobiens, et qu'*E.faecium* était plus résistant qu'*E.faecalis* pour certaines classes d'antimicrobiens, ce résultat est similaire à celui obtenu par TREMBLAY *et al.* [151].

E.faecium est rapportée être généralement plus résistant que *E.faecalis* [211] [212]. En effet, il a été démontré par différentes études qu'à la fin des années 90, environ 2% des souches de *E.faecalis* étaient résistantes à la Vancomycine alors que 80% des souches de *E.faecium* étaient résistantes à l'Ampicilline et 50% résistantes à la Vancomycine [213] [11]. Quant en Europe, les infections à *E.faecium* résistants à l'Ampicilline passait de 2% dans le milieu des années 90 à 35% au milieu des années 2000 et jusqu'à 70% dans certaines études [214] [134] [215].

La résistance aux antibiotiques la plus observée était celle aux Tétracyclines et aux Macrolides. Ces antibiotiques sont fréquemment utilisés pour le traitement et la prévention chez les volailles, étant relativement bon marché et efficaces contre une grande variété de micro-organismes [216]. Ainsi, un taux élevé de résistance a été enregistré aux médicaments de ces classes d'antimicrobiens.

La co-résistance peut contribuer à des niveaux élevés de résistance à la Tétracycline et à l'Erythromycine. Selon CHOPRA et ROBERTS [217], Les plasmides et/ou les transposons conjugatifs peuvent également porter à la fois les déterminants de la résistance à la Tétracycline et à l'Erythromycine, et les deux résistances peuvent être maintenues avec n'importe lequel de ces agents.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que toutes les souches isolées étaient sensibles à l'Ampicilline et que peu d'entre elles présentaient une résistance à la Pénicilline, cette résistance est plus fréquemment détectée dans les isolats d'origine humaine que dans ceux d'origine animale [218]. Le développement d'une résistance élevée à la Pénicilline pourrait avoir des conséquences sur le traitement des infections à entérocoques.

Nous avons noté chez certaines souches des résistances à des niveaux élevés aux Aminosides. 22.62% de résistance de haut niveau à la Streptomycine, et 8.75% de résistance de haut niveau à la Gentamycine. Ceci est proche des résultats obtenus par certains auteurs [151] [219].

100% des souches présentant une résistance de haut niveau à la Streptomycine étaient résistantes aussi aux Tétracyclines et à l'Erythromycine. Ces résultats sont similaires à ceux de KLIBI *et al.* [220]. D'après AARESTRUP *et al.* [172], les gènes de résistance à ces antibiotiques pourraient se localiser sur la même structure génétique et l'utilisation d'un seul antibiotique parmi les trois peut sélectionner les résistances pour les autres.

Aussi, la prévalence de la résistance à de haut niveau de Streptomycine était beaucoup plus élevée que la résistance à de haut niveau de Gentamycine. La Streptomycine étant plus utilisée en production aviaire, il est étonnant de retrouver des résistances aussi importantes. Une étude menée par CHIEW et collaborateurs en 1998 [182] a montré l'existence de la résistance à la Streptomycine en l'absence d'utilisation. Leur hypothèse est le portage du gène de résistance sur un transposon possédant une région spécifique appelée intégron, où d'autres gènes de résistance peuvent s'insérer, avec apparition d'un phénomène de résistance croisée.

Quant à la Gentamycine, elle n'est pas homologuée pour l'utilisation en médecine vétérinaire en Algérie. La prévalence détectée de la résistance était inattendue. Le choix des antibiotiques pour traiter les infections graves à entérocoques est limité aux combinaisons β -lactamines-Aminosides ou Glycopeptides-Aminosides, mais l'émergence de ces souches résistantes à des taux élevés d'Aminosides ou de Glycopeptides complique la situation. En outre, l'apparition de ces niveaux de résistance élevés a pour principale conséquence de supprimer l'action synergique bactéricide nécessaire au traitement des infections graves à entérocoques. Cela montre qu'il est important de détecter systématiquement les résistances élevées après l'isolement en laboratoire de toute souche d'entérocoque.

La résistance à la Ciprofloxacine était de l'ordre de 04.68%, et cette résistance était plus élevée chez *E.faecium* comparée à celle enregistrée chez *E.faecalis* ($P < 0,001$), ce résultat est similaire à celui obtenu par TREMBLAY *et al.* [151].

Dans notre étude, 03.60% des isolats étaient résistants à la Nitrofurantoïne. L'utilisation de cet antimicrobien dans la production de volaille n'a pas été signalée. Par conséquent, la résistance à la Nitrofurantoïne ne peut pas être clairement expliquée. Des résultats similaires ont été observés pour la résistance aux Nitrofurantoïnes au Portugal. Ils ont suspecté une utilisation récente et illicite de Furaltadone par les producteurs de volaille de ce pays [93].

Aussi, une étude menée par VALENZUELA et collaborateurs en 2010 [221], sur la sensibilité aux antibiotiques des entérocoques isolés des fruits de mer, a donné 50% des isolats d'*E.faecium* résistants à la Nitrofurantoïne [221]. Ces résultats soulèvent des questions quant à l'origine de ces gènes de résistance. L'une des hypothèses émises par les auteurs est que les entérocoques ont acquis des gènes de résistance accrus sur des plasmides ou des transposons d'autres organismes ou par des mutations spontanées qui confèrent aux entérocoques un niveau de résistance élevé. Il est possible que les bactéries fécales résistantes aux antibiotiques présentes dans les eaux usées domestiques ou provenant d'autres sources telles que les élevages d'animaux ou de poissons rejetés en mer transfèrent leurs déterminants résistants aux antibiotiques à la flore de poissons indigène, provoquant ainsi leur propagation et leur prévalence dans l'environnement marin.

01.08% des isolats étaient résistants au Chloramphénicol dans notre étude. Cela peut être dû à des expositions illégales à cette molécule, car elle est interdite d'utilisation en élevage, ou bien, c'est dû à la persistance de résistances antérieures. Cette résistance au Chloramphénicol chez la volaille a été détectée aussi chez l'*E.coli*, bactérie indicatrice de résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram négatif. Les auteurs ont rapporté un taux assez élevé de résistance à cet antibiotique (39.22%) [222].

Nous n'avons pas isolé de souches résistantes à la Vancomycine, l'ERG étant endémique aux États-Unis en raison de l'utilisation de Vancomycine par voie orale dans le traitement des infections à *Clostridium* depuis les années 1980. Il est récemment apparu en Europe après l'utilisation de l'Avoparcine en tant que facteur de croissance dans l'alimentation animale, d'où l'existence du portefeuille européen ERG [170].

L'absence d'entérocoques résistants à la Vancomycine suggère que cette résistance acquise est encore confinée à l'environnement hospitalier. Dans notre pays, l'isolement d'un ERG reste rare. Le réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN) n'a signalé que 2 fois l'isolement d'un ERV, les deux sont des *Enterococcus faecium*.

La première alerte était en Novembre 2010, la souche a été isolée à partir d'une hémoculture. L'enquête réalisée a révélé qu'il s'agit bien d'un cas autochtone, survenu chez un patient âgé de 47ans hospitalisé pour brûlure grave.

La deuxième alerte était en Mars 2011, la souche a été isolée à partir d'un pus de plaie, chez un malade hospitalisé dans le service de médecine interne d'un CHU d'Alger. Les deux souches présentent par ailleurs une résistance de haut niveau aux antibiotiques testés : Aminosides (haut niveau de résistance à la Gentamicine, la Streptomycine et à la Kanamycine), Ampicilline, Levofloxacin, Furanes, Erythromycine, Clindamycine, Tétracyclines et Rifampicine. L'identification et la caractérisation du gène de résistance ont été confirmées par PCR au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA).

Cependant, le premier cas d'*E.faecalis* résistant à la Vancomycine a été signalé par AGGOUNE et ses collaborateurs en 2007 [223].

Aussi, une autre souche d'*E.faecium* résistant aux Glycopeptides a été isolée d'une plaie opérante chez un patient hospitalisé dans un CHU à Alger [224].

L'association entre l'utilisation d'Avoparcine comme facteur de croissance et la présence d'ERG chez des animaux destinés à l'alimentation a été documentée dans une étude épidémiologique sur des élevages de volailles et de porcs exposés et non exposés [225].

Cette étude a montré une forte association statistique entre l'utilisation antérieure de l'Avoparcine en tant que facteur de croissance dans l'exploitation, et la détection d'ERG chez des animaux élevés dans la même exploitation.

Pour cette raison et pour réduire l'exposition des êtres humains aux ERG, l'Avoparcine a été interdite au Danemark et en Norvège en 1995, en Allemagne en 1996 et dans tous les pays de l'Union européenne en 1997 [226].

La résistance à la Vancomycine est un sujet de préoccupation, car elle peut être transférée à des microorganismes plus pathogènes [227].

Des études menées au Danemark, en Allemagne, en Italie et aux Pays-Bas ont révélé une diminution de la présence d'ERV dans les systèmes de production animale après l'interdiction de l'Avoparcine [228] [229] [230] [231] [90]. Cependant, dans une étude réalisée trois ans après l'interdiction, des ERV ont été détectés dans 99% des échantillons de fientes de volaille dans des exploitations norvégiennes où l'Avoparcine avait déjà été utilisée [232] [233]. Aussi, six ans après l'interdiction de l'Avoparcine en Corée, les entérocoques porteurs de Van A, VanC₁, et VanC₂ continuent à être isolés dans différents échantillons d'origine animale [234].

La raison de la persistance des ERV dans les échantillons de produits alimentaires et dans la production d'animaux destinés à l'alimentation en l'absence de Glycopeptides n'est pas bien connue. La sélection sous pression chez les animaux n'est pas bien connue, mais pourrait être une conséquence de la co-sélection en raison de l'utilisation d'autres agents antimicrobiens [235].

Aussi, selon AUSTIN *et al.* [236], le temps de décroissance des taux de résistance après l'arrêt ou la diminution du volume de l'utilisation des médicaments peut nécessiter une période prolongée.

Cliniquement, la sensibilité à la Gentamycine, à l'Ampicilline et à la Vancomycine semble être favorable, car la résistance à ces molécules réduit considérablement les traitements thérapeutiques dans les infections à entérocoques [237]. Étant donné que le seul choix thérapeutique pour traiter les

infections graves à entérocoques est limité aux combinaisons β -lactamines-Aminosides ou Glycopeptides-Aminosides.

4.4.4. Conclusion :

La multirésistance des isolats d'*E.faecalis* et d'*E.faecium* provenant de volailles et l'émergence d'ERG et la résistance aux antibiotiques à un taux élevé d'Aminosides constituent une menace mondiale réelle.

Les antibiorésistances les plus souvent détectées, sont aux antibiotiques largement utilisés en élevages (Tetracyclines et Macrolides).

La résistance à la Vancomycine n'a pas été détectée dans notre étude, mais certaines des résistances signalées (Résistance à des hauts niveaux en Aminosides), si elles se propageaient dans la chaîne alimentaire, auraient des implications sur la santé publique.

CONCLUSION

Notre enquête par questionnaire auprès de 134 vétérinaires praticiens faisant des suivis d'élevages avicoles a montré que le problème des échecs thérapeutiques est souvent rencontré sur le terrain, et que l'antibiothérapie est le plus souvent mise en œuvre d'une manière probabiliste, sans recours au diagnostic de laboratoire. Aussi, Le phénomène de l'antibiorésistance est la cause la plus incriminée par les vétérinaires dans les cas des échecs thérapeutiques rencontrés.

Pour mieux appréhender ce fléau de résistance aux antibiotiques chez les microorganismes, nous avons choisi l'étude des entérocoques, qui sont des bactéries indicatrices d'antibiorésistance chez les bactéries à Gram positif.

L'étude du portage digestif des différentes espèces d'entérocoques chez la volaille avec les méthodes conventionnelles a montré la prédominance de deux espèces à savoir l'*E.faecalis* et l'*E.faecium* (96,4% sur l'ensemble des isolats).

L'étude du profil de résistance aux antibiotiques des 278 souches d'entérocoques isolées de la volaille, a donné de hauts pourcentages de résistance aux Tétracyclines et à l'Erythromycine (Antibiotiques fréquemment utilisés en élevage), des bas niveaux de résistances aux Pénicillines, Ciprofloxacine, Nitrofurantoines et Chloramphénicol avec des taux de 07.91%, 04.68%, 03.60% et 01.08% respectivement. Des résistances à des concentrations élevées aux Aminoglycosides ont été enregistrées (Streptomycine à 17.99% et Gentamycine à 04.32%). Toutefois, toutes les souches ont été sensibles à la Vancomycine et à l'Ampicilline.

En conclusion, ce travail rentre dans le cadre de surveillance de la résistance des germes aux antibiotiques, qui devrait être renouvelé constamment, et ça devrait être le rôle de tout laboratoire de microbiologie, que ce soit en médecine humaine ou bien en médecine vétérinaire, afin de fournir aux cliniciens les bonnes molécules pour une antibiothérapie efficace.

En perspective de ce travail, il serait intéressant de pouvoir utiliser des tests d'identification plus sensibles tels que la MALDI - TOF ou la PCR, et de bien approfondir l'aspect génétique des résistances signalées.

APPENDICE A
LISTE DES ABREVIATIONS

AARN	: Algerian Antibiotic Resistance Network
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARNr	: Acide Ribonucléique ribosomique
ATB	: Antibiotique
ATCC	: American Type Culture Collection
BEA	: Bile Esculine Azide
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
CHU	: Centre Hospitalo-universitaire
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DSA	: Direction des Services Agricoles
<i>E</i>	: <i>Enterococcus</i>
ERG	: Entérocoques Résistants aux Glycopeptides
ERV	: Entérocoques Résistants à la Vancomycine
g	: Gramme
IPA	: Institut Pasteur d'Alger
kb	: Kilo base
MALDI-TOF	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
NaCl	: Chlorure de sodium
ORAC	: Office Régional Avicole Centre
PBP/PLP	: Penicillin Binding Protein ou Protéine de liaison à la pénicilline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFP	: Poulette future pondeuse
pH	: Potentiel Hydrogène
UI	: Unité Internationale
°C	: Degré Celsius
µg	: Microgramme
%	: Pourcent

APPENDICE B
QUESTIONNAIRE AUPRES DES VETERINAIRES

Questionnaire pour la collecte des données relatives à l'utilisation des antibiotiques en élevages avicoles.

Date : / / 2019

1. Quelle est l'importance de l'activité avicole dans votre clientèle ?

- Activité principale
- Activité secondaire

2. Quel est le type de spéculation suivi ?

- Poulet de chair
- PFP
- Poules pondeuses
- Reproducteurs
- Dinde

3. Les ATB sont utilisés :

- Au démarrage
- A titre prophylactique
- Lors de cas pathologiques

4. L'utilisation des ATB est arrêtée lors :

- Amélioration symptomatique
- Guérison clinique
- Selon la notice
- Rupture de stock

5. En cas de persistance des symptômes, quelle a été votre conduite ?

- Augmenter la dose du même traitement
- Prolonger la durée du même traitement
- Prescrire une autre molécule d'ATB
- Prescrire une association d'ATB

6. A quel moment vous faites appel au diagnostic de laboratoire ?

- Avant traitement
- Après un échec thérapeutique

7. L'antibiogramme a-t-il répondu à vos attentes ?

- OUI
- NON

8. Si la réponse est **NON** qu'elle a été votre conduite ?

- Continuer avec le même traitement
- Changer la molécule

9. Quelles sont les molécules préconisées selon les manifestations cliniques dominantes ?

Pathologies suspectées	Molécules préconisées
Respiratoires	-..... -..... -.....
Digestives	-..... -..... -.....

10. Quelle est la fréquence des échecs thérapeutiques rencontrés ?

- Fréquents
- Rares

11. Quelles sont d'après vous les causes de ces échecs thérapeutiques ?

- Antibiorésistance
- Molécule non adaptée
- Dose insuffisante
- Non respect de la durée de l'antibiothérapie
- Intervention tardive

Nous vous remercions pour votre collaboration

APENDICE D
COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES

❖ **Milieux de culture (Pour 01litre d'eau distillée) :**

• **Milieu Bile Esculine Azide de Sodium (BEA) :**

Peptone pepsique de viande	3g
Peptone	17g
Extrait de levure	5g
Citrate de sodium	1g
Citrate de fer ammoniacal	0.5g
Chlorure de sodium	5g
Esculine	1g
Bile de bœuf déshydratée	10g
Azide de sodium	0.25g
Agar	13g
pH	7,1±0,2

• **Milieu CHROMagar Orientation :**

Chromopeptone	16.1g
Mélange chromogène	1.3 g
Gélose	15.0 g
pH	6,9±0,2

• **Milieu Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf déshydratée	300 g
Hydrolysate de caséine	17.5 g
Amidon de maïs	1.5 g
Agar agar	10 g
pH	7,4

- **Milieu Columbia :**

Peptone	23,0
Amidon	1,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	10,0
pH	7,3 ± 0,2

- **Milieu BHIB :**

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

- **Eau peptonée tamponnée (EPT):**

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

- **Gélose nutritive :**

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

❖ **Produits chimiques :**

• **Fushine phénique :**

Fushine cristallisée	1g
Alcool éthylique	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

• **Violet de gentiane phénique :**

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

• **Lugol :**

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

- **Eau oxygénée (10%):** Formule moléculaires : H_2O_2 .
- **Glycérol (20%) :** Formule moléculaire : $C_3H_8O_3$.
- **Tellurite de potassium (4%) :** Formule moléculaire: K_2O_3Te .

APPENDICE E

TABLE DE LECTURE GALERIE BIOCHIMIQUE

Tableau: Lecture des résultats du système d'identification « api® 20 Strep » selon bioMérieux [196].

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

APPENDICE F
TABLE DE LECTURE ANTIBIOGRAMME

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

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		Sensible	Intermédiaire	Résistant
Tétracycline	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Erythromycine	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
Streptomycine*	300 µg	≥ 10	7-9	≤ 6
Gentamycine*	120 µg	≥10	7-9	≤ 6
Ampicilline	10 µg	≥ 17	-	≤ 16
Pénicilline	10 UI	≥15	-	≤ 14
Ciprofloxacine	05 µg	≥21	16–20	≤15
Nitrofurantoin	300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14
Chloramphénicol	30 µg	≥18	13–17	≤12
Vancomycine**	30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14

* : Haut niveau de résistance.

** : Incuber pendant 24 heures.

APPENDICE G

Article I:

**“ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROCOCCI
ISOLATED FROM POULTRY”**

YOUSFI Safia, M. BACHIR PACHA*

Institute of Veterinary Sciences, University of BLIDA

**Corresponding author: bachirpacha_mohamed@yahoo.fr*

Publié dans : Agricultura, no. 3 - 4(107-108), (2018),
200-205.

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM POULTRY

YOUSFI Safia, M. BACHIR PACHA*

Institute of Veterinary Sciences, University of BLIDA

*Corresponding author: *bachirpacha_mohamed@yahoo.fr*

Abstract: This study was conducted to evaluate the antibiotic resistance of enterococci isolated from poultry in the wilaya of Tizi Ouzou. A total of 137 enterococci isolates from poultry were tested for antibiotic susceptibility by the diffusion method. Ten antibiotics from different families were tested. High percentages of resistance to Tetracycline and Erythromycin were observed (91.97% and 73.72% respectively), Low frequencies of antimicrobial resistance to Nitrofurantoin and Penicillin with a rates of 5.83% and 7.29% respectively. Resistance was recorded for high levels of Gentamycin and Streptomycin (8.75% and 22.62% respectively). However, all strains were sensitive to Vancomycin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol and Ampicillin.

Key words: *Enterococcus, Antibiotic resistance, Nosocomial infections, Poultry.*

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a global issue in both human and veterinary medicine. The presence of antimicrobial resistant microorganisms in fecal material of animals is becoming a matter of great concern because these microorganisms could be transmitted to humans through a contaminated food supply Hayes et al. (2003). Among these microorganisms, enterococci that are part of the commensal flora of the gastrointestinal tract of humans and animals Kuhn et al. (2005), and are not known to be particularly pathogenic. However, their role in opportunistic and nosocomial infections has increased significantly in recent years. The two main species responsible for human infections are *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.

Today, three elements are leading to a renewed interest in enterococci: the increasing increase in their isolation during various infections, the importance of their place in nosocomial pathology and the emergence and accumulation of antibiotic resistance mechanisms. In addition to their intrinsic resistance to many antimicrobials, including resistance to Cephalosporins, Clindamycin, and low-level to Aminoglycosides and other Beta-lactams, the enterococci have the ability to acquire other antibiotic resistance via genetic mobile elements such as plasmids, transposons, or through chromosomal exchange or mutations Hegstad et al. (2010).

The latest development in resistance, which is the acquisition of glycopeptide resistance (ERG), was also the most impressive and surprising. This explains their follow-up in antimicrobial resistance surveillance programs as antibiotic resistance indicators for Gram-positive bacteria.

The purpose of our study is to evaluate the digestive carrying of different strains of enterococci in poultry slaughtered in the Wilaya of Tizi Ouzou and to determine their antimicrobial resistance profiles.

MATERIEL AND METHODS

Collection of samples: The caecal content of the birds was collected from four poultry slaughterhouses (one state and three private sector), all located in the wilaya of Tizi Ouzou, during the period from July 2017 to December 2017.

Each slaughter site was visited once during each 4-week period, in a random order. At each visit to the slaughterhouses, two flocks located in different production sites were selected whenever possible. A flock was defined as a group of birds from the same hatchery raised in a broiler house during the same period of time. Only one flock raised per production site was allowed for selection in the study. After evisceration, the caeca from the selected birds were placed in sterile plastic bags and kept on melting ice for a maximum of 8 hour prior to culture. For each flock sampled, 30 birds are randomly selected, and three pools including caecal content of 10 birds were created.

Bacterial identification: The pooled caecal sample was mixed with 25 ml of buffered peptone water until homogenization, then, a drop was collected and inoculated on a selective Bile Esculine Azide Agar (IPA). Incubation is done at 37° C in a normal atmosphere for 24 to 48 hours. After incubation, suspected enterococci colonies from each sample (small translucent colonies surrounded by a black halo) were subcultured for purity onto blood agar (Tryptic soy agar plus 5% sheep blood). Then, the identification was completed by testing for catalase, Gram-staining and by API 20 Strep system kit (Bio-Merieux, France).

Antimicrobial susceptibility testing: The antibiotic susceptibility test was determined by disc diffusion method on Mueller-Hinton agar medium (IPA), according to the recommended Clinical Laboratory Standards Institute guidelines, (CLSI, 2017). This diffusion method (Standard Antibiogram) is one of the oldest approaches to determine bacterial sensitivity to antibiotics and remains one of the most commonly used methods in routine. The antimicrobial susceptibility of enterococci was tested with a panel of 10 antimicrobial: Penicillin (10 UI), Ampicillin (10 µg), High concentration Gentamicin (120 µg), High concentration Streptomycin (300 µg), Vancomycin (30 µg), Nitrofurantoin (300 µg), Tetracycline (30 µg), Erythromycin (15 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Chloramphenicol (30 µg). The diameters of inhibition zones were interpreted by referring to the table of *Enterococcus* spp as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 obtained from American Type Culture Collection were used as quality control organisms.

RESULTS

Identification of *Enterococcus* spp. strains: A total of 52 flocks were sampled and 156 pools including caecal from chicken broilers, turkeys and laying hen were realized. The presence of Enterococci was confirmed in 137 pools samples, representing 87.82% of specimens. The identification of strains by using the API 20 Strep system kit (Bio-Merieux, France) revealed 95 *E. faecalis*, 32 *E. faecium*, 06 *E. cecorum* and 04 *E. hirae*. The most commonly identified strain is *E. faecalis* with a rate of 69.34%, followed by *E. faecium* with a rate of 23.35%, *E. cecorum* and *E. hirae* with a rate of 04.37% and 02.92% respectively. The results are shown in table 1.

Table1.

Distribution of enterococci strain by type of speculation.

Type of speculation	Number of flocks	Number of pools	Isolated strains				Total
			<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. hirae</i>	
Broiler chicken	46	138	86	32	-	04	122
Turkey	04	12	06	-	04	-	10
Laying hen	02	06	03	-	02	-	05
Total	52	156	95	32	06	04	137

Antibiotic susceptibility profile of isolated strains: Of the 137 strains of enterococci isolated, we studied the sensitivity to the different antibiotics using the standard antibiotic susceptibility test and the results obtained are presented in Table 2. Only 5.1% of enterococci were susceptible to all tested antimicrobials. Resistance to Vancomycin, Ciprofloxacin, antimicrobials of very important in human medicine, was not found in any enterococci. All strains were susceptible to chloramphenicol and ampicillin. Most of the isolates, were resistant to Erythromycin (73.72%) and Tetracycline (91.97%). Low to intermediate frequencies of antimicrobial resistance to Penicillin (05.83%), Nitrofurantoin (07.29%), Gentamycin (high level; 08.75%), and Streptomycin (high level; 22.62%).

Table 2.

Antibiotic resistance percentages (%) of Enterococci isolated strains

ATB	Broiler Chicken (n=122)			Turkey (n=10)		Laying Hen (n=05)		Total (n=137)
	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.hirae</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.cecorum</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.cecorum</i>	
PEN	-	08	-	-	-	-	-	08 (05.83)
AMP	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	07	04	-	-	-	01	-	12 (08.75)
STR	18	10	-	02	-	01	-	31 (22.62)
VAN	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	04	05	-	01	-	-	-	10 (07.29)
TET	79	29	03	06	04	03	02	126 (91.97)
ERY	68	26	01	04	01	01	-	101 (73.72)
CIP	-	-	-	-	-	-	-	-
CHL	-	-	-	-	-	-	-	-

PEN : Penicillin, AMP : Ampicillin, GEN : Gentamicin, STR : Streptomycin, VAN : Vancomycin, NIT : Nitrofurantoin, TET : Tetracycline, ERY : Erythromycin, CIP : Ciprofloxacin, CHL : Chloramphenicol.

Multidrug resistance (resistance to 03 or more antibiotics) is considered as a real threat, as 27% strains of 137 of enterococci isolates were resistant to at least three antibiotics.

14.6% of the strains were resistant to three antibiotics, 10.21% were resistant to four antibiotics and 02.19% were resistant to five antibiotics.

The results are shown in Table 3.

Table 3.

Strains of Enterococci showing multidrug resistance.

Number of resistance antibiotics	Number of strains n=137	Rates of trains (%)
03	20	14.6
04	14	10.21
05	03	02.19
Total	37	27

A total of 13 multidrug resistance profiles were obtained in our study, and reported in Table 4. *E. faecium* isolates had more multiresistant phenotypic profiles (08 different profiles) than did *E. faecalis* (05 profiles). The common multidrug resistance profile was TET ERY STR with 13 strains observed in *E. faecalis*.

Table 4.
Phenotypic profile of multidrug resistance observed in *E. faecalis* and *E. faecium*.

Bacterial Species	Phenotypic multiresistant profile	Total of isolates
<i>E. faecalis</i>	TET ERY GEN	02
	TET ERY STR	13
	TET ERY NIT	03
	TET ERY NIT STR	02
	TET ERY GEN STR	06
<i>E. faecium</i>	TET ERY STR	01
	TET ERY PEN	01
	TET PEN STR GEN	01
	TET ERY NIT STR	02
	TET ERY GEN STR	02
	TET ERY STR PEN	01
	TET ERY NIT PEN STR	02
	TET ERY NIT PEN GEN	01

DISCUSSION

E. faecalis was the predominant species (69.34% of isolates) recovered from both broiler Chicken, laying hen and turkey samples, in accordance with some reports Franz et al. (1999), Graham et al. (2009), but in contrast with others indicating *E. faecium* as the most frequent enterococci species isolated from poultry Hayes et al. (2003), Jackson et al. (2004). These differences of predominances can be attributed to geographical discrepancies or isolation methodologies Manero and Blanch, (1999), Jackson et al. (2005). Both species accounted for a large proportion (92.7%) of the enterococci isolates recovered from poultry in this study.

It should be noted, however, that the small number of isolated strains of *E. faecium* did not allow us to secondarily study the comparison of antibiotic susceptibility between the two species more closely, as *E. faecium* is generally reported to be more resistant than *E. faecalis*. Jones et al. (1995), Streff et al. (1996), SY (1996).

All strains (100%) were sensitive to Ampicillin, Ciprofloxacin and Chloramphenicol. Only a few of the isolates were resistant to Penicillin, but this mechanism of resistance has not gained wide spread importance in human medicine. The development of high-level penicillin resistance could have consequences for the treatment of enterococci infections.

We have noted in some strains a high level of resistance to aminoglycosides. This is close to the results obtained by a study conducted in Canada in 2011 by Tremblay et al. (2011). In our study, prevalence of high-level resistance to Streptomycin was much higher than high-level resistance to Gentamycin. Gentamycin is not registered for the use in poultry in Algeria; the detected prevalence of resistance was unexpected. The choice of antibiotics to treat serious enterococci infections is limited to the combinations β -lactamines-Aminosides or Glycopeptides-Aminosides, but the emergence of these strains resistant to

high levels of aminoglycoside or glycopeptide complicates the situation. In addition, the main consequence of the appearance of these high levels of resistance is the removal of the bactericidal synergistic action necessary for the treatment of severe enterococci infections. This shows the importance of systematically detecting high level resistance after isolation in the laboratory of any enterococci strain.

We have noted also high rates of resistance to Tetracycline and Erythromycin. The main reason for the high resistance to Tetracycline may be that this antimicrobial is the most commonly used in our country as both a therapeutic and non-therapeutic antimicrobials in veterinary medicine.

Few isolates were resistant to Nitrofurantoin in our study. This antimicrobial has not been reported to be used in poultry production. Therefore, Nitrofurantoin resistance cannot be clearly explained. Similar results were observed for Nitrofurantoin resistance in Portugal, which was explained by a recent massive and illicit use of furaltadone by poultry producers in this country da Costa et al. (2007).

We have not isolated any strains resistant to Vancomycin, ERG being endemic in the USA due to the use of oral Vancomycin in the treatment of *Clostridium difficile* infections since the 1980s. It has recently appeared in Europe following the use of Avoparcin as a growth factor in animal feed, hence the existence of the Community carry of ERG Cetinkaya et al. (2000).

In our country, the isolation of an ERG is rare. In 2007, a first case of vancomycin-resistant *E. faecalis* was reported by Aggoune et al. (2008). Also, a strain of *E. faecium* resistant to glycopeptides (ERG) was isolated from an operating wound in a patient hospitalized in a university hospital in Algiers Hamidi et al. (2013).

CONCLUSION

Multidrug resistance of *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from poultry and the emergence of ERG and antibiotic resistance to high level of aminoglycosides are a real global threat. Vancomycin resistance was not detected, but some of the reported resistances, if spread through the food chain, would have public health implications.

Acknowledgements. *Authors wish to thank veterinarians of the slaughterhouses who had contribute to this work for the collection of samples, and for the Veterinary laboratory of D.B.K.*

REFERENCES

1. Aggoune, N., Chabani, A., Tiouit, D., Naim, M., Rahal, K. (2008). Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. *Med Mal Infect*, 38 : 557-8.
2. Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G. (2000). Vancomycin-resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 13: 686-707.
3. Clinical and laboratory standards institute, (CLSI, 2017), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA.
4. da Costa, P. M., M. Oliveira, A. Bica, P. Vaz-Pires, and F. Bernardo. 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Vet. Microbiol.* 120:122–131.
5. Franz, C. M., W. H. Holzapfel, and M. E. Stiles. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47:1–24.

6. Graham, J. P., S. L. Evans, L. B. Price, and E. K. Silbergeld. (2009). Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environ. Res.* 109:682–689.
7. Hamidi, M., Ammari, H., Ghaffor, M., Benamrouche, N., Tali-Maamar, H., Tala-Khir, F., Younsi, M., Rahal, K. (2013). Émergence d'Enterococcus faecium résistant aux glycopeptides en Algérie: à propos d'un cas. *Ann Biol Clin*, 71(1) : 104-6.
8. Hayes, J. R., L. L. English, P. J. Carter, T. Proescholdt, K. Y. Lee, D. D. Wagner, and D. G. White. (2003). Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7153–7160.
9. Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T.M., Werner, G., Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 541–554.
10. Jackson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, J. B. Barrett, and S. R. Ladely. (2004). Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis.* 48:100–107.
11. Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Jackson-Hall, M.C., Hiott, L.M., (2005). Effect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology* 41,262–268.
12. Jones, R.N., Sader, H.S., Erwin, M.E., Anderson, S.C. (1995). Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates: Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 21 (2): 85-93.
13. Kuhn, I., Iversen, A., Finn, M., Greko, C., Burman, L.G., Blanch, A.R., Vilanova, X., Manero, A., Taylor, H., Caplin, J., Domínguez, L., Herrero, I.A., Moreno, M.A., Möllby, R. (2005). Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol*, 71(9): 5383-90.
14. Manero, A., Blanch, A.R., (1999). Identification of Enterococcus spp. With a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4425–4430.
15. Streff, K., Jean Pierre, H., Darbas, H., Paillisson, J. (1996). Enterocoques au CHRU de Montpellier durant le mois de septembre 1993 : espèces isolées, répartition en fonction du prélèvement, rôle pathogène, sensibilité aux bêtalactamines, aminosides, glycopeptides. *Méd. Mal. Infect*, 26 : 704-13.
16. Sy, K.R. (1996). Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques : données actuelles au CHU A. Le DANTEC de Dakar Thèse, pharmacie, Dakar, N°61.
17. Tremblay, C.L, Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., Daignault, D., Archambault, M. (2011) Multiple-Antibiotic Resistance of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of tetO and ermB Genes. *Journal of Food Protection*, 74(10): 1639-48.

Article II:

**“USE OF CHROMAGAR ORIENTATION FOR
PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF ENTEROCOCCI
AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL
RESISTANCE OF THE ISOLATES”**

**SAFIA^{1*} Yousfi, N. HAMMAMI¹⁾, A. MSELA¹⁾, M. SADI¹⁾, A. MAGHRICI²⁾,
A. ADDI¹⁾, M. BACHIR PACHA¹⁾**

¹⁾ *Laboratory of Biotechnology Related to Animal Reproduction (LBRA),
University of Saad Dahlab Blida 1, Algeria.*

²⁾ *ENSV of Algiers, Algeria.*

**Corresponding author: safia.yousfi69@gmail.com*

Publié dans : *Agricultura*, no. 1- 2 (113-114), (2020), 166-
172.

USE OF CHROMAGAR ORIENTATION FOR PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF ENTEROCOCCI AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF THE ISOLATES

SAFIA^{1*)} Yousfi, N. HAMMAMI¹⁾, A. MSELA¹⁾, M. SADI¹⁾, A. MAGHRICI²⁾, A. ADDI¹⁾, M. BACHIR PACHA¹⁾

¹⁾ *Laboratory of Biotechnology Related to Animal Reproduction (LBRA), University of Saad Dahlab Blida 1, Algeria.*

²⁾ *ENSV of Algiers, Algeria.*

**Corresponding author: safia.yousfi69@gmail.com*

Abstract: This study was conducted to evaluate the use of CHROMagar Orientation for presumptive identification of enterococci from poultry, and to characterize the antimicrobial resistance of the isolates. Strains identification with conventional methods allowed confirmation of *Enterococcus* genus membership of all of the isolates on CHROMagar orientation (100%). Of the 141 enterococci isolates obtained from chicken, 81 (57.45%) were identified as *Enterococcus faecalis* and 60 (42.55%) as *Enterococcus faecium*. The antimicrobial susceptibility test presented high level of resistance to Tetracycline (89%) and Erythromycin (65%), low level of resistance to High Level of Streptomycin, Penicillin and Ciprofloxacin (13%, 10% and 9% respectively). Few of isolates were resistant to Chloramphenicol (2%). All the strains were susceptible to High Level of Gentamycin, Ampicillin, Vancomycin and Nitrofurantoin. The predominant phenotype of resistance pattern identified in both *E.faecalis* and *E.faecium* was (Erythromycin -Tetracycline).

Key words: Antibiotic resistance, CHROMagar Orientation, *Enterococcus*, Poultry.

INTRODUCTION

Enterococci are natural inhabitants of the human and animal gastro intestinal tract. Their role in opportunistic and nosocomial infections has increased significantly in recent years. Added to this, they have the ability to acquire genes of resistance to several antibiotics, which compromise the choice of therapy. Hence the need for rapid identification of enterococci. CHROMagar Orientation claims to facilitate and expedite the identification of commonly isolated gram-negative bacteria and some gram-positive bacteria such as *Enterococcus spp.* without confirmatory testing, on the basis of different contrasted colony colors produced by reactions of genus or species specific enzymes with a proprietary chromogenic substrate Merlino et al. (1996).

The aim of this study was to evaluate the use of CHROMagar Orientation for isolation of enterococci from poultry and to characterize the antimicrobial resistance of the isolates.

MATERIEL AND METHODS

Sample Collection: Samples were collected once each week from four poultry slaughterhouses located in the Wilaya of Tizi Ouzou, Algeria, as previously described (Yousfi and Bachir Pacha, 2018), between January 2018 to June 2018.

Strain isolation: CHROMagar Orientation (Becton Dickinson) was used for presumptive identification of *Enterococcus spp.* The principle of this medium is the use of chromogenic substrates revealing metabolic enzymes.

After enrichment of the specimens on Brain Heart infusion broth supplemented with 6.5% of NaCl for 48h at 37°C, one typical enterococcal colony growing on CHROMagar orientation plates, at 37°C for 24h (Small blue-green colonies), was selected and subcultured on Columbia agar (Oxoid) with 5% sheep blood for purification, from which the isolates were selected for further identification and characterisation.

The appurtenances to the genus level of the isolates were confirmed by positive Gram staining, the absence of catalase and growth on Bile-Esculine Agar with esculine hydrolysis (Facklam and Colinsm, 1989).

Species identification: *E.faecalis* is distinguished from *E.faecium* and other species by its ability to grow in media containing 0.04 % tellurite, (B.E. Murray, 1990). Identification of the others species was carried out by API 20 Strep test kit (BioMerieux), according to the manufacturer's guidelines.

Antimicrobial susceptibility test: Antimicrobial profile of tested isolates of *Enterococcus spp.* was evaluated using the qualitative disk diffusion method on Mueller-Hinton agar medium (IPA), according to the recommended Clinical Laboratory Standards Institute guidelines, (CLSI, 2017).

Ten antimicrobial agents were tested, the antibiotic concentration per disk (Oxoid) was as follows: Tetracycline (30 µg), Erythromycin (15 µg), High Level Streptomycin (300 µg), High Level Gentamycin (120 µg), Ampicillin (10 µg), Penicillin (10 UI), Vancomycin (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Chloramphenicol (30 µg), Nitrofurantoin (300 µg).

The diameters of inhibition zones were interpreted by referring to the table of *Enterococcus spp* as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017), and the isolates were categorized as susceptible, intermediate or resistant (S, I or R).

Staphylococcus aureus ATCC® 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 obtained from American Type Culture Collection were used as quality control organisms.

The Chi-square test was used to determine the significance of differences in antibiotic resistance rates among isolates, where appropriate. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Occurrence of *Enterococcus spp.*: A total of 47 flocks were sampled, and 141 pools were created. Of the 141 samples analyzed for the presence of enterococci, 100% of them were positive. The species identified were: *Enterococcus faecalis* with a rate of 57.45% (81), and *Enterococcus faecium* 42.55% (60).

Antibiotic susceptibility profile of isolated strains:

Only 1.42% of enterococci isolates were susceptible to all antibiotics tested in this study.

All tested isolates were susceptible to High Level Gentamycin, Ampicillin, Vancomycin and Nitrofurantoin.

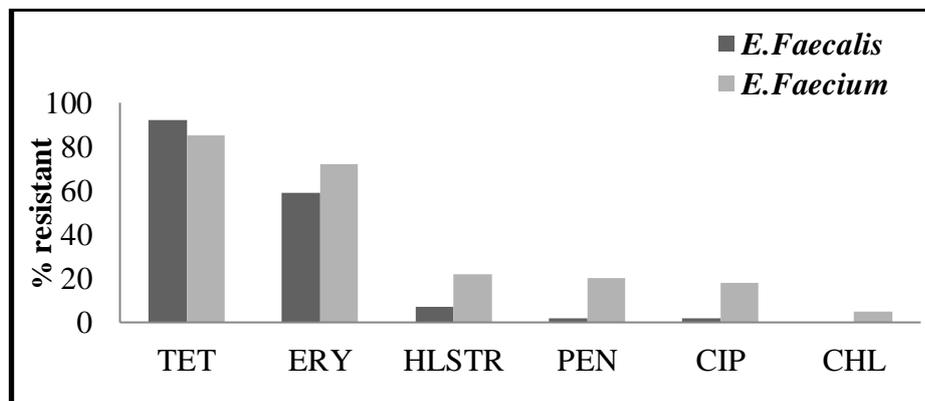
The rates of resistance to others antimicrobials were mentioned in Table 1.

Table 1

The Percentage (%) of susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R) enterococci strains isolated from poultry.

ATB	<i>E. Faecalis</i> (n=81)			<i>E. Faecium</i> (n=60)			Total (n=141)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Tetracycline	3	5	92	10	5	85	6	5	89
Erythromycin	17	24	59	10	18	72	14	21	65
HL Streptomycin	93	0	7	78	0	22	87	0	13
HL Gentamycin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ampicillin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Penicillin	98	-	2	80	-	20	90	-	10
Vancomycin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ciprofloxacin	93	5	2	74	8	18	91	0	9
Chloramphenicol	100	0	0	95	0	5	98	0	2
Nitrofurantoin	100	0	0	100	0	0	100	0	0

Compared to *E.faecalis*, *E.faecium* isolates were significantly more resistant (P values of the following comparisons were all < 0.05) to High Level Streptomycin (7% versus 22%), Penicillin (2% versus 20%) and Ciprofloxacin (2% versus 18%) (Figure 1).



TET=Tetracycline; ERY= Erythromycin; HLSTR=high-level Streptomycin;
PEN=Penicillin; CIP=Ciprofloxacin; CHL=Chloramphenicol.

Fig. 1. Comparison of drug resistance in *E.faecalis* (n=81) and *E.faecium* (n=60).

The prominent resistance phenotype in the collection was Tetracycline-Erythromycin.

Multi Drugs Resistance according to Magiorakos et al. (2012) was defined as resistance to three or more antibiotic families. Our results show that 7.4% of *E.faecalis* and 21.66% of *E.faecium* isolates were resistant to at least 3 antibiotics.

The phenotypic resistance profiles observed in *E.faecalis* and *E.faecium* are represented in table 2 and table 3 respectively.

Table 2

Phenotypic resistance profiles observed among *E. faecalis* isolates from poultry.

Total no. of isolates	Phenotypic resistance profiles
01	PEN-HLSTR-ERY-TET-CIP
01	PEN-HLSTR-ERY-TET
01	HLSTR-ERY-TET-CIP
03	HLSTR-ERY-TET
38	ERY-TET
04	ERY
31	TET

Table 3

Phenotypic resistance profiles observed among *E. faecium* isolates from poultry.

Total no. of isolates	Phenotypic resistance profiles
03	PEN-HLSTR-CHL-ERY-TET-CIP
07	PEN-HLSTR-ERY-TET-CIP
2	PEN-HLSTR-ERY-TET
01	HLSTR-ERY-TET-CIP
21	ERY-TET
09	ERY
17	TET

Color and morphology characteristics of enterococci colonies on CHROMagar Orientation allowed for their easy differentiation. Of the 141 bacterial colonies presumptively identified as enterococci on CHROMagar orientation, all of them were correctly identified with conventional methods (100%). These results are similar to those obtained by Merlino et al. (1996), Hengstler et al. (1997) and (Eun Ha Koh, M.D. and Sunjoo Kim, M.D. 2004).

Among the 141 Enterococcus isolates examined in this study, *E. faecalis* and *E. faecium*, were the only isolated species found in cecal contents from poultry. Although *E. faecalis* was isolated most frequently. This observation is consistent with some reports, where *E. faecalis* was reported the most prevalent species Aslam et al. (2012), (Yildiz and Turkyilmaz 2015), Pillay et al. (2018). However, a study conducted in Nigeria by Ngbede et al. (2017) showed that *E. faecium* was the predominant (49%) species in chicken faeces. A similar result was also observed by Ali et al. (2014) and Ünal et al. (2017), with prevalence of 66% and 33.6%, respectively.

Data on phenotypic antimicrobial resistance revealed that a high number of *E. faecalis* and *E. faecium* isolates were resistant to different classes of antimicrobials, and *E. faecium* was more resistant than *E. faecalis*, this result is similar to this obtained by Tremblay et al. (2011).

The most antibiotic resistance observed was to Tetracyclines and Macrolides. These antibiotics are frequently used for treatment and prevention in poultry, being relatively cheap and effective against a wide variety of microorganisms Persoons et al.

(2010). Thus, a high rate of resistance recorded to drugs of these antimicrobial classes. Also, Plasmids and/or conjugative transposons may carry both the tetracycline and erythromycin resistance determinants and both resistances can be maintained with any of the agents (Chopra and Roberts, 2001).

We have not isolated any enterococci resistant to high level of Gentamycin, but we have enregistered 13% of resistance to high level of Streptomycin. It was noted that 100% of Streptomycin resistant isolates also exhibited resistance to Tetracycline and Erythromycin. The resistance genes for these antibiotics could be located in the same genetic structures and the use of one of them might select for resistance to the others Aarestrup et al. (2000).

The results obtained in this study showed that all the isolated strains were sensitive to Ampicillin, and few of them had a resistance to Penicillin, although this resistance has been more frequently detected in isolates of human origin than in those of animal origin Mannu et al. (2003).

In the present study, none of the strains were resistant to vancomycin. The resistance to vancomycin is a matter of special concern, because this resistance may be transferred to more pathogenic microorganisms Pavia et al. (2000). The absence of vancomycin resistant enterococci suggests that this acquired resistance is still confined to the hospital environment. The last reported ERG in our country was in 2013 Hamidi et al. (2013).

Clinically, sensitivity to Gentamycin, Ampicillin and Vancomycin appears to be favorable, because resistance to these molecules reduces significantly therapeutic treatments in enterococcal infections Klare et al. (2003). Given that the only therapeutic choice to treat serious enterococci infections is limited to the combinations β -lactamines-Aminosides or Glycopeptides-Aminosides.

Resistance to Ciprofloxacin in *E. faecium* was higher than that enregistered in *E. Faecalis* ($P < 0.001$), this result is similar to this obtained by Tremblay et al. (2011).

2% of isolates were resistant to Chloramphenicol in our study. This may be due to illegal exposes to this molecule, as it is prohibited in breeding, or to the persistence of previous resistances. All the 141 Enterococci strains were sensitive to Nitrofurantoin, as this antibiotic is not registered for the use in poultry in Algeria.

CONCLUSIONS

The Use of CHROMagar Orientation enabled a rapid presumptive identification of enterococci, without additional tests of identification. It appears to be a medium well suited for the isolation of enterococci, and the antimicrobial resistances detected are to antibiotics widely used in farms.

Acknowledgements. *Authors wish to thank veterinarians of the slaughterhouses who had contributed to this work for the samples collection.*

REFERENCES

1. Aarestrup, F.M., Agero, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. and Jensen, L.B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotype and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 37, 127–137.
2. Ali, S.A., Hasan, K.A., Bin Asif, H. and Abbasi, A. (2014). Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 423–432.
3. Aslam, M., Diarra, M.S., Checkley, S., Bohaychuk, V. and Masson, L. (2012). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 222–230.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI, 2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA.
5. Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260.
6. Eun Ha Koh, M.D. and Sunjoo Kim, M.D. (2004). Evaluation of a New Chromogenic agar, CHROMagar Orientation, for Detection and Presumptive Identification of Urinary Tract Pathogens. *Korean J. Lab. Med.*, 24: 230-3.
7. Hengstler, Kai A., Hammann, Rainer and Fahr, Anne-Marie. (1997). Evaluation of BBL CHROMagar Orientation Medium for Detection and Presumptive Identification of Urinary Tract Pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 35, No. 11, 2773–2777.
8. Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 269–290.
9. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 268–281.
10. Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Communian, R., Zanetti, S., Dupré, I., et al. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 291–304.
11. Merlino, J., Siarakas, S., Robertson, G.J., Funnell, G.R., Gottlieb, T. and Bradbury, R. (1996). Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of Gram-Negative Bacilli and *Enterococcus* species. *Journal of clinical microbiology*, Vol.34, No.7, 1788–1793.
12. Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 46–65.
13. Ngbede, E.O., Raji, M.A., Kwanashie, C.N. and Kwaga, J.K.P. (2017). Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*, 49(3), 451–458.
14. Pavia, M., Nobile, C.G.A., Salpietro, L., Angelillo, I.F. (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.* 63, 912–915.
15. Persoons, D., Dewulf, J., Smet, A., Herman, L., Heyndrickx, M., Martel, A., Catry, B., Butaye, P. and Haesebrouck, F. (2010). Prevalence and persistence of antimicrobial resistance in broiler indicator bacteria. *Microb. Drug Resist.*, 16, 67–74.

16. Pillay, S., Zishiri, O.T. and Adeleke, M.A. (2018). Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 85(1), a1583.
17. Ünal, N., Aşkar, Ş. and Yildirim, M. (2017). Antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from broiler cloacal samples. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 41(2), 199–203.
18. Tremblay, C.L, Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., Daignault, D., Archambault, M. (2011) Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Cecal Contents in Broiler Chicken and Turkey Flocks Slaughtered in Canada and Plasmid Colocalization of tetO and ermB Genes. Journal of Food Protection, 74(10): 1639-48.
19. Yildiz O. and Turkyilmaz S. (2015). Investigation of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk. Israel Journal of Veterinary Medicine, 70(4), 15–21.
20. Yousfi, S. and Bachir Pacha, M. (2018). Antibiotic resistance of enterococci isolated from poultry. Agricultura, No. 3 - 4(107-108), 200-205.

REFERENCES

1. Hayes, J. R., English, L. L., Carter, P. J., Proescholdt, T., Lee, K. Y., Wagner, D. D. and White, D. G., "Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, (2003), 7153–7160.
2. Kuhn, I., Iversen, A., Finn, M., Greko, C., Burman, L.G., Blanch, A.R., Vilanova, X., Manero, A., Taylor, H., Caplin, J., Domínguez, L., Herrero, I.A., Moreno, M.A. and Möllby, R., "Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(9), (Sep 2005), 5383-90.
3. Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T.M., Werner, G. and Sundsfjord, A., "Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*", *Clinical Microbiology and Infection*, 16, (2010), 541–554.
4. Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H., "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", *Int. J. Food. Microbiol.*, 36(1), (1997), 1-29.
5. Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R., "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, (1984), 31-34.
6. Schleifer, K. H., Kraus, C., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. and Fischer, W., "Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen nov", *Syst. Appl. Microbiol.*, 6, (1985), 183-195.
7. Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R., "Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci", *Syst. Appl. Microbiol.*, 10, (1987), 1-19.

8. Köhler, W., "The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*", *Int. J. Med. Microbiol.*, 297, (2007), 133-150.
9. Sístek, V., Maheux, A. F., Boissinot, M., Bernard, K. A., Cantin, P. and Bergeron M. G., "*Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62, (2012), 1314-1320.
10. Isnard, C., "Enterococcus spp.: entre pathogènes opportunistes et probiotiques", Thèse de Doctorat, Université de Caen Normandie, (2017).
11. Van Tyne, D. and Gilmore, M. S., "Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance", *Annual Review of Microbiology*, 68, (2014), 337–56.
12. Monstein, H. J., Quednau, M., Samuelsson, A., Ahrnié, S., Isaksson, B. and Jonasson, J., "Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods", *Microbiology*, 144, (1998), 1171-1179.
13. Williams, A. M., Rodrigues, U. M. and Collins, M. D., "Intragenetic relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA", *Res. Microbiol.*, 142, (1991), 67-74.
14. De Graef, E. M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M. D., Lefebvre, K., Swings, J. and Haesebrouck, F., "Description of *Enterococcus canis* sp.nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a later synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 53, (July 2003), 1069-1074.
15. Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Sukura, A. and Björkroth, J., "Enterococcus hermanniensis sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, (2004), 1823-1827.
16. Lancefield, R. C., "A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci", *J. Exp. Med.*, 57, (1933), 571-595.

17. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G., "Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria", *Int. J. Food. Microbiol.*, 41(2), (1998), 103-125.
18. Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S. and Facklam, R. R., "Enterococcus", In "Manual of clinical microbiology", 9th edition (Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Tenover, M. C., Eds): 1, ASM Press, Washington, DC, USA, (2007), 430-442.
19. Poyart, C., Berche, P. and Trieu-Cuot, P., "Characterization of superoxide dismutase genes from Gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers", *FEMS Microbiology Letters*, 131, (1995), 41–45.
20. Fenselau, C. and Demirev, P. A., "Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry", *Mass Spectrometry Reviews*, 20, (2001), 157–71.
21. Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., Tonolla, M. and Petrini, O., "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria", *PLoS One* 6 (1): e16424. doi:10.1371/journal.pone.0016424, (2011).
22. Mundt, J. O., Coggin, J. H. and Johnson, L. F., "Growth of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* on plants", *Applied Microbiology*, 10, (1962), 552–55.
23. Deibel, R. H., Lake, D. E. and Niven, C. F., "Physiology of the enterococci as related to their taxonomy", *Journal of Bacteriology*, 86, (1963), 1275–82.
24. Flahaut, S., Boutibonnes, P. and Auffray, Y., "Enterococci in human environment", *Canadian Journal of Microbiology*, 43, (1997), 699–708.
25. Gilmore, M. S., Lebreton, F. and Van Schaik, W., "Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era", *Current Opinion in Microbiology*, 16, (2013), 10p.

26. Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M. and Gilmore, M. S., "Tracing the Enterococci from paleozoic origins to the hospital", *Cell* 169, (2017), 849–861.
27. Bouvet, A., "Taxonomie des streptocoques et des entérocoques", *Bull. Soc. Fr. microbiol.*, 9, (1994), 273-277.
28. Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L. and Segars, W. I., "Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking", *J. Environ. Qual.*, 31, (2002), 1286-1293.
29. Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P. and Dore, J., "Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(5), (2000), 2263-2266.
30. Noble, C. J., "Carriage of group D streptococci in the human bowel", *J. Clin. Pathol.*, 31, (1978), 1182-1186.
31. Benno, Y., Suzuki, K., Suzuki, K., Narisawa, K., Bruce, W. R. and Mitsuoka, T., "Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians", *Microbiol. Immunol.*, 30, (1986), 521-532.
32. Franz, C.M., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E., "Enterococci at the crossroads of food safety?" *Int. J. Food. Microbiol.*, 47(1-2), (1999), 1-24.
33. Chenoweth, C. and Schaberg, D., "The epidemiology of enterococci", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9(2), (1990), 80-89.
34. Murray, B. E., "The life and times of the *Enterococcus*", *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, (1990), 46-65.
35. Devriese, L. A., Baele, M. and Butaye, P., "The genus *Enterococcus*: Taxonomy", In: "Prokaryotes", 3rd edition, (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E., Eds), 4, Springer, New York, NY, USA, (2006), 4-75.

36. Schloissnig, S., Arumugam, M., Sunagawa, S., Mitreva, M., Tap, J., Zhu, A., Waller, A., et al., "Genomic variation landscape of the human gut microbiome", *Nature*, 493, (2013), 45–50.
37. Tannock, G.W. and Cook, G., "Enterococci as Members of the Intestinal Microflora of Humans", In: "The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance", M.S. Gilmore, Editor. ASM Press: Washington D.C, (2002), 101-132.
38. Tannock, G.W., "The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract, in *Human Health: the Contribution of Microorganisms*", S.A.W. Gibson, Editor, Springer-Verlag: London, (1994), 1-16.
39. Woodmansey, E.J., "Intestinal bacteria and ageing", *J. Appl. Microbiol.*, 102 (5), (2007), 1178-1186.
40. Percival, R.S., Marsh, P.D. and Challacombe, S.J., "Serum antibodies to commensal oral and gut bacteria vary with age", *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, 15 (1), (1996), 35-42.
41. Devriese L.A., Hommez, J., Wjifels, R. and Haesebrouck, F., "Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry", *J. Appl. Bacteriol.*, (71), (1991a), 46-50.
42. Devriese, L. A., Ducatelle, R., Uyttebroek, E. and Haesebrouck, F., "Enterococcus hirae infection and focal necrosis of the brain of chicks", *Vet. Rec.*, 129, (1991b), 316p.
43. Devriese, L. A., Hommez, J., Pot, B. and Haesebrouck, F., "Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs", *J. Appl. Bacteriol.*, 77, (1994), 31-36.
44. Devriese, L. A., Van de Kerckhove, A., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K. H. and Phillips, B. A., "Characterization of and identification of Enterococcus species isolated from animals", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, (1987), 257-259.

45. Aarestrup, F.M., Butaye, P. and Witte, W., "Nonhuman Reservoirs of Enterococci", In "The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance", M.S. Gilmore, Editor. ASM Press: Washington D.C., (2002), 55-100.
46. Jones, R. N., Marshall, S. A., Pfaller, M. A., Wilke, W. W., Hollis, R. J., Erwin, M. E., Edmond, M. B. and Wenzel, R. P., "Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy", SCOPE Hospital Study Group, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 29, (1997), 95-102.
47. Arias, C.A. and Murray, B.E., "The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance", *Nature Reviews Microbiology*, 10, (2012), 266–78.
48. Gordon, S., Swenson, J. M., Hill, B. C., Pigott; N. E., Facklam, R. R., Cooksey, R. C, Thornsberry, C, Jarvis, W. R. and Tenover, F. C., "Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States", Enterococcal Study Group, *Journal of Clinical Microbiology*, 30, (1992), 2373–78.
49. Jolivet, S., Fines-Guyon, M., Nebbad, B., Merle, J. C., Le Pluart, D., Brun-Buisson, C., Decousser, J.W. and Cattoir, V., "First nosocomial outbreak of vanA-type vancomycin resistant *Enterococcus raffinosus* in France", *The Journal of Hospital Infection*, 94, (2016), 346–50.
50. Richards, M. J., Edwards, J. R., Culver, D. H. and Gaynes, R. P., "Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States", National Nosocomial Infections Surveillance System, *Crit. Care. Med.*, 27, (1999), 887-892.
51. Richards, M. J., Edwards, J. R., Culver, D. H., Gaynes, R. P. and the National Nosocomial Infections Surveillance System, "Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States", *Infect. Control. Hosp., Epidemiol.*, 21, (2000), 510-515.

52. Jett, B. D., Huycke, M. M. and Gilmore, M. S., "Virulence of enterococci", Clin. Microbiol. Rev., 7, (1994), 462-478.
53. Porwancher, R., Sheth, A., Remphrey, S., Taylor, E., Hinkle, C. and Zervos, M., "Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: possible transmission by an electronic ear-probe thermometer", Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 18, (1997), 771-773.
54. Magill S. S., Edwards J. R., Bamberg W, Beldavs Z. G., Dumyati G, Kainer M. A., Lynfield R, *et al.*, "Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections", The New England Journal of Medicine, 370, (2014), 1198–1208.
55. Devriese, L.A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P. and Haesebrouck, F., "Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows", Vet. Microbiol., 70 (1-2), (1999), 87-94.
56. Cauwerts, K., Decostere, A., De Graef, E.M., Haesebrouck, F. and Pasmans, F., "High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene", Avian Pathol., 36 (5), (2007), 395-9.
57. Landman, W.J.M., Mekkes, D.R., Chamanza, R., Doornenbal, P. and Gruys, E., "Arthropathic and amyloidogenic *Enterococcus faecalis* infection in brown layers: A study on infection routes", Avian Pathol., 28, (1999), 545-557.
58. Landman, W.J.M., Veldman, K.T., Mevius, D.J. and Doornenbal, P., "Contamination of Marek's disease vaccine suspensions with *Enterococcus faecalis* and its possible role in amyloid arthropathy", Avian Pathology, 29, (2000), 21–25.
59. Mallet, S., Guesdon, V., Ahmed, A. M. H. and Nys, Y., "Comparison of eggshell hygiene in two housing systems: Standard and furnished cages", Br. Poult. Sci., 47, (2006), 30–35.

- 60.** Hancock, L.E. and Gilmore, M.S., "Pathogenicity of Enterococci", In "Gram-positive Pathogens", Wiley-Blackwell, Editor. ASM Press: Washington D.C., (2006), 299-311.
- 61.** Casadevall, A. and Pirofski, L., "Host-pathogen interactions: the attributes of virulence", *J. Infect. Dis.*, 184, (2001), 337-344.
- 62.** Kuhn, I., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M. A., Dominguez, L., Herrero, I. A. and Möllby, R., "Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - A European study", *Int. J. Food. Microbiol.*, 88 (2-3), (2003), 133-145.
- 63.** Pires-Boucas, P. D., Izumi, E., Furlaneto-Maia, L., Sturion, L. and Suzart, S., "Effects of environmental and nutritional factors on gelatinolytic activity by *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources", *African Journal of Microbiology Research*, 4, (2010), 969-976.
- 64.** Horaud, T. et Le Bouguenec, C., "Streptococcaceae : Genre *Enterococcus*", Dans : "Bactériologie Médicale", Le MINOR L., VERON M., Paris, Flammarion, (1989), 825-828.
- 65.** Francois, N.S. et Mainardi, J.L., "*Enterococcus faecalis* : Aspects bactériologique, épidémiologique et thérapeutique", *Feuil. Biol.*, 39 (220), (1998), 21-26.
- 66.** Lleo, M. M., Tafi, M. C. and Canepari, P., "Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth", *Syst. Appl. Microbiol.*, 21, (1998), 333-339.
- 67.** Kau, A. L., Martin, S. M., Lyon, W., Hayes, E., Caparon, M. G. and Hultgren, S. J., "*Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice", *Infect. Immun.*, 73, (2005), 2461-2468.

68. Filloux, A. and Vallet, I., "Biofilm: set-up and organization of a bacterial community", *Med. Sci.*, (Paris) 19, (2003), 77-83.
69. Kayaoglu, G. and Ørstavik, D., "Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease", *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 15, (2004), 308-320.
70. Laurent Hebert, M., "Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*", Thèse de Doctorat de L'Université de Caen, (2008).
71. Chevalier, P. et Dutil, L., "L'usage des substances antimicrobiennes en production animale : position des experts et des gouvernements", INSP Québec, (2012), 5p.
72. Archambault, M. et Blouin, J., "Évaluation de l'impact de l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antibiotiques à des fins thérapeutiques et préventives en médecine vétérinaire", (2006), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 273p.
73. Wax, R.G., Salyers, A.A. and Taber, H., "Bacterial Resistance to Antimicrobials", Second ed., ed. L.K. Boca Raton, FL: CRC Press, (2008).
74. Salyers, A.A. and Whitt, D.D., "Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach", 2nd ed., Washington, D.C.: ASM Press, (2001), 539p.
75. Auckenthaler, R., "Activité antibactérienne, spectre, mode d'action et cibles bactériennes", Dans : "Antibiothérapie en pratique clinique", Bergogne-Bérézin, E. et Dellamonica, P., Masson, Paris, (1999), 17-32.
76. Greenwood, D. and Whitley, R., "Modes of action", In: "Antibiotic and chemotherapy", Finch, R.G., Greenwood, D., Ragnar Norrby S. and Whitley, R.J., Churchill Livingstone, 8th edition, (2003), 11-14.
77. Alanis, A.J., "Resistance to antibiotics: are we in post-antibiotic Era?", *Archives of Medical Research*, 36, (2005), 697-705.

- 78.** Archambault, M., “Évaluation de l'impact de l'interdiction des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et de la modification de l'utilisation des antimicrobiens comme moyens thérapeutiques et préventifs en médecine vétérinaire”, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire: Saint-Hyacinthe. (2004), 1-35.
- 79.** Klopfenstein, C., “ Les antibiotiques comme facteur de croissance; un risque pour la santé humaine? ”, Porc Québec, (Juin 2004), 4p.
- 80.** Stokestad, E.L.R. and Jukes, T.H., “Further observations on the (animal protein factor)”, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 73, (1950), 523-528.
- 81.** McEwen, S., “ L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation: les conséquences pour la résistance et la santé humaine”, Collège de médecine vétérinaire de l'Ontario, University of Guelph: Ontario, (2002), 200p.
- 82.** M.S.P.R.H. et M.A.D.R., “ Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire) ”, 6^{ème} Edition, (2011).
- 83.** Muylaert, A. et Mainil, J.G., “Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité » ”, Ann. Méd. Vét., 156, (2012), 109- 123.
- 84.** Alekshun, M.N. and Levy, S.B., “Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance”. Cell., 128, (2007), 1037-1050.
- 85.** Marshall, B., Petrowski, D. and Levy, S.B., “Inter- and intraspecies spread of Escherichia coli in a farm environment in the absence of antibiotic usage”, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, (1990), 6609-6613.
- 86.** Salyers, A.A. and Amabile-Cuevas, C.F., “Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?”, Antimicrob. Agents Chemother., 41, (1997), 2321-2325.
- 87.** Levy, S.B., “Multidrug resistance--a sign of the times”, N. Engl. J. Med., 338, (1998), 1376-1378.

- 88.** Boerlin, P. and White, D.g., "Antimicrobial resistance and its epidemiology", In: "Antimicrobial Therapy in Veterinary Medecine", Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. and Dowling, P.M. (Eds), Fourth Edition, Blackwell publishing: Ames, (2006), 27-43.
- 89.** Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., Mcewen, S.A., Friendship, R. and Archambault, M., "Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, (2005), 6753-6761.
- 90.** Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S. and Bager, F., "Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, (2001), 2054-2059.
- 91.** Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F.M., Frey, J. and Nicolet, J., "Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs", *J. Clin. Microbiol.*, 39, (2001), 4193-4195.
- 92.** Salyers, A.A., Gupta, A. and Wang, Y., "Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes", *Trends Microbiol.*, 12, (2004), 412-416.
- 93.** D'costa, V.M., Griffiths, E. and Wright, G.D., "Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity", *Curr. Opin. Microbiol.*, 10, (2007), 481-489.
- 94.** Kostich, M.S. and Lazorchak, J.M., "Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use", *Sci. Total Environ.*, 389, (2008), 329-339.
- 95.** Sorensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz, S., "Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review", *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(9), (2005), 700-10.

96. Thomas, C.M., "Evolution and population genetics of bacterial plasmids", In "Plasmid Biology", Funnal, B.E. and Philips, G.J., Editors, ASM Press: Washington, D.C., (2004), 509-528.
97. Li, X.Z., "Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25, (2005), 453-463.
98. Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. and Hooper, D.C., "Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*", *Clin. Infect. Dis.*, 43, (2006), 297-304.
99. Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A. and Hooper, D.C., "qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, (2006), 1178-1182.
100. Sherley, M., Gordon, D.M. and Collignon, P.J., "Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*", *Microbiology*, 150, (2004), 1539-1546.
101. Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S. and White, D.G., "Genetics of antimicrobial resistance", *Anim. Biotechnol.*, 17, (2006), 111-124.
102. Snyder, L. and Champness, W., "Molecular Genetics of Bacteria", Third ed, ed., Washington, D.C.: ASM Press, (2007).
103. Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. and Li, L.Y., "Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements", *Microbiol. Rev.*, 59, (1995), 579-590.
104. Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O. and Toussaint, A., "Mobile genetic elements: the agents of open source evolution", *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, (2005), 722-732.
105. Toleman, M.A., Bennett, P.M. and Walsh, T.R., "ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, (2006), 296-316.

106. Bennett, P.M., "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria", *Br. J. Pharmacol.*, 153: Suppl 1, (2008), S347-357.
107. Boerlin, P. and Reid-Smith, R.J., "Antimicrobial resistance: its emergence and transmission", *Anim. Health Res. Rev.*, 9, (2008), 115-126.
108. Ploy, M.C., Lambert, T., Couty, J.P. and Denis, F., "Integrins: an antibiotic resistance gene capture and expression system", *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38(6), (2000), 483-7.
109. Aarestrup, F., "The origin, evolution, and local and global dissemination of antimicrobial resistance", In: "Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin", Aarestrup, F.M., (Ed.), ASM Press: Washington, (2006), 339-359.
110. Davies, J. and Davies, D., "Origins and evolution of antibiotic resistance", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74, (2010), 417-433.
111. Paulsen, I.T., et al., "Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*", *Science*, 299 (5615), (2003), 2071-4.
112. Juhas M., Van Der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W. and Crook, D.W., "Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution", *FEMS Microbiol. Rev.*, 33, (2009), 376-393.
113. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. and Guedon G., "Conjugative transposons: the tip of the iceberg", *Mol. Microbiol.*, 46, (2002), 601-610.
114. Guardabassi, L. and Courvalin, P., "Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance", In: "Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin", Aarestrup, F.M. (Ed.), ASM Press: Washington, (2006), 1-18.
115. Nikaido, H., "Multidrug resistance in bacteria", *Annu. Rev. Biochem.*, 78, (2009), 119-146.

116. Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., Briales, A., Garcia I., Conejo, M.C. and Pascual, A., "Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria", *J. Antimicrob. Chemother.*, 61, (2008), 1240-1243.
117. Robicsek, A., Jacoby, G.A. and Hooper D.C., "The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance". *Lancet Infect. Dis.*, 6, (2006), 629-640.
118. Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia S. and Aarestrup, F.M., "qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* sérovar Kentucky and *Bovis morbificans* strains of human origin", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, (2009), 603-608.
119. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S. and Hooper, D.C., "New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, (2009), 1892-1897.
120. Facklam, R.R., Carvalho, M.G.S. and Teixeira, L.M., "History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci", In: "The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance", Gilmore, M.S. Editor. ASM Press: Washington, D.C., (2002), 1-54.
121. Simjee, S., Jensen, L.B., Donabedian, S.M. and Zervos, M.J., "Enterococcus", In: "Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin", Aarestrup, F.M., Editor. ASM Press: Washington, (2006), 315-328.
122. Eliopoulos, G.M., "Antimicrobial resistance in the Enterococcus", In: "Bacterial Resistance to Antimicrobials", Wax, R.G., Salyers, A.A., Taber, H., Editor. CRC Press, (2008), 255p.
123. Vanden Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E., "Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14(4), (2000a), 327-35.
124. Giraffa, G., "Enterococci from foods", *FEMS. Microbiol. Rev.*, 26(2), (2002), 163-71.

125. Teixeira, L. and Facklam, R., "Enterococcus", In: "Manual of Clinical Microbiology", (2003), 422-433.
126. "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals", Approved Standard, Third Edition, CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Vol. 28, No.8, (2008).
127. Fluit, A.C., "Genetic Methods for Detecting Bacterial Resistance Genes", In: "Bacterial Resistance to Antimicrobials", Wax R.G., Salyers, A.A., Taber, H., Editor, CRC Press, (2008), 183-227.
128. Garneau, P., Labrecque, O., Maynard, C., Messier, S., Masson, L., Archambault, M. and Harel, J., "Use of a bacterial antimicrobial resistance gene microarray for the identification of resistant *Staphylococcus aureus*", *Zoonoses Public Health*, 57 Suppl 1, (2010), 94-9.
129. Frye, J.G., Lindsey, R.L., Rondeau, G., Porwollik, S., Long, F., McClelland, M., Jackson, C.R., Englen, M.D., Meinersmann, R.J., Berrang, M.E., Davis, J.A., Barrett, J.B., Turpin, J.B., Thitaram, S.N. and Fedorka-Cray, P.J., "Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database", *Microb. Drug Resist.*, 16(1), (2009), 9-19.
130. Champagne, J., Diarra, M.S., Rempel, H., Topp, E., Greer, C.W., Harel, J. and Masson, L., "Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry", *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(8), (2011), 2625-33.
131. Tang, Y.W., Procop, G.W. and Persing, D.H., "Molecular diagnostics of infectious diseases", *Clin. Chem.*, 43, (1997), 2021-38.
132. Cockerill, F.R. 3rd, "Genetic methods for assessing antimicrobial resistance", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, (1999), 199-212.
133. Wolk, D., Mitchell, S. and Patel, R., "Principles of molecular microbiology testing methods", *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 15 (4), (2001), 1157-204.

134. Top, J., Willems, R., and Bonten, M., "Emergence of CC17 Enterococcus faecium: from commensal to hospital-adapted pathogen", FEMS. Immunol. Med. Microbiol., 52 (3), (2008), 297-308.
135. Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Shewmaker, P. L., and Facklam, R. R., "Enterococcus", In Murray, P. R. (Ed.), "Manual of Clinical Microbiology", Washington D.C.: ASM, (2011), 350-364.
136. Pepper, K., Horaud, T., Le bouguenec, D. and Cespedes, G., "Location of antibiotic resistance markers in clinical isolates of Enterococcus faecalis with similar antibiotypes", J. Antimicrob. Agents Chemother., 31 (9), (1987), 1394-402.
137. Sigler, A.J. and Hennen, M.T., "Antibiotic Resistance in Clinically Important Gram positive Cocci", Infect. Med., 10 (12), (1993), 20p, 37-40, 43p.
138. Dutka-Malen, S. et Courvalin, P., "Résistance aux glycopeptides et aux aminosides chez les entérocoques", Méd. Mal. Infect., 24, (1994a), 158-164.
139. Robert-Dernuet, S., " Antibiotiques et antibiogrammes", Paris - Montréal, Vigot- Décarie, (1995), 322p.
140. Mainardi, J.L., Goldstein, F.W. et Gutmann, L., " Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques", Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, 8-006-N-10, (1996), 8p.
141. Francois, N.S. et Mainardi, J.L., "Enterococcus faecalis : Aspects bactériologique, épidémiologique et Thérapeutique", Feuil. Biol., 39 (220), (1998), 21-26.
142. Jupeau-Vessieres, A.M. et Scavizzi, M.R., "Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques", Encycl. Méd. Chir., (Paris - FRANCE), Maladies Infectieuses, 8-006-0-10, (1994), 16p.
143. Flores, M.R., Haley, J.A., Ross, T.W. and Lee, H., "Vancomycin Resistant Enterococci: approach to treatment and control", Canc. contr. J., 3 (1), (1996), 1- 8.

144. Stosor, V., Noskin, G.A. and Peterson, L.R., "The Management and Prevention of Vancomycin resistant Enterococci", *Infect. Med.*, 13 (6), (1996), 487-488, 493-498.
145. Tailor, S. A., Bailey, E. M., and Rybak, M. J., "Enterococcus, an emerging pathogen", *Ann.Pharmacother.*, 27 (10),(1993), 1231-1242.
146. Cattoir, V. and Giard, J.C., "Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates", *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12, (2014), 239–48.
147. Singh, K.V., Weinstock, G.M. and Murray, B.E., "An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 (6), (2002), 1845-50.
148. Fantin, B., Leclercq, R., Arthur, M., Duval, J. and Carbon, C., "Influence of low-level resistance to vancomycin on efficacy of teicoplanin and vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecium*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, (1991), 1570-5.
149. Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Duval, J. and Courvalin, P., "Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, (1992), 2005-8.
150. Dutka-Malen, S., Blaimont, B., Wauters, G. and Courvalin, P., "Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, (1994b), 1675-7.
151. Tremblay, C.L., "Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec", Thèse de Doctorat, Université de Montréal, (2012).
152. Cattoir, V. and Leclercq, R., "Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: Is it time to divorce?", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (4), (2013), 731–42.

- 153.** Rhinehart, E., Smith, N. E., Wennersten, C., Gorss, E., Freeman, J., Eliopoulos, G. M. et al., "Rapid dissemination of beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward", *N. Engl. J. Med.*, 323(26), (1990), 1814-1818.
- 154.** Karanfil, L. V., Murphy, M., Josephson, A., Gaynes, R., Mandel, L., Hill, B. C. et al., "A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit", *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 13(4), (1992), 195-200.
- 155.** Livornese, L. L. Jr., Dias, S., Samel, C., Romanowski, B., Taylor, S., May, P. et al., "Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers", *Ann. Intern. Med.*, 117(2), (1992), 112-116.
- 156.** Wells, V. D., Wong, E. S., Murray, B. E., Coudron, P. E., Williams, D. S. and Markowitz, S. M. "Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*", *Ann. Intern. Med.*, 116(4), (1992), 285-292.
- 157.** Boyce, J. M., Opal, S. M., Chow, J. W., Zervos, M. J., Potter-Bynoe, G., Sherman, C. B., Romulo, R.L., Fortna, S. and Medeiros, A.A., "Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance", *J. Clin. Microbiol.*, 32(5), (1994), 1148-1153.
- 158.** Morris, J. G. Jr., Shay, D. K., Hebden, J. N., McCarter, R. J. Jr., Perdue, B. E., Jarvis, W. et al., "Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center", *Ann. Intern. Med.*, 123(4), (1995), 250-259.
- 159.** Leclercq, R. et Courvalin, P., "Resistance to glycopeptides in enterococci", *Clin. Infect. Dis.*, 24(4), (1997), 545-554.
- 160.** Shlaes, D. M., "Vancomycin-resistant bacteria", *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 13(4), (1992), 193-194.

- 161.** Arthur, M. and Courvalin, P., "Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37(8), (1993), 1563-71.
- 162.** Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A. et al., "Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe", *Euro. Surveill.*, 13(47), (2008).
- 163.** Xu, X., Lin, D., Yan, G., Ye, X., Wu, S., Guo, Y. et al., "VanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(11), (2010), 4643-4647.
- 164.** Lebreton, F., Depardieu, F., Bourdon, N., Fines-Guyon, M., Berger, P., Camiade, S. et al., "D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(10), (2011), 4606-4612.
- 165.** Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J. and Courvalin, P., "Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, (1989), 10-15.
- 166.** Arias, C.A., Panesso, D., McGrath, D.M., Qin, X., Mojica, M.F., Miller, C., Diaz, L., et al., "Genetic basis for in vivo Daptomycin resistance in Enterococci", *The New England Journal of Medicine*, 365, (2011), 892–900.
- 167.** Munita, J. M., Mishra, N. N., Alvarez, D., Tran, T. T., Diaz, L., Panesso, D., Reyes, J., et al., "Failure of high-dose daptomycin for bacteremia caused by daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* harboring LiaSR substitutions", *Clinical Infectious Diseases*, 59, (2014), 1277- 80.
- 168.** Cattoir, V., Isnard, C., Cosquer, T., Odhiambo, A., Bucquet, F., Guérin, F. and Giard, J.C., "Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (1), (2015), 239–44.
- 169.** Sinel, C., Cosquer, T., Auzou, M., Goux, D., Giard, J.C. and Cattoir, V., "Sequential steps of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* and

reversion to hypersusceptibility through Is-mediated inactivation of the *liaFSR* operon”, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(10), (2016), 2793-2797.

170. Cetinkaya, Y., Falk, P. and Mayhall, C. G., “Vancomycin-Resistant Enterococci”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, (2000), 686–707.
171. Van Harten, R. M., Willems, R. J. L., Martin, N. I. and Hendrickx, A. P. A., “Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies?”, *Trends Microbiol.*, 25, (2017), 467–479.
172. Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. and Jensen, L.B., “Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 37(2), (2000), 127-37.
173. Butaye, P., Devriese, L.A. and Haesebrouck, F., “Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(5), (2001), 1374-8.
174. Hayes, J.R., Wagner, D.D., English, L.L., Carr, L.E. and Joseph, S.W., “Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 55(1), (2005), 123-6.
175. Hershberger, E., Oprea, S.F., Donabedian, S.M., Perri, M., Bozigar, P., Bartlett, P. and Zervos, M.J., “Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 55(1), (2005), 127-30.
176. Getachew, Y.M., Hassan, L., Zakaria, Z., Saleha, A.A., Kamaruddin, M.I. and Che Zalina, M.Z., “Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from broilers in Selangor, Malaysia”, *Trop. Biomed.*, 26(3), (2009), 280-8.

- 177.** Diarra, M.S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J. and Topp, E., "Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp: Characterization of Isolates from Broiler Chickens", *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(24), (2010), 8033-43.
- 178.** Soltani, M., Beighton, D., Howard, J.P. and Woodford, N., "Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(2), (2000), 433-6.
- 179.** Petsaris Odile , Fabien Mischczak, Mireille Gicquel-Bruneau, Agnès Perrin-Guyomard, Florence Humbert, Pascal Sanders and Roland Leclercq, "Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5), (2005), 2796-9.
- 180.** Jung, Y.H., Eun Shim Shin, Okgene Kim, Jung Sik Yoo, Kyeong Min Lee, Jae Il Yoo, Gyung Tae Chung and Yeong Seon Lee, "Characterization of two new genes, *vgaD* and *vatG*, conferring resistance to streptogramin A in *Enterococcus faecium*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(11), (2010), 4744–4749.
- 181.** Frye, J.G., et al., "Related Antimicrobial Resistance Genes Detected in Different Bacterial Species Co-isolated from Swine Fecal Samples", *Foodborne Pathog. Dis.*, (2011).
- 182.** Chiew, Y.F., Yeo, S.F., Hall, L.M. and Livermore, D.M., "Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*", *J. Antimicrob. Chemother.*, 41, (1998), 247-251.
- 183.** Cochran, W. G., "Sampling techniques", 3rd edition, Wiley and Sons, New York, (1977).
- 184.** Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénet, J.J., Shaw, A., Moutou, F., Louza, A., "Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures", 2^{ième} édition AEEMA, France, (2001), 542 p.

- 185.** Ferrah, "Bases économiques et techniques de l'industrie d'accoupage chair et ponte en Algérie", Edition : Bulletin technique de l'I.T.P.E., (1996).
- 186.** Brugere, H., "Pharmacologie chez les oiseaux", Dans : Manuel de pathologie aviaire, Edition : Jeanne Brugere-Picoux et Amer Silim, (1992), 355-361.
- 187.** Fontaine, M. et Cadoré, J.L., " Vade-mecum du vétérinaire ", Vigot, 16^{ème} édition, (1995).
- 188.** Villemin, P., Brugere, H. et Brugere-Picoux, J., "Le traitement des infections respiratoires des volailles", Recueil de la Médecine Vétérinaire, 160 (11), (1984), 1117-1128.
- 189.** Richard, Y., Guillot, J.F., Lafont, J.P., Chaslus-Dancla, E. et Oudra, J., "Antibiothérapie : Antibiorésistance et écologie microbienne", Revue de la Médecine Vétérinaire, 133, n° 3, (1982), 153-167.
- 190.** Gogny, M., Puyt, J-D., Pellerin, J .L. *et al.*, "Classification des principes actifs", Dans : L'arsenal thérapeutique vétérinaire : Antibactérien et antiseptique, Edition : Point vétérinaire, (1999).
- 191.** Messai, A., "Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles", Thèse de Magister, Université de Constantine, (2006).
- 192.** Sanders, P., "L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale", Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 158, n°2, (2005), 139-145.
- 193.** Mogenet, L. and Fedida, D., "Rational antibiotherapy in poultry farming", Edition: CEVA, (1998).
- 194.** Martel, J.L., "Critères de choix d'un antibiotique, Epidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez l'animal", Epidem. Sante. Anim., 29, (1996), 107-120.

195. Calfee, D.P., Giannetta, E.T., Durbin, L.J. Germanson, T.P. and Farr, B.M., "Control of endemic vancomycin-resistant *Enterococcus* among inpatients at a university hospital", *Clinical Infectious Diseases*; 37(3), (2003), 326-32.
196. bioMérieux SA, "api[®] 20 Strep, Système d'identification des *Streptococcaceae* et germes apparentés", Ref 20 600, Lyon France, (2010).
197. bioMérieux SA, "rapid ID 32 STREP, Système d'identification des *Streptococcaceae* et germes apparentés en 4 heures", Ref 32 600, Lyon France, (2010).
198. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing". 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA. (2017).
199. Aslam, M., Diarra, M.S., Checkley, S., Bohaychuk, V and Masson, L., "Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. Isolated from retail meats in Alberta, Canada", *International Journal of Food Microbiology*, 156, (2012), 222–230.
200. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B. *et al.*, "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance", *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, (2012), 268–81.
201. Graham, J. P., Evans, S. L., Price, L. B. and Silbergeld, E. K., "Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter", *Environ. Res.*, 109, (2009), 682–689.
202. Yildiz O. and Turkyilmaz S., "Investigation of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* strains isolated from mastitic bovine milk", *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 70(4), (2015), 15–21.

- 203.** Pillay, S., Zishiri, O.T. and Adeleke, M.A., “Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock”, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 85(1), (2018), a1583.
- 204.** Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Barrett, J. B. and Ladely, S. R., “Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses”, *Avian Dis.*, 48, (2004), 100–107.
- 205.** Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, K., Lee, S.N., Ko, G., Sadowsky, M.J. and Hur, H.G., “The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea”, *International Journal of Food Microbiology*, 144, (2011), 387–392.
- 206.** Ngbede, E.O., Raji, M.A., Kwanashie, C.N. and Kwaga, J.K.P., “Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria”, *Tropical Animal Health and Production*, 49(3), (2017), 451–458.
- 207.** Ali, S.A., Hasan, K.A., Bin Asif, H. and Abbasi, A., “Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan”, *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), (2014), 423–432.
- 208.** Ünal, N., Aşkar, Ş. and Yildirim, M., “Antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from broiler cloacal samples”, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(2), (2017), 199–203.
- 209.** Manero, A. and Blanch, A.R., “Identification of *Enterococcus* spp. With a biochemical key”, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, (1999), 4425–4430.
- 210.** Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Jackson-Hall, M.C. and Hiott, L.M., “Effect of media, temperature and culture conditions on the species population

and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens”, *Letters in Applied Microbiology*, 41, (2005), 262–268.

211. Jones, R.N., Sader, H.S., Erwin, M.E. and Anderson, S.C., “Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates: Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 21 (2), (1995), 85-93.
212. Streff, K., Jean Pierre, H., Darbas, H. and Paillisson, J., “Enterocoques au CHRU de Montpellier durant le mois de septembre 1993 : espèces isolées, répartition en fonction du prélèvement, rôle pathogène, sensibilité aux bêtalactamines, aminosides, glycopeptides”, *Méd. Mal. Infect.*, 26, (1996), 704-13.
213. Huycke, M. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. S., “Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future”, *Emerging Infectious Diseases*, 4, (1998), 239–49.
214. Top, J., Willems, R., Blok, H., de Regt, M., Jalink, K., Troelstra, A., Goorhuis, B. and Bonten, M. J. M., “Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant Clonal Complex 17 *Enterococcus faecium*”, *Clinical Microbiology and Infection*, 13, (2007), 316–19.
215. Sánchez-Díaz, A. M., Cuartero, C., Rodríguez, J. D., Lozano, S., Alonso, J. M., Rodríguez Domínguez, M., Tedim, A. P., *et al.*, “The rise of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematological neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: A risk for bacteraemia?”, *Clinical Microbiology and Infection*, 22, (2016), 59p.
216. Persoons, D., Dewulf, J., Smet, A., Herman, L., Heyndrickx, M., Martel, A., Catry, B., Butaye, P. and Haesebrouck, F., “Prevalence and persistence of antimicrobial resistance in broiler indicator bacteria”, *Microb. Drug Resist.*, 16, (2010), 67–74.

- 217.** Chopra, I. and Roberts, M., "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, (2001), 232–260.
- 218.** Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Communian, R., Zanetti, S., Dupré, I., *et al.*, "Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin", *International Journal of Food Microbiology*, 88, (2003), 291–304.
- 219.** Choi, J.-M. and Woo, G.J., "Molecular characterization of high-level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea", *International Journal of Food Microbiology*, 165, (2013), 1–6.
- 220.** Klibi, N., Ben Said, L., Jouini, A., Ben Slama, K., López, M., Ben Sallem, R., Boudabous, A. and Torres, C., "Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia", *Meat Science*, 93, (2013), 675–680.
- 221.** Valenzuela, A.S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M. and Gálvez, A., "Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from sea foods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances", *Food Microbiology*, 27, (2010), 955-961.
- 222.** Halfaoui, Z., Menoueri, N.M. and Bendali, L.M., "Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria", *Veterinary World*, 10(7), (2017), 830-835.
- 223.** Aggoune, N., Chabani, A., Tiouit, D., Naim, M. et Rahal, K., "Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie", *Med. Mal. Infect.*, 38, (2008), 557-8.
- 224.** Hamidi, M., Ammari, H., Ghaffor, M., Benamrouche, N., Tali-Maamar, H., Tala-Khir, F., Younsi, M. et Rahal, K., "Émergence d'*Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides en Algérie: à propos d'un cas", *Ann. Biol. Clin.*, 71(1), (2013), 104-6.

- 225.** Bager, F., Madsen, M., Christensen, J. and Aarestrup, F.M., "Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms", *Prev. Vet. Med.*, 31, (1997), 95-112.
- 226.** European Communities, Directive 97/6/CE (ODEC30/01/97), (1997).
- 227.** Pavia, M., Nobile, C.G.A., Salpietro, L. and Angelillo, I.F., "Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat", *J. Food Prot.*, 63, (2000), 912–915.
- 228.** Bager, F., Aarestrup, F.M., Madsen, M. and Wegener, H.C., "Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcine", *Microbial Drug Resistance*, 5, (1999), 53–56.
- 229.** Klare, I., Badstubner, D., Konstabel, C., Bohme, G., Claus, H. and Witte, W., "Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcine usage in animal husbandry", *Microbial Drug Resistance*, 5, (1999), 45–52.
- 230.** Pantosti, A., DelGrosso, M., Tagliabue, S., Macri, A., Caprioli, A., "Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcine ban", *Lancet* 354, (1999), 741–742.
- 231.** Vanden Bogarrd, A.E., Bruinsma, N. and Stobberingh, E.E., "The effect of banning avoparcine on VRE carriage in The Netherlands", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, (2000b), 146–148.
- 232.** Borgen, K., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., Wasteson, Y., Olsvik, O. and Kruse, H., "Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcine was banned", *Journal of Applied Microbiology*, 89, (2000), 478–485.
- 233.** Borgen, K., Sørum, M., Wasteson, Y. and Kruse, H., "VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses

3 years after avoparcine was banned”, *International Journal of Food Microbiology*, 64, (2001), 89–94.

- 234.** Jung, W.K., Lim, J.Y., Kwon, N.H., Kim, J.M., Hong, S.K., Koo, H.C., Kim, S.H. and Park, Y.H., “Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea”, *International Journal of Food Microbiology*, 113, (2007), 102–107.
- 235.** López, M., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martínez, S., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M. and Torres, C., “Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425”, *International Journal of Food Microbiology*, 133, (2009), 172–178.
- 236.** Austin, D.J., Kristinsson, K.G., Anderson, R.M., “The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, (1999), 1152–1156.
- 237.** Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G. and Witte, W., “Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 88, (2003), 269–290.