République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science de la Nature et de la Vie
Option : Pharmacologie Moléculaire

Réf:.....

Mémoire de Fin d'Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement, identification et caractérisation des entérocoques multirésistants isolés au CHU de Bejaia

Présenté par :
HAMCHACHE Zohra &OUGHLICI Bahia

Soutenu le : **11 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Melle AYOUNI Karima	MAA	President
Mr LADJOUZI Rabia	MCB	Encadreur
Melle ADRAR Sabah	MAB	Examinateur

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier celui qui nous a Protégé, aidé, et soutenu, jusqu'à pouvoir « mener la graine au fruit » nous nous inclinons pour dire : « Dieu Merci ».

Nous tenons à remercier vivement Melle. AYOUNI K. d'avoir accepté de présider le jury ainsi que Melle ADRAR S. d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements les plus chaleureux et les plus vifs s'adressent d'abord à notre promoteur, Monsieur LADJOUZI R, pour son entière disponibilité ainsi que ses grandes aides, orientations et conseils et que sans lui, le présent travail ne serait jamais abouti.

Nos sincères remerciements s'adressent aux responsables du Laboratoire de CHU de Bejaia Dr AZOUAOU Qui nous a confié des souches bactériennes.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux responsables du laboratoire Dr Ait BACHIR N. qui nous a accueilli pour un stage pratique au sein de son laboratoire.

Dédicace

Grâce à notre bonne volonté, notre acharnement, Dieu tout puissant nous a donné la force et le courage pour la réalisation de notre mémoire.

Je dédié ce modeste travail tout d'abord à mes très chers parents particulièrement à ma mère qui ma soutenu moralement, financièrement et qui n'a jamais cessé de prier pour moi durant tous mon cursus. Que Dieu vous protège.

A mes chers frères, sœurs, vous qui êtes toujours là pour moi, et à ma belle-sœur.

A mesoncles et leurs familles.

A mescousins et cousines.

A vous mes adorables nièces et neveux.

A mon cherbinôme Zohra ainsi que sa famille.

A tous mes amis (es) et tous ceux qui nous sont chers.

A toute la promotionPharmacologiee2014-2015.

AToutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce Travail de prés ou de loin et ont tout fait pour que je Réussisse

Bahia

Dédicaces

Dédicace

Grâce à notre bonne volonté, notre acharnement, Dieu tout puissant nous a donné la force et le courage pour la réalisation de notre mémoire

Je dédie ce modeste travail :
Tout d'abord à mon chers père et à ma très chère mère qui ont tant donné tout afin de continuer et réussir mes études, que Dieu les protège et leur accorde une longue vie.

A Bahia, pour son aide, sa présence et surtout pour sa patience.

A Mes adorables sœurs :Lila, Rahima et Hayat que j'aime.
A mon grand et unique frère Achour à qui je souhaite beaucoup de succès dans sa vie.
A mes nièces et neveux

A mes très chers oncles et tantes

A MES AMIES

A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

A toute la promotion Master II de pharmacologie 2015

Zohra.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

I. Introduction bibliographique

I. 1. Généralités et propriétés physiologiques et biochimiques des entérocoques 1

I. 2. Implication des entérocoques dans les infections nosocomiales 2

I. 2. 1. Infections nosocomiales 2

I. 2. 2. Les infections à Entérocoques 3

I. 3. Etat des infections aux entérocoques en Algérie 5

II. Matériels et Méthodes 6

II.1.Échantillonnages 6

II.2. Isolement sur gélose à la bile, esculine et azide de sodium (BEA) 7

II.3. Examens direct 8

II.3.1.Coloration de Gram 8

II.3.2.Test catalase 9

II.4. Cinétique de croissance sur Gm17 9

II.5.Croissance sur un Bouillon Hyper Salé 10

II.6. Résistance à la chaleur 10

II.7. Identification par Bruker Daltonik MALDI Biotyper 10

II.8.Antibiogramme 11

II.9. Analyse de la tolérance des entérocoques à la vancomycine 12

III. Résultats et discussions 13

III. 1. Résultats de la recherche des entérocoques dans les centres médicaux de la région de Bejaia 13

III. 2.Caractérisation des souches cliniques isolées au CHU de Bejaia 14

III. 3. Identification des souches par spectromètre de masse MALDI-TOF. 20

III. 4. Résultats des phénotypes de résistances des isolats cliniques..... 23

III.5. Analyse de la tolérance à la vancomycine..... 28

Conclusion & Perspectives 30

Références bibliographiques 31

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique.
API	Ampicilline
ARN	Acide Ribonucléique.
BMR	Bacteries Multi Resistantes
BEA	Bile Esculine Azide
CLIN	Comités de Luttes contre les Infections Nosocomiales
CMN	Clindamycine
CHL	Chloramphénicol
CHU	Centre Hospitalier Universitaire**.**
DO600	Densite Optique à 600nm
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System.
ECBU	Examen Cytobactériologie des Urines.
ERY	Erythromycine
I	Intermédiaire.
InVS	Institut nationale de Veille Sanitaire.
IPM	Imipénème
GME	Gentamycine
Kan	Kanamycine
LAB	Lactic Acide Bacteria.
LIN	Linomycine
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance.
NOR	Norfloxacine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTN	Pristinamycine
R	Résistant.
RIF	Rifamicine
S	Sensible.
STR	Streptomycine
TEC	Teicoplanine
TIG	Tigecycline
TET	Tétracyclines
VRE	Vancomycin Resistant Enterococci
UFC	Unités Formant Colonies

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : La collection des souches d'entérocoques au niveau de l'hôpital Khelil Amrane.. 6

Tableau II : Caractérisation des entérocoques isolés au CHU de Bejaia..... 15

Tableau III: Correspondances des scores pour l'identification des espèces 20

Tableau IV : Résultats d'identification par spectroscopie de mass (type BrukerDaltonik MALDI Biotyper) des souches cliniques isolées au CHU de Bejaia. 21

Tableau V : Résultats d'identification et de l'antibiogramme complet des souches cliniques isolées au CHU de Bejaia 26

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les entérocoques observés sous un microscope électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite) (Ladjouzi, 2013) 1

Figure 2: Principaux micro-organismes responsables des infections-nosocomiales. 3

Figure 3: BrukerDaltonik MALDI Biotyper **(CHU de Caen, France)**..... 11

Figure 4: Répartition des souches selon l'origine de prélèvement. 16

Figure 5 : Milieu BEA et milieu GM17 avant (A)et après (B) isolement..... 17

Figure 6 : Des entérocoques observés au microscope optique après la coloration de Gram (Gr x100)..... 17

Figure 7 : Résultat d'un test catalase positif (à gauche) et un test catalase négatif (à droite). 18

Figure 8: Résultat d'un test de résistance à la chaleur (à gauche) et un test de croissance sur un milieu hyper salé (à droite)..... 19

Figure 9 : Cinétique de croissance des souches bactériennes 19

Figure 10 : Répartition des souches selon les espèces 23

Figure 11 : Taux de résistances des entérocoques aux différents antibiotiques testés 27

Figure 12 : Survie des souches d'*Enterocuccus faecalis* et *Enterococcus faecium* à la vancomycine (15 µg/ml). 28

I. Introduction Bibliographique

I. 1. Généralités et propriétés physiologiques et biochimiques des entérocoques

En 1899, Thiercelin réalisa la description originelle et officielle d'une bactérie Gram positive de forme sphérique en diplocoque, d'origine intestinale pour laquelle il donna le nom *Enterococcus* (du grec enteron, intestin). Par la suite en 1906, Andreweset Horder introduisirent le nom de *Streptococcus faecaliset Streptococcus faicium* pour disigner des streptocoques ayant des caractéristiques similaires à celles des entérocoques décrites par Thiercelin et Jouhaud. Afin de mettre fin à cette confusion, les résultats des techniques de chimio-taxonomie et de génétique moléculaire : hybridation ADN-ADN, et de séquençage des oligonucléotides de la sous unité 16S de I'ARN ribosomique ont permis de montrer que les espèces *S. faecalis*et *S. faecium*étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier la création du genre *Enterococcus*en 1984 **(Schleifer *et al.*, 1984).** Depuis, ces deux espèces ont été nommées *Enterococcus faecium*et *Enterococcus faecalis*, respectivement **(Schleifer& Kilpper-Balz.,1984).** Actuellement, 44 espèces forment le genre *Enterococcus* de la famille des *Enterococcaceae*, ordre des *Lactobacillales* issus de l'embranchement des Firmicutes **(Aguilar-Galvez *et al.,2012* ;Ladjouzi, 2013).**

Les entérocoques sont des coques à Gram positif (figure 1), anaérobie facultatifs, non sporulants, majoritairement immobiles et considérés comme catalase négative bien que le gène codant cette enzyme soit présent au sein de leur génome **(Devriese *et al.*, 1993; Frankenberg *et al.*, 2002).** Ils appartiennent pour la plupart au groupe sérologique D de la classification de Lancefield **(Lancefield, 1933).** Les entérocoques sont le plus souvent en diplocoques, parfois en courtes chaînettes. À l'examen direct, ils sont difficilement différentiables des autres streptocoques **(Hoen *et al.*, 2002)**. Les cellules des entérocoques sont sphériques ou ovoïdes, de taille variant de 0,6 à 2 µm sur 0,6 à 2,5 µm **(Flahaut *et al.*,1997).**

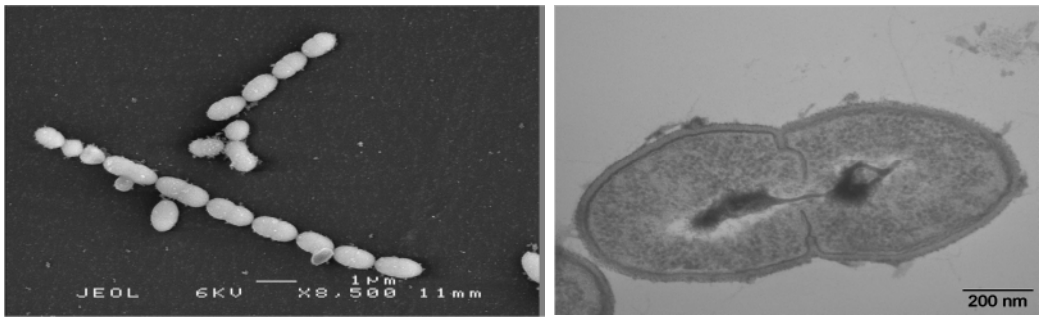


Figure 1 : Les entérocoques observés sous un microscope électronique à balayage (à gauche) et à transmission (à droite) **(Ladjouzi, 2013)**

Les entérocoques hydrolysent l'esculine et supportent la bile permettent ainsi un dépistage rapide sur un milieu sélectif (à l'exemple de BEA). Capables de survivre à des conditions hostiles : Culture à 10°C et 40°C, voire même survie à 60°C pendant30 minutes, mais aussi en présence de 40% de bile et à pH= 9,6 et en présence de NaCl à 6,5% (propriété halophile) **(Aguilar-Galvez *et al.,2012*).** Sur gélose au sang, ils se cultivent facilement en donnant de petites colonies, le plus souvent non hémolytiques mais parfois entourées d'une zone d'hémolyse α ou ß (**Muhammad *et al.*, 2013).** Les entérocoques appartiennent également au groupe des bactéries lactiques (LAB) avec un métabolisme fermentatif. Ils catabolisent les sucres en produisant majoritairement de l'acide lactique (**Pieniz *et al ., 2015).***

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires, cependant, leur habitat principal reste l'intestin des animaux au sang chaud. Dans cet écosystème complexe, il y a un équilibre entre les entérocoques et l'hôte (**Pieniz *et al ., 2015).*** *E. faecalis E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées dans l'intestin humain**,** mais parfois, elles colonisent la cavité buccale, les voies respiratoires supérieures, et le tractus vaginal... etc. (**Godreuil *et al .,* 2007)** .Vu l'abondance des entérocoques dans les excréments humains, ils peuvent être isolés en nombre de10^5 à 10^8CFU/ g de fèces **(Shepard et Gilmore.,2002)**.

I. 2. Implication des entérocoques dans les infections nosocomiales

I. 2. 1. Infections nosocomiales

Par définition, une infection nosocomiale est une infection contractée dans un établissement de soins. Si l'infection apparaît très tôt, moins de 48h après l'admission, on en déduit généralement que l'infection était en incubation au moment de l'admission, et qu'elle n'a vraisemblablement pas pu être contractée dans l'établissement de soins. L'infection n'est alors pas considérée comme nosocomiale (**Phaneuf *et al* . ,2010).**

A l’inverse, une infection qui se révèle après la sortie de l’établissement de soins peut très bienêtre nosocomiale. On considère que toute infection du site opératoire qui se révèle dans les 30 jours suivant une intervention chirurgicale est à priori nosocomiale, sauf démonstration du contraire. Ce délai est porté à un an pour les infections survenant en cas de mise en place de matériel prothétique (prothèse articulaire, matériel métallique de fixation ou de suture) (**Phaneuf *et al* . ,2010).**

Selon l'enquête de prévalence des infections nosocomiales présentées par l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS) en 2006, les principaux micro-organismes sont des bactéries. Les genres impliqués sont en ordre décroissant : *Escherichia coli* (24 ,7 %), *Staphylococcus aureus* (18,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%), ***Enterococcus*** (6,4%), *Proteusmerabilis* (3,9%), *Klebsiella pneumoniae* (3,5%)...ect. **(Coignard *et al.*, 2006)** (Figure2).

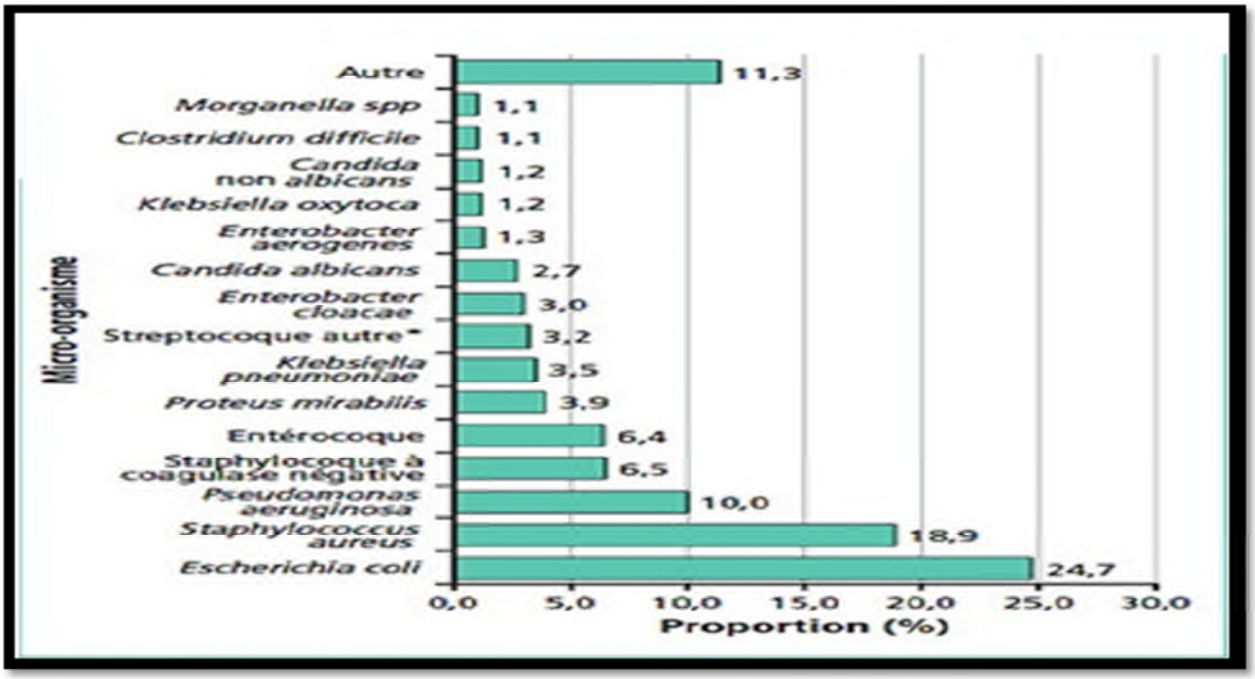


Figure 2: Principaux micro-organismes responsables des infections-nosocomiales.

I. 2. 2. Les infections à Entérocoques

Les entérocoques ne sont à priori pas virulents. Il est donc surprenant de les retrouver dans la rubrique "pathogènes" au même titre que d'autres bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, les pneumocoques ou les streptocoques du groupe A. En effet, les entérocoques se classent parmi les germes "leader" à l'origine d'infections nosocomiales dans le monde. Quelle que soit la zone géographique considérée, le genre *Enterococcus* reste l'une des causes majeures d'infections nosocomiales. En effet, il occupe la 3ème place aux Etats-Unis et en Finlande **(Lyytikäinen *et al.*, 2008; Ogier et Serror, 2008)**, et la 4ème place en France mais également à l'échelle européenne **(Coignard *et al.*, 2006; Ogier et Serror, 2008)**. Les entérocoques sont responsables d'infections urinaires et intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies, d'endocardites et de méningites (**Oprea,**

2004). Ils sont également responsables de bactériémies et d'endocardites chez l'immunodéprimé, en particulier chez les patients ayant une hémopathie maligne.

Une vingtaine d'espèces est décrite mais les deux principales sont essentiellement impliquées en pathologie humaine : *E. faecalis*, qui représente de 80 à 90 % des isolats cliniques et *E. faecium* qui est isolé dans 5 à 15 % des cas **(Delmas *et al*.,2005).** Cependant, d'autres espèces d'entérocoques sont également connues pour causer des infections chez l'Homme, c'est le cas de : *E. avium, E. gallinarum, E. casseliflavus, E. durans, E. hirae, E. raffinosus*et *E. mundtii* **(Na *et al.*, 2012; Patel, 2003; Swampillai *et al.*, 2012; Vijayakrishnan et Rapose, 2012).**

Les infections à entérocoques posent de sérieux problèmes de santé publique liés à la capacité intrinsèque de ces micro-organismes à tolérer différents antibiotiques. En effet, ces germes résistent à des faibles concentrations d'aminoglycosides (gentamycine et kanamycine), de ß-lactames (pénicillines, céphalosporines ou ampicillines), de lincosamides (lincomycine et clindamycine) ou de quinolones (acide nalidixique, norfloxacine…) **(Ogier et Serror, 2008)**. Des résistances peuvent également être acquises par le biais de transferts génétiques permettant de résister aux glycopeptides (vancomycine, téicoplanine), aux aminoglycosides, aux macrolides (érythromycine), aux lincosamides, au chloramphénicol ou encore à la tétracycline **(Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 1999; Ogier et Serror, 2008)**.

Le problème majeur concerne les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE : *Vancomycin Resistant Enterococci*) car cet antibiotique est utilisé en dernier recours pour le traitement des infections provoquées par des germes Gram-positifs multi-résistants aux antibiotiques **(Huycke *et al.*, 1998)**. De plus, l'incidence des septicémies aux VRE aux Etats-Unis est fortement augmentée à cause du transfert des éléments génétiques mobiles permettant la résistance aux glycopeptides **(NNIS, 1999)**. Dès 1992, des transferts conjugatifs *in vivo* et *in vitro* d'un plasmide portant de multiples déterminants génétiques codant diverses résistances aux antibiotiques, y compris à la vancomycine, ont été réalisés entre une souche d'*E. faecalis* et une souche de *S. aureus* **(Noble *et al.*, 1992).**

I. 3. Etat des infections aux entérocoques en Algérie

En Algérie, peu de travaux sont menés sur les infections à entérocoques. Bien que ces dernières se classent parmi les premiers rang des maladies nosocomiales dans différents pays. En utilisant le mot clé "Algeria and enterococci" dans la base de donné Pubmed, deux études seulement qui rapport des cas d'infection à entérocoque en Algérie.

Bien qu'il soit moins virulent qu'*E. faecalis*, *E. faecium* est le plus concerné par la résistance aux antibiotiques **(Cetinkaya *et al*., 2000)**. Les entérocoques résistants aux glycopeptides sont endémique aux USA alors qu'il est d'apparition récente en Europe. Le premier cas d'*E. faecium* résistant à la vancomycine a été décrit en Europe en 1986 **(Lesens *et al*., 2009)**. En Algérie, selon le réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, un premier cas *d'E. faecalis* résistant à la vancomycine a été rapporté en 2007. Par la suite, deux autres cas d'infections à entérocoques résistants aux glycopeptides ont été signalés **(Aggoune *et al*.,2008).** Parmi eux, un cas d'infection causée par *E. faecalis* résistant à la vancomycine isolé à l'hôpital central de l'armée en Algérie. **(Aggoune *et al*., 2008).** En 2012, une étude épidémiologique sur les entérocoques a été menée afin d'évaluer la prévalence des entérocoques vancomycine résistant au CHU d'Alger (Djhmi N.et al., 2012). Un autre cas de résistance aux glycopeptides a été récemment signalé par les travaux de **Hamidi M. *et al*., 2013.**

Devant cette émergence de souches d'entérocoque résistants aux glycopeptides, sa détection doit interpeller tous les laboratoires de microbiologie quant au fait de rester vigilant devant l'isolement de toute souche *d'Enterococcus* présentant un diamètre diminué aux glycopepetides. Il en est de même pour les comités de luttes contre les infections nosocomiales (CLIN) qui devraient inclure dans leur protocole de surveillance des bactéries multirésistantes (BMR), la recherche des VRE. Il se pourrait que de pareilles souches puissent être isolées à l'avenir dans d'autres hôpitaux algériens et dans d'autres types de prélèvements.

Le but de ce travail vise à établir un état des lieux des infections dues aux entérocoques dans la région de Bejaia afin de prévenir l'apparition des entérocoques vancomycine résistants comme c'est les cas aux USA et en Europe. Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail consiste à isoler puis à identifier les souches d'entérocoques isolées au CHU de Bejaia (Khelil Amrane). En outre, l'identification de ces bactéries est suivie par une caractérisation des phénotypes de résistance aux antibiotiques majoritairement utilisés en clinique pour le traitement des infections dues aux entérocoques.

II. Matériels et Méthodes

II.1.Échantillonnages

Afin de faire l'état des lieux des infections dues aux entérocoques dans la wilaya de Bejaia, plusieurs centres de santé ont été visés pour collecter des entérocoques ou des bactéries suspectés être des entérocoques. Les souches bactériennes qui ont servi à notre étude proviennent de la collection de l'hôpital Khelil Amrane de Bejaïa. Ci-dessous un tableau récapitulatif des souches isolées à partir de différentes origines d'infection (Tableau I)

Tableau I : La collection des souches d'entérocoques au niveau de l'hôpital Khelil Amrane

Numéro de la souche	Référence	L'origine	La date du prélèvement
1	3191	ECBU	2015
2	12734	ECBU	11/05/2014
3	8122	ECBU	2015
4	2909	Pus	2015
5	27210	ECBU	2015
6	483	ECBU	2015
7	8034	ECBU	2015
8	5166	Pus	2015
9	35425	ECBU	04/01/2015
10	3967	Pus	2015
11	32577	ECBU	20/11/2014
12	8184	Hémoculture	2015
13	3351	Hémoculture	2015
14	11786	ECBU	2015
15	8044	ECBU	04/03/2015
16	1596	Pus	2015
17	2365	Hémoculture	2015
18	34337	ECBU	18/12/2014
19	7700	Hémoculture	2015
20	36288	ECBU	2015
21	34013	Réanimation	2015
22	34479	ECBU	18/12/2014
23	963	ECBU	2015

24	3198	Pus	2015
25	31771	ECBU	2015
26	20711	ECBU	2015
27	3371	ECBU	04/03/2015

II.2. Isolement sur gélose à la bile, esculine et azide de sodium (BEA)

Principe

La Gélose Bile Esculine Azide est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et la numération des entérocoques et des streptocoques fécaux dans les produits alimentaires ainsi que dans les eaux. La sélection des entérocoques se fait grâce à la composition de ce milieu :

Bile : Inhibe la croissance des bactéries autres qu'intestinales.

Azide de sodium : Inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif.

Esculine : Polyoside complexe que les streptocoques fécaux et les entérocoques hydrolysent en libérant de l'aglucone qui est décelée par une réaction chimique en présence de sels de fer et donne une coloration noire **(Chuard et Reller., 1998).**

Préparation

- Mettre en suspension 40 g de milieu BEA déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Chauffer le milieu sous agitation constante jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en flacons et stériliser à l'autoclave pendant 20minutesà 120°C.

Protocole

- Refroidir le milieu après sa liquéfaction et maintenir à 50°C.
- Couler des boîtes de Pétri stériles de taille appropriée à l'utilisation.
- Laisser solidifier.
- Sécher les boîtes sous hotte (stérile) à flux laminaire.
- Ensemencer l'inoculum en surface et réaliser un isolement selon la méthode des quadrants.
- Incuber à 37°C pendant 24 à 48h.

II.3. Examens direct

II.3.1.Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de différencier entre deux grands groupes bactériens : Bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (**Franz et Holzapfel, 2004).**

Réalisation du frottis

- Placer une goutte d'eau distillée sur la lame.
- Prélever stérilement les bactéries à partir des boites de Pétri.
- Emulsionner le prélèvement dans la goutte d'eau.
- Etaler sur la lame par un mouvement de va et vient.
- Le frottis doit être invisible à l'œil ; et l'étalement doit être homogène.
- Fixer à la chaleur; passer la lame 3fois dans la flamme du bec bunsen, le frottis étant situé du côté opposé à la flamme, ensuite laisser la lame refroidir.
- Le frottis doit être parfaitement sec.

La coloration du frottis

- Recouvrir le frottis fixé de violet de gentiane, laisser agir 30 secondes.
- Egoutter le colorant.
- Sans laver ; recouvrir avec la solution de Lugol ; laisser agir 20secondes.
- Egoutter le colorant.
- Recouvrir à nouveau avec la solution de Lugol ; lasser agir 20secondes.
- Egoutter et laver la lame abondamment à l'eau.
- Bien égoutter la lame.
- Décolorer le frottis avec l'alcool/acétone
- Laver abondamment à l'eau.
- Recouvrir avec la solution de fuschine ; lasser agir 30secondes.
- Laver à l'eau
- Sécher et observer à l'immersion x100.

A l'observation, les bactéries à Gram positifs gardent leur coloration violette (violet de gentiane) après une décoloration par l'alcool éthylique. Par contre, les bactéries à Gram

négatifs sont décolorées par l'alcool éthylique et seront teintées par la fuschine. Elles apparaitront en rose ou rouge.

II.3.2.Test catalase

Principe

Pour mettre en évidence l'activité catalase, une partie de colonie est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence d'une catalase active selon la réaction suivante **(Marchal *et al.*, 1982)**:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} O_2 + 2\,H_2O$$

Protocol

- Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H_2O_2, puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une anse de plastique à usage unique.
- Si des bulles se forment, la bactérie est dite catalase positive.
- Si absence de bulle, la bactérie est dite catalase négative.

II.4. Cinétique de croissance sur Gm17

Le bouillon M17 est un milieu de culture liquide utilisé in vitro dans le dénombrement et la culture des streptocoques lactiques mésophiles, de *Streptococcus* thermophiles dans le yaourt et autres produits laitiers, ainsi que dans la culture et la conservation des cultures d'entérocoques (**Terzaghi et Sandine, 1975).**

Protocole

- Préparer des volumes de 15 ml de GM17 dans des tubes à essai.
- Ensemencer avec 300µl de suspension bactérienne
- Prélever 500 µl de chaque tube dans des cuves de spectrophotomètre chaque 1h.
- Mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 600nm.
- Refaire cette opération chaque heure jusque à 8 h
- Prendre la DO après 24h.

II.5.Croissance sur un Bouillon Hyper Salé

Principe

La croissance en présence de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les entérocoques sont tous capables de se développer en milieu hyper salé contrairement aux streptocoques **(Schleifer et Kilpper-Bälz., 1987).**

Protocole

- Préparer des tubes de GM17 hyper salé de 15ml
- Prélever une colonie bactérienne et l'ensemencer dans le bouillon hyper salé
- Agiter chaque tube
- Incuber à 37°C pendant 24 heurs

II.6. Résistance à la chaleur

Principe

La plupart des entérocoques sont résistants à traitement de températures de 63°C pendant 30min

Protocole

- Ensemencer des tubes de 5ml de GM17 avec 100µl de suspension bactérienne.
- Placer les tubes dans un bain-marie à 63°c pendant 30min
- Apres 30min refroidir immédiatement avec de l'eau de robinet
- Incuber à 37°C pendant 24h

II.7. Identification par Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Principe

La méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF (figure 3) est une méthode très rapide, très sensible et peut distinguer entre les différents organismes, mais aussi entre les souches biochimiquement similaires dont la distinction auparavant été seulement possible avec des méthodes moléculaire comme la PCR **(krazny *et al.*, 2013).**

Figure 3: Bruker Daltonik MALDI Biotyper **(CHU de Caen, France)**

L'identification est possible en cinq minutes. Le principe de la méthode est basé sur l'ionisation des cellules, notamment ses protéines, par une impulsion laser et analyse le temps de vol. En général, la spectrométrie de masse mesure la relation entre la masse ***m***et la charge ***Z*** pendant l'ionisation de l'échantillon **(Krazny *et al.*, 2013).**

Protocole

- Déposer une petite partie d'une colonie bactérienne pure et fraiche (âge de la colonie inferieure à 24h)
- Ioniser les cellules notamment leurs protéines avec une impulsion laser
- Les spectres spécifiques produits sont directement comparés à une base de donnée intégrée pour donner l'identification de la bactérie

II.8.Antibiogramme

Test d'antibiogramme

Afin de mettre en évidence la résistance bactérienne vis à vis des antibiotiques, des antibiogramme ont été réalisés. Cette technique consiste à mettre en contact des souches bactériennes en présence de plusieurs antibiotiques. Ceci nous permet alors de connaître le spectre des antibiotiques, et ainsi de définir les résistances de chaque bactérie.

Préparation du milieu Mueller Hinton :

- Suspendre 36 g dans 1litre d'eau distillée.
- Chauffer jusqu'à la dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20minutes.

Antibiogramme : (Bonnet *et al.*, 2014)

- Couler dans des boites carrées du milieu Mueller Hinton.
- Laisser sécher sous une hotte à flux laminaire
- Préparer dans de l'eau physiologique des suspensions bactériennes d'une densité équivalent à 0.5 Mc Farland (environ DO_{600} = 0.150)
- Ensemencer les boites carrées à l'aide d'un écouvillon stérile.
- Déposer à l'aide d'un distributeur de disques les 16 disques d'antibiotiques
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

II.9. Analyse de la tolérance des entérocoques à la vancomycine

Afin d'analyser la tolérance de certaines souches d'entérocoques, une étude de survie à la vacomycine a été réalisée :

- Ensemencer 10 ml de GM17 par une colonie bactérienne.
- Incuber toute la nuit à37°C.
- Prélever 500 µl dans chaque culture de nuit et ensemencer dans 15ml deGM17
- Apres deux heures d'incubation à 37°C, mesurer la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre
- A DO_{600} = 0.5, une concentration finale de 15µg/ml de vancomycine a été ajoutée aux cultures bactériennes.
- Avant l'ajout de la vancomycine, un dénombrement à été effectué (T0). Une série de dilution 1/10 a été réalisée de 10^{-1} à 10^{-7}. un volume de 500µl des dilutions 10^{-6} et 10^{-7}ont été ensemencées en masse et incubées 48h à 37°C.
- Après 24h de contact avec l'antibiotique, un dénombrement a été effectué (T24h). Une série de dilution 1/10 a été réalisée de 10^{-1} à 10^{-6}. un volume de 500µl des dilutions 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} et 10^{-6}ont été ensemencées en masse et incubées 48h à 37°C.
- Les unités formant colonies (UFC) visibles à l'œil nu après 48 h sont comptées et les pourcentages de survie à la vancomycine sont calculés. Pour chaque culture, le nombre d'UFC à T_{24} est comparé au nombre d'UFC à T_0 qui représente 100%

III. Résultats et discussions

III. 1. Résultats de la recherche des entérocoques dans les centres médicaux de la région de Bejaia

Afin de faire l'état des lieux des infections dues aux entérocoques dans la wilaya de Bejaia, plusieurs centres de santé ont été visés pour collecter des entérocoques ou des bactéries suspectées être des entérocoques. Pour cela, les centres de soins médicaux suivants ont été ciblés :

- Le Centre Hospitalier-universitaire de Béjaia (CHU) qui regroupe les trois hôpitaux principaux de la wilaya à savoir : Le centre Khelil Amrane, le centre Targa Ouzemour et le centre Frantz Fanon. Le laboratoire centrale du CHU a répertorié 27 souches bactériennes suspectées être des entérocoques isolées dans diverses origines d'infection (urine, pus, hémoculture, et réanimation) pendant une période allant du mois de mai 2014 au mois de mars 2015 (Tableau II).
- L'Hôpital d'Amizour : Le responsable de laboratoire considère les entérocoques comme étant des bactéries commensales qui n'ont aucun impact sur la santé humaine.
- L'hôpital d'Akbou a strictement interdit le déplacement des souches hors établissement dans un but préventif. Selon le responsable, les entérocoques sont souvent rencontrés dans des prélèvements, mais l'accès à cette collection nous a été interdit.
- L'hôpital de Sidi Aiche n'a pas répondu favorablement à notre demande d'accès à la base de donnée des isolats cliniques et il nous a adressé la même réponse que celle de l'hôpital d'Akbou.
- Le laboratoire d'analyses médicales privé du Dr Moualek situé à Sidi Ahmed, wilaya de Béjaia : Le responsable déclare l'absence des entérocoques dans les examens bactériologiques fréquemment réalisés à son niveau pendant une période de 3 mois. Néanmoins, il a signalé des cas d'infections aux entérocoques qu'il a préalablement rencontrés dans son service. Ce denier n'a pas conservé des entérocoques.
- Le laboratoire d'analyse médicale privée du Dr Ait Bachir ainsi que celui du Dr Idjaad ne rencontrent pas souvent les entérocoques dans les examens bactériologies effectués au niveau de leurs services.

Il est à noter qu'à l'exception de l'hôpital d'Akbou et celui de Sidi Aiche, on a laissé des tubes de conservation pour tous éventuels entérocoques isolés depuis le mois de janvier 2015, dans les différents établissements de santé.

Le résultat la recherche des entérocoques dans la région de Béjaia montre clairement le manque investigation et de recherche de ces bactéries pathogènes opportunistes dans la plut part des centres médicaux. Des mesures de prévention et de contrôle doivent être appliquées pour prévaloir et réduire le risque d'émergence des entérocoques multi-résistants. Selon l'enquête de prévalence des infection nosocomiale présentée par l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS) en 2006, les entérocoques est la 4ème causes des maladies nosocomiales au niveau européen **(Coignard *et al.*, 2006; Ogier et Serror, 2008).** Et la 3ème aux Etats-Unis et en Finlande **(Lyytikäinen *et al.*, 2008; Ogier et Serror, 2008).**

III. 2.Caractérisation des souches cliniques isolées au CHU de Bejaia

Afin de caractériser les souches cliniques isolées des différentes origines d'infection, un ensemble d'expériences a été effectué. Tout d'abord, les bactéries ont été isolées sur un milieu riche (GM17) puis sur un milieu sélectif (BEA) dans le but de décrire et reconnaitre la forme, la couleur et les bornes des colonies isolées (examen macroscopique). Par la suite, une coloration de Gram et un test catalase ont été réalisés sur l'ensemble des isolats pour déterminer aussi bien leur type de Gram, leur forme et leur organisation cellulaire (type d'agencement), mais également l'activité de l'enzyme catalase qui est un caractère commun au sein d'un genre bactérien. En fin et afin de distinguer entre les entérocoques et les streptocoques, des tests de résistance à la chaleur (63°C pendant 30 min) ainsi qu'une croissance sur un bouillon hyper salé (6.5% NaCl) ont été établis.

L'ensemble des résultats de la caractérisation des souches cliniques isolés au CHU de Bejaia, obtenus sont rapportés dans le tableau ci-dessous (Tableau II).

Tableau II : Caractérisation des entérocoques isolés au CHU de Bejaia.

souches	Référence du CHU Béjaia	Origine	Gram	Catalase	Résistance à la chaleur	Croissance sur bouillon hypersalé 6.5 % NaCl	Isolement sur BEA
1	3191	ECBU	+	-	+	+	+
2	12734	ECBU	+	-	+	+	+
3	8122	ECBU	+	-	+	+	+
4	2909	Pus	+	+	-	+	-
5	27210	ECBU	+	-	+	+	+
6	483	ECBU	+	-	+	+	+
7	8034	ECBU	+	-	+	+	+
8	5166	Pus	+	-	+	+	+
9	35425	ECBU	+	-	+	+	+
10	3967	Pus	+	-	+	+	+
11	32577	ECBU	+	-	+	+	+
12	8184	Hémoculture	+	-	+	+	+
13	3351	Hémoculture	+	-	+	+	+
14	11786	ECBU	+	-	-	-	+
15	8044	ECBU	+	-	+	+	+
16	1596	Pus	+	-	+	+	+
17	2365	Hémoculture	+	-	+	+	+
18	34337	ECBU	+	-	+	+	+
19	7700	Hémoculture	+	-	+	+	+
20	36288	ECBU	+	-	+	+	+
21	34013	Réanimation	+	-	+	+	+
22	34479	ECBU	+	-	+	+	+
23	963	ECBU	+	-	+	+	+
24	3198	Pus	+	-	+	+	+
25	31771	ECBU	+	-	+	+	+
26	20711	ECBU	+	-	+	+	+
27	3371	ECBU	+	-	+	+	+

La fréquence des infections nosocomiales causées par les entérocoques est dominée par les infections des voies urinaires, suivies par les infections intra-abdominales, les

bactériémies, les endocardites, les septicémies néonatales puis les méningites **(Sood *et al.*,2008)**. Dans notre étude, la répartition des isolats cliniques collectés dans différentes origines d'infections montre également une dominance stricte des candidats d'origines urinaires avec une proportion de 63%. Les isolats d'origine des pus et des hémocultures représentent des proportions de 18% et de 15% respectivement. La fréquence la plus faible concerne les isolats des services de réanimation avec une proportion de 4% uniquement (figure 4). D'autres études similaires rapportent des proportions de 57% pour les isolats clinique d'origine urinaire, 16% d'origine des pus et 14% d'origine des hémocultures **(Bhatt *et al.*, 2015).**

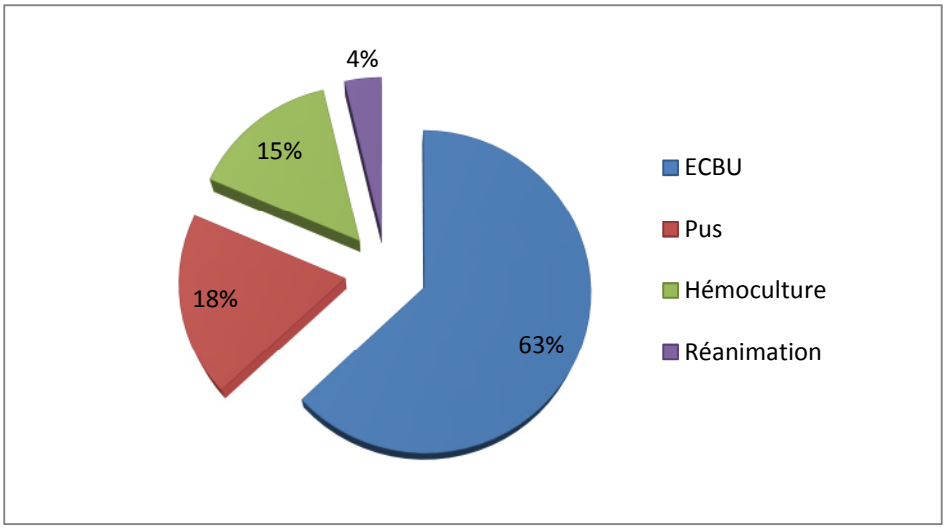


Figure 4: Répartition des souches selon l'origine de prélèvement.

L'examen macroscopique des colonies isolées sur le milieu GM17 montre des petites colonies bombées blanchâtres et opaques au contour limités et réguliers. Ces caractéristiques macroscopiques répondent aux descriptions culturales et phénotypiques générales des entérocoques rapportés par (**Terzaghi et Sandine, 1975).** Par contre, l'isolement sur le milieu BEA montre de petites colonies translucides (de la couleur du milieu) entourées d'un halo noir pour l'ensemble des souches à l'exception de la souche N°4. L'apparition des colonies sur le milieu BEA indique la résistance de ces bactéries à la bile et l'azide de sodium. Cependant, l'apparition de couleur noir est due à l'hydrolyse du polyoside complexe "esculine" en libérant de l'aglucone qui est décelée par une réaction chimique en présence de sels de fer. **(Chuard et Reller., 1998)** (Figure 5).

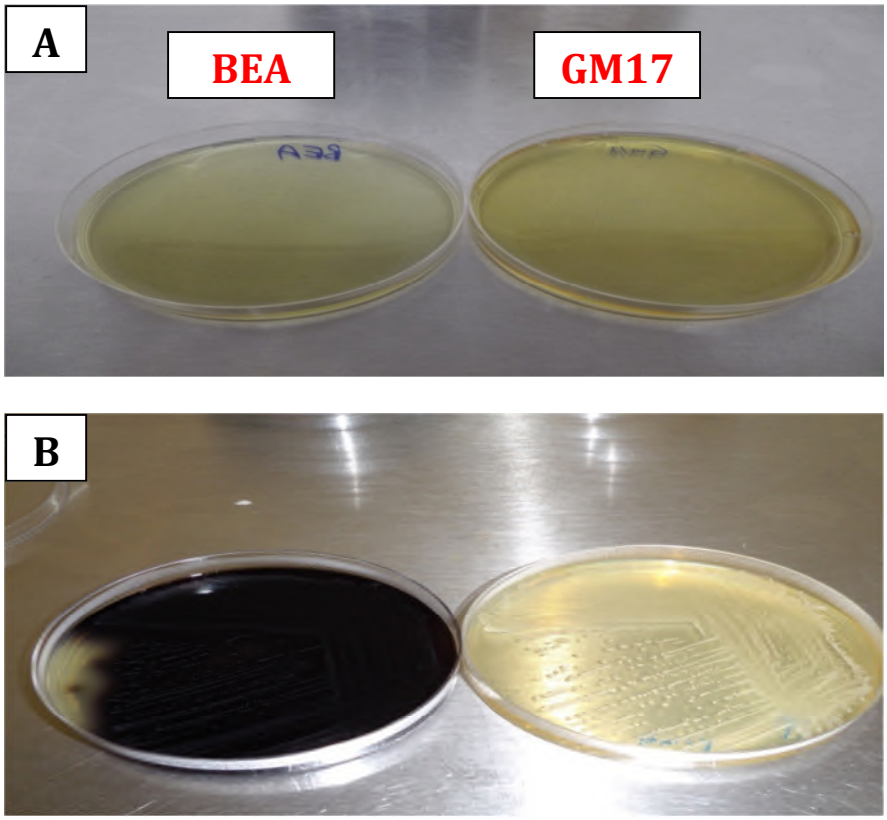


Figure 5 : Milieu BEA et milieu GM17 avant (A) et après (B) isolement

L'aspect microscopique des bactéries après la coloration de Gram à révèle des formes cellulaires en cocci, disposées en paire (diplocoques) ou en courtes chainettes de couleur violettes (figure 6). Par conséquent, ce sont des bactéries à Gram positif ce qui répond au type de Gram des entérocoques (**Franz et Holzapfel, 2004).**

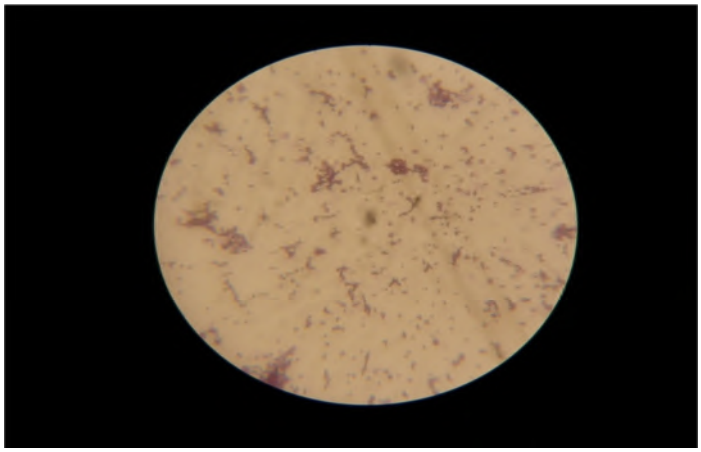


Figure 6 : Des entérocoques observés au microscope optique après la coloration de Gram (Gr x100)

Afin de distinguer entre les genres des coques Gram positifs, un test catalase a été établi. Ce test est important pour la première orientation dans l'identification d'une souche. En effet, les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* sont caractérisés par une catalase positive

alors que ceux d'*Enterococcus* et *Streptococcus* sont caractérisés par une catalase négative **(Marchal *et al*., 1982).**Le résultat de la recherche de l'activité catalase s'est révélé négatif pour toutes les souches testées à l'exception de la souche numéro 4 qui a montré une réaction positive avec de l'eau oxygéné. Ceci indique que toutes les souches sont dépourvues d'une activité catalases sauf la souche numéro 4, ce qui laisse suggérer que ces bactéries sont soit des entérocoques ou bien des streptocoques. Quant à la souche numéro 4 qui sort du lot, elle peut être soit un staphylocoque soit un microcoque. (Figure 7).

Figure 7 : Résultat d'un test catalase positif (à gauche) et un test catalase négatif (à droite).

Les entérocoques et les streptocoques partagent les mêmes critères macroscopiques (types de colonies) et microscopiques (coques, Gram + en diplocoques ou en petites chaînettes). Donc, il reste à différencier entre ces deux genres. Pour cela, des tests de résistance à la chaleur et des croissances sur des milieux hypersalés sont toujours des tests complémentaires qui aident à mieux distinguer entre ces deux genres. Généralement, tous les entérocoques sont capables de résister à un traitement thermique de 63°C pendant 30 minutes et peuvent croitre dans des milieux hypersalés de 6.5 % de NaCl, **(Schleifer et Kilpper-Bälz., 1987)** (Figure 8) Les résultats de notre étude montre que toutes les souches testées sont capables de résister au traitement thermique et également de croitre sur un milieu hypersalé à l'exception de la souche N°14 et la souche N°4 (Tableau II). Ce résultat suggère que toutes les souches appartiennent au genre *Enterococcus* à l'exception de la souche N° 14 qui est écartés de ce genre. Cette dernière peut être considérée comme un streptocoque. La souche N°4 peut être un staphylocoque vu sa croissance dans un milieu hypersalé. En effet, les staphylocoques support des milieux jusqu'à 15% de NaCl (propriété halophile) **(Larpent, 1996; stiles et Holzapfel 1997; Klein *et al*., 1998)**

Figure 8: Résultat d'un test de résistance à la chaleur (à gauche) et un test de croissance sur un milieu hyper salé (à droite).

Une cinétique de croissance a été effectuée sur un milieu GM17 en mesurant la densité optique à 600nm. Les résultats de la croissance de toutes les souches sont similaires. La figure suivante montre la tendance de la courbe de croissance et l'évolution de la biomasse en fonction des temps suivant : T_{0h}, T_{1h}, T_{2h}, T_{3h}, T_{4h}, T_{5h}, T_{24h} (figure 9) .

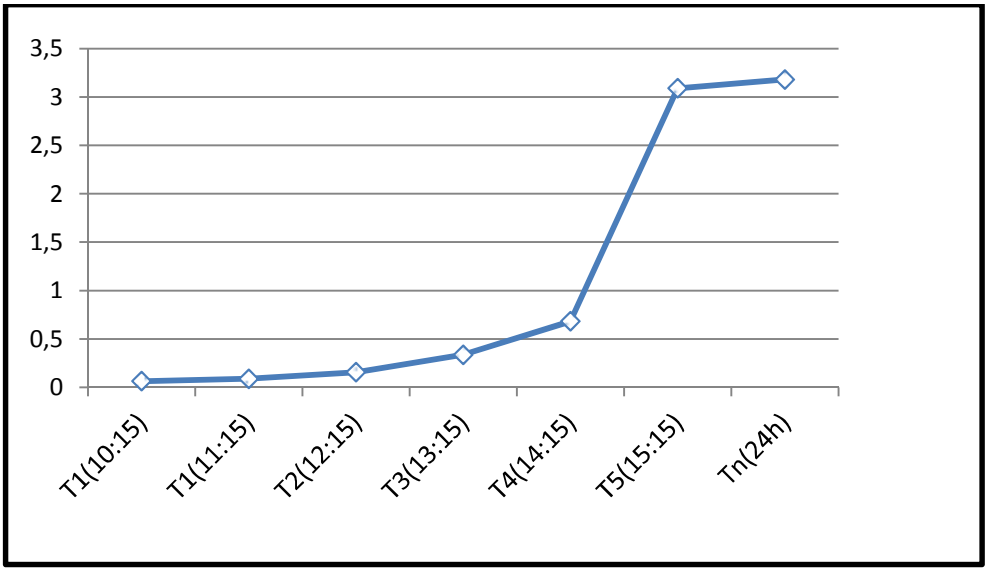


Figure 9 : Cinétique de croissance des souches bactériennes

A partir de l'analyse de la cinétique des croissances, les phases suivantes ont pu être déterminées : Une phase latence, nécessaire à la bactérie pour s'adapter au milieu de culture, suivie d'une phase exponentielle traduite par un taux maximal de croissance et en fin, phase stationnaire due à l'appauvrissement du milieu et l'accumulation de déchets toxiques.

III. 3. Identification des souches par spectromètre de masse MALDI-TOF.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification et le typage phénotypique des bactéries à partir des colonies ou des prélèvements. **(Blondiaux *et al* ., 2010)** à partir de tous les spectres typiques qui sont enregistrés dans une banque de données, Un score d'appariement ou de vraisemblance classe les spectres et précise la ou les identifications bactériennes les plus plausibles. À partir des spectres obtenus, il est possible de construire un dendrogramme fondé sur les scores de similarités. Le spectre de masse est susceptible de variations. La nature du milieu de culture, la durée d'incubation des cultures peuvent influencer sur la qualité du spectre obtenu. Par exemple, les colonies doivent être récentes pour ne pas avoir de dégradation des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes **(Courcol, 2009).** Les résultats obtenus sont classés par un nombre de score qui détermine le genre ou l'espèce de la bactérie (Tableau III).

Bruker Daltonik MALDI Biotyper est un appareil qui donne les résultats avec un score de (0) à (3.0), dans lequel les plus élevés représentent l'identification la mieux établie. Les valeurs d'identification sont divisées en quatre groupes comme le montre le tableau suivant:

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.300 ... 3.000	**forte probabilité d'identification à l'espèce**	**(+++)**	Vert
2.000 ... 2.299	**identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable**	**(++)**	Vert
1.700 ... 1.999	**identification au genre probable**	**(+)**	Jaune
0.000 ... 1.699	**degré de confiance insuffisant pour l'identification**	**(-)**	Rouge

Tableau III: Correspondances des scores pour l'identification des espèces

Ce tableau présente les corrélations des scores et la fiabilité d'identification.
Les valeurs sont prises de la fiche des résultats donnés par le constructeur Bruker Biotyper.

D'après le tableau, on peut noter qu'on doit avoir au moins une valeur de 2.0 (+) pour être sûr du genre microbien et de 2.3 (+++) pour sécuriser l'identification de l'espèce. Dans cette étude le degré de confiance était considéré suffisant si la valeur était supérieure à 2.0

pour l'identification ou si elle se situe entre 1.7 et 2.0 (+) et que toutes les espèces probables correspondent à une seule et même espèce. Les résultats de l'identification sont rapportés dans le tableau suivant (Tableau IV) :

Tableau IV : Résultats d'identification par spectroscopie de mass (type Bruker Daltonik MALDI Biotyper) des souches cliniques isolées au CHU de Bejaia.

N° de souche	Nom del'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score	Organisme (second candidat)	Score
1	A1(++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.126	*Enterococcusfaecalis*	2.115
	A2(++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.119	*Enterococcusfaecalis*	2.075
2	A3(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.406	*Enterococcusfaecalis*	2.211
	A4(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.48	*Enterococcusfaecalis*	2.435
3	A5(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.343	*Enterococcusfaecalis*	2.256
	A6(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.325	*Enterococcusfaecalis*	2.267
5	A7(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.384	*Enterococcusfaecalis*	2.355
	A8(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.418	*Enterococcusfaecalis*	2.4
6	A9(++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.275	*Enterococcusfaecalis*	2.27
	A10(-) (C)	*pas de pics détectés*	< 0	*pas de pics détectés*	< 0
7	A11(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.455	*Enterococcusfaecalis*	2.379
	A12(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.44	*Enterococcusfaecalis*	2.388
8	B1(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.417	*Enterococcusfaecalis*	2.383
	B2(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.343	*Enterococcusfaecalis*	2.327
9	B3(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.381	*Enterococcusfaecium*	2.348
	B4(-) (C)	*pas de pics détectés*	< 0	*pas de pics détectés*	< 0
10	B5(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.378	*Enterococcusfaecalis*	2.327
	B6(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.349	*Enterococcusfaecalis*	2.345
11	B7(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.424	*Enterococcusfaecalis*	2.377
	B8(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.362	*Enterococcusfaecalis*	2.355
12	B9(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.501	*Enterococcusfaecalis*	2.45
	B10(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.427	*Enterococcusfaecalis*	2.388
13	B11(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.413	*Enterococcusfaecium*	2.4
	B12(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.387	*Enterococcusfaecium*	2.362
14	C1(-) (C)	*Streptococcus agalactiae*	2.373	*S. agalactiae*	2.321

	C2(+++) (A)	*Streptococcus agalactiae*	2.373	*S. agalactiae*	2.321
15	C3(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.411	*Enterococcusfaecium*	2.309
	C4(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.455	*Enterococcusfaecium*	2.393
16	C5(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.443	*Enterococcusfaecium*	2.359
	C6(+++) (A)	*Enterococcusfaecium*	2.474	*Enterococcusfaecium*	2.423
17	C7(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.47	*Enterococcusfaecalis*	2.47
	C8(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.468	*Enterococcusfaecalis*	2.367
18	C9(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.474	*Enterococcusfaecalis*	2.473
	C10(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.402	*Enterococcusfaecalis*	2.393
19	C11(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.421	*Enterococcusfaecalis*	2.327
	C12(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.361	*Enterococcusfaecalis*	2.278
20	D1(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.443	*Enterococcusfaecalis*	2.315
	D2(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.418	*Enterococcusfaecalis*	2.416
21	D3(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.464	*Enterococcusfaecalis*	2.371
	D4(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.478	*Enterococcusfaecalis*	2.397
22	D5(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.446	*Enterococcusfaecalis*	2.314
	D6(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.499	*Enterococcusfaecalis*	2.405
23	D7(++) (A)	*Enterococcusavium*	2.2	*Enterococcusavium*	2.199
	D8(++) (A)	*Enterococcusavium*	2.252	*Enterococcusavium*	2.209
24	D9(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.422	*Enterococcusfaecalis*	2.378
	D10(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.492	*Enterococcusfaecalis*	2.38
25	D11(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.425	*Enterococcusfaecalis*	2.409
	D12(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.447	*Enterococcusfaecalis*	2.371
26	E1(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.505	*Enterococcusfaecalis*	2.485
	E2(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.508	*Enterococcusfaecalis*	2.408
27	E3(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.388	*Enterococcusfaecalis*	2.369
	E4(+++) (A)	*Enterococcusfaecalis*	2.507	*Enterococcusfaecalis*	2.485

D'après ces résultats 77% des infections sont dues à *E. faecalis*, 15% à *E. faecium* et 4% à *E.avium* (Figure 10). Les entérocoques colonisent plus de 90% dans les intestins d'Humains **(Besnier, 1994).***E. faecalis* comptes plus de 80% des entérocoques isolé dans des échantillons cliniques **(Lesensa, 2009).** Également, Dans diverses études *E. faecalis* est l'espèce la prédominante des entérocoques avec un taux de 80-85% des isolats cliniques,

suivie par *E. faecium* avec un taux de 10-15% (**Besnier, 1994).** D'autre travaux rapportent les taux suivants : *E. faecalis* (68 %), *E.faecium* (24 %) et 8% pour d'autres espèces, essentiellement *E. gallinarum, E. casseli flavus, E. avium* et *E. durans.*(**Leclercq , 1994).**

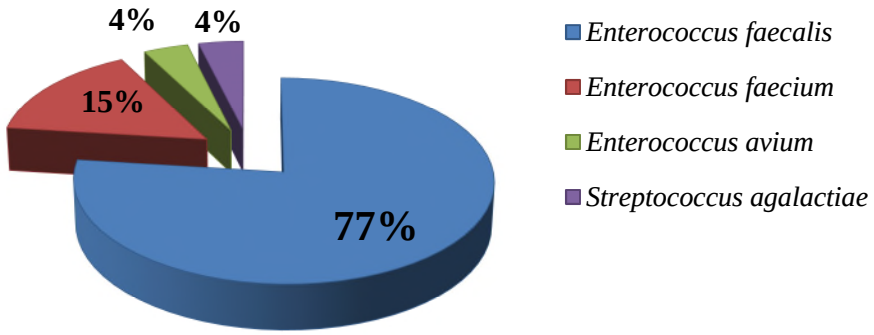


Figure 10 : Répartition des souches selon les espèces

III. 4. Résultats des phénotypes de résistances des isolats cliniques

Les résultats des la recherches des phénotypes de résistance sont rapporté dans le (tableau V) et dans la (figure 11).

➢ Les résultats de l'ensemble des isolats montrent un taux **22.22%** et 18.51% de résistance à l'ampicilline et à l'ipéminème respectivement. Ces résultats rapprochent de ceux retrouvés par **Muthur *et al.*, (2003)**. La résistance aux β-lactamines peut être liée à la production de bêta-lactamases plasmidiques. Ceci a été rapporté chez quelques souches de *E. faecalis* et de rares souches de *E. faecium* **(Rice, 2001).** La résistance aux pénicillines concerne plus *E. faecium*. Au sein de cette espèce, la résistance est due à des altérations dans l'expression ou la structure d'une protéine de liaison aux pénicillines de faible affinité pour les bêta-lactamines, en l'occurrence, la PLP5 **(Rybkine *et al.*,1998).** Une hyperproduction de cette PLP conduit à des CMI de l'ampicilline plus élevées du fait que des concentrations plus fortes de l'antibiotique sont nécessaires pour saturer cette protéine. Les souches ayant des CMI plus élevées présentent des mutations de la PLP5 diminuant encore son affinité pour l'ampicilline.

- Dans notre étude le taux de résistance aux rifamycines est de **55.55%.** Ces résultats sont approximativement proches de ceux de **(Zouain et Araj, 2001).** Cette résistance est due à l'altération d'une sous unité de l'enzyme ARN polymérase ADN dépendante **(Dernu *et al.*, 1995)**

- Un taux de **50** à **60%** des entérocoques sont résistants à l'érythromycine **(Jupeau-Vessieres et Scavizzi, 1994).** Ces taux ne sont pas très éloignés de ceux obtenus dans notre étude, soit **55.55%** d'isolats résistant à l'érythromycine. Ces chiffres témoignent d'une forte résistance des entérocoques aux macrolides, qui serait inductible avec la synthèse d'une methylase et la modification de la cible ribosomale. **(Dernuet., 1995)**.

- Une résistance des isolats cliniques à la clindamycine présente un taux de 96.29%. Ces résultats sont similaires à ceux de **Rice, (2001)** qui rapporte un taux 95% de clindamycine. Cette résistance montre une activité médiocre des macrolides.
- Les résultats montrent une résistance à la gentamycine et la kanamycine de **22.22%** et 48.14% respectivement. Ces résultats rapprochent de ceux retrouvés par **(Lelievre *et al*., 1999 ; Lepelletier et Richet, 2001).** Cette résistance à la gentamicine est surtout due à l'acquisition de gènes fréquemment plasmidiques codant pour une enzyme (aminoglycoside phosphotransférase 2 – acétyltransférase 6). Cette enzyme confère un haut niveau de résistance à la gentamicine. **(Leclercq *et al.*, 1992).** Elle inactive non seulement la gentamicine mais aussi la kanamycin et l'ensemble des aminosides.
- D'après nos résultats, les 26 souches testées sont sensibles à la vancomycine, à la teicoplanine et à la lincomycine. Ceci est plutôt rassurant pour l'état des infections à entérocoques à Bejaia. Ces antibiotiques restent très efficaces vis-à-vis toutes les souches testées.
- Les résultats montrent une résistance à la tétracycline de **59.25%,** tandis que le pourcentage de résistance des entérocoques à la tétracycline rapporté est de 60 à 80% **(Henning et Brown., 1995).**

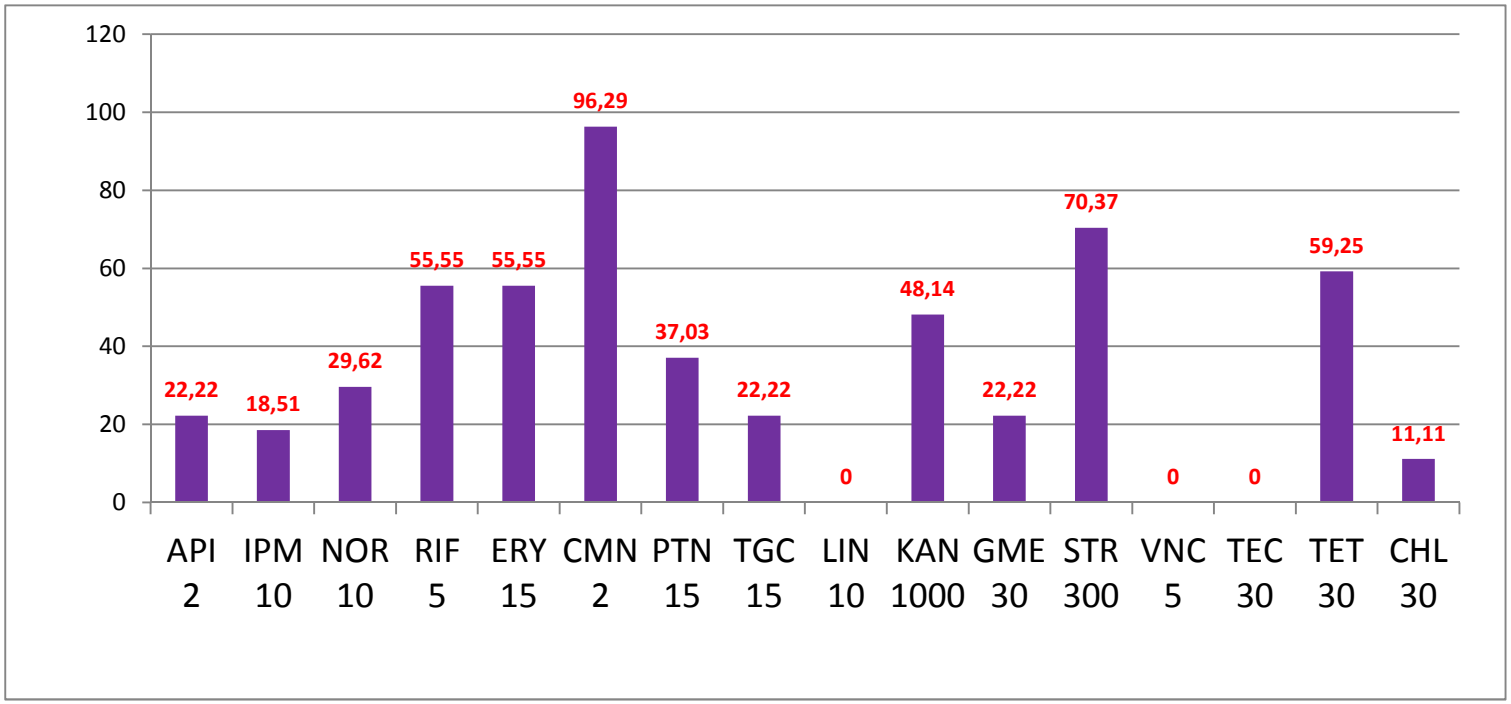
- Le taux de résistance à la norfloxacine est de **29.62%.** Cette résistance est due à l'inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliqués dans cette synthèse: l'ADN gyrase et l'ADN, topo- isomérase IV.

- Les résultats montrent un taux de résistance au chloramphénicol de 11.11%. Un taux de résistance de 20% des entérocoques a été rapporté par **Abbassi *et al.*, (2009).**
- L'ensemble des résultats indiquent un taux élevé de résistance à la streptomycine de avec une proportion de 70.37%. Ce dernier agit sur la sous-unité 30S du ribosome, ce qui introduit une erreur de lecture du code génétique lors de la traduction des protéines.

Tableau V : Résultats d'identification et de l'antibiogramme complet des souches cliniques isolées au CHU de Bejaia

N°			API 2	IPM 10	NOR 10	RIF 5	ERY 15	CMN 2	PTN 15	TGC 15	LIN 10	KAN 1000	GME 30	STR 300	VNC 5	TEC 30	TET 30	CHL 30
Valeurs	***origine***	***Espèce***	***8-10***	***18-21***	***12***	***17-20***	***14-23***	***17-21***	***20-22***	***15-18***	***19***	***10-14***	***8***	***19***	***12***	***16***	**17-19**	**13-18**
ENC-01	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**R**	**I**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-02	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-03	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**I**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**I**
ENC-05	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**R**	**I**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-06	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-07	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**R**	**I**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-08	**Pus**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**I**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-09	**ECBU**	*Enterococcus faecium*	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-10	**Pus**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-11	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**I**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-12	**Hémoculture**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-13	**Hémoculture**	*Enterococcus faecium*	**R**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-14	**ECBU**	*Streptococcus agalactiae*	**R**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-15	**ECBU**	*Enterococcus faecium*	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-16	**Pus**	*Enterococcus faecium*	**R**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-17	**Hémoculture**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-18	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-18 Bis	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**R**	**S**	**R**	**I**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-19	**Hémoculture**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-20	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-21	**Réanimation**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-22	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**I**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**

ENC-23	**ECBU**	*Enterococcus avium*	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-24	**Pus**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**S**	**I**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**
ENC-25	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**I**	**S**	**S**	**S**	**S**	**R**	**S**	**S**	**S**	**S**
ENC-26	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**R**	**I**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**R**
ENC-27	**ECBU**	*Enterococcus faecalis*	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**R**



$$R\ (\%) = \frac{NSR}{NT} \times 100$$

NSR : Nombre des souches résistantes.

R : Taux de résistances

NT : Nombre totale des souches.

Figure 11 : Taux de résistances des entérocoques aux différents antibiotiques testés

III.5. Analyse de la tolérance à la vancomycine

Le résultat de la survie à la vancomycine des isolats cliniques des différentes origines d'infection sont rapporté dans la (figure 12).**Tolérance %=**$\frac{n\ (UFC)\ T24}{n(UFC)T\ 0}$ **T : temps.**

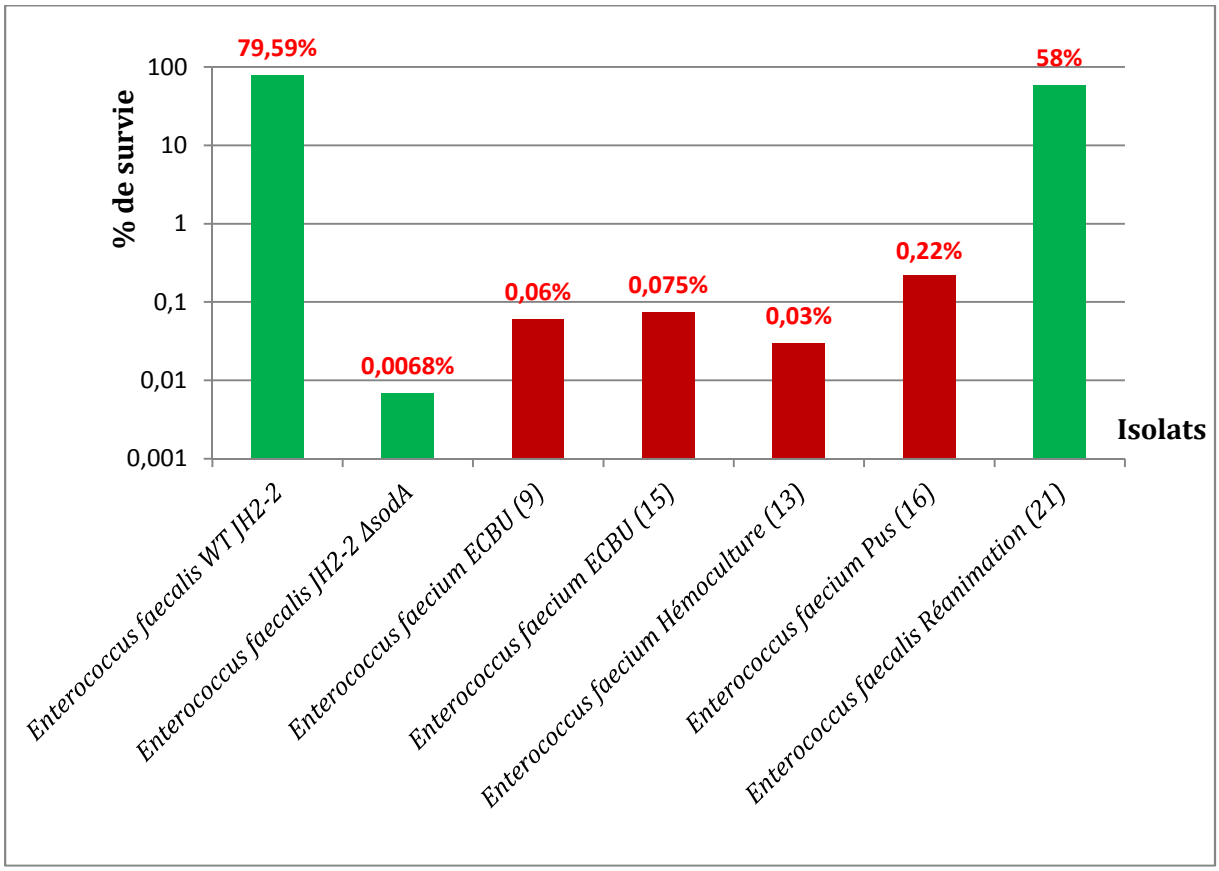


Figure 12 : Survie des souches d'*Enterocuccus faecalis* et *Enterococcusfaecium* à la vancomycine (15 µg/ml).

Les bactéries sont dites tolérantes lorsqu'elles sont capables d'échapper à l'action bactéricide d'un antibiotique. Les entérocoques sont reconnus pour être tolérants à de nombreux antibiotiques bactéricides, ce qui fait de ce genre un bon modèle pour l'étude de la tolérance aux agents antimicrobiens **(Ladjouzi, 2013).**

D'après la figure, l'ensemble des souches d'*E. faecium* testées ne montrent pas une tolérance à la vancomycine par rapport à la souche sauvage (témoin positif) d'*E. faecalis* JH2-2. Elle se comporte plutôt comme le mutant *sodA* (témoin négatif). Cependant, la souche d'*E. faecalis* isolée des services de réanimation présente un niveau important de tolérance estimé à 58%.

En clinique, cette tolérance aux antibiotiques pose des difficultés de traitement lors d'infections comme les endocardites, les méningites ou les bactériémies **(Mc Cullers *et al.*, 2000; Safdar et Rolston, 2006; Bizzini *et al.*, 2007).**

Conclusion & Perspectives

Les entérocoques font partie de la flore fécale Humaine. Au cours des dernières décennies, l'importance clinique accordée aux entérocoques n'a cessé d'évoluer du fait de leur implication dans les infections nosocomiales.

Les infections nosocomiales les plus courantes provoquées par ces entérocoques sont des infections urinaires, intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies, d'endocardites et de méningites. Le développement de la résistance aux antibiotiques des entérocoques peut être due à plusieurs facteurs à savoir : Un séjour prolongé à l'hôpital, l'utilisation empirique des antibiotiques et notamment la capacité remarquable à transférer des éléments génétiques mobiles ce qui facilite la propagation rapide des multi résistances.

A la lumière de ce travail, les conclusions suivantes sont tirées :

- La majorité des infections causées par les entérocoques sont d'origine urinaire (63%).
- Les résultats d'identification des isolats montrent qu'Enterococcus *faecalis* est à l'origine de 77% des infections, suivie par *E. faecium* (15%) puis par *E. avium* (4%).
- La caractérisation des phénotypes de résistance aux antibiotiques de l'ensemble des isolats cliniques révèle des multi-résistances aux divers antibiotiques au sein du même isolat.
- Un taux de 96% des souches sont résistantes à la clindamycine, 70% à la streptomycine, 60% à la tétracycline et 55% à l'érythromycine ainsi qu'à la rifampicine. A un degré moins, d'autres résistance ont été également obtenues à l'égard des β-lactamines, de la norfloxacine et des aminoglycosides.
- Tous les isolats sont sensibles aux glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) et à la lincomycine.

Enfin, notre étude nous a permis de faire un état des lieux préliminaire dans la région de Bejaia afin de prévenir l'émergence des entérocoques vancomycine résistants.

En perspective, l'installation des commissions de contrôle des infections nosocomiales est nécessaire afin de prévenir toute épidémie qui serait due aux germes pathogènes opportunistes. Une telle structure va aider à mieux maitriser les conditions d'hygiènes dans les centres de santé dans le but de réduire toutes contaminations pendant un séjour à l'hôpital.

Références bibliographiques

A

Abbassi, M.S., Achour, W., Touati, A et Ben Hassen, A. (2009) .*Enterococcus faecium* isolated from bone marrow transplant patients in Tunisia: High prevalence of antimicrobial resistance and low pathogenic power. *Pathologie Biologie*, 57: 268-271

Aggoune , N., Chabani , A, Tiouit ,D., Naim, M et Rahal, K. (2008) . Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. *Médecine et maladies infectieuses*, 38 : 557-558.

Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., David Campos, D et Thonart,P .(2012).Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 16(1) : 67-76.

B

Bizzini,A., Zhao, C., Auffray,Y et Hartke, A (2009).the *Enterococcus faecalis* superoxyde dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64:1196-1202.

Blondiaux N., Gaillot, O et Courcol, R.-J. (2010).Identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF évaluation au CHU de Lille. *Pathologie Biologie*, 58 :55–57.

Besnier, J.M., Guerout, T., Mion, P., Choutet, P et Leport, C.(1994) .Aspects actuels des endocardites entérocoque. *Méd Mal Infect* ; 24 : 177 -190 .

Bonnet, R., B.R.U, P . , Caron, F. ,Catoir,V.,Chardon, H., Courvalin, P., Dubreuil, L.,Jarlier, V., Lambert, T et al.(2014).*Comite de l'antibiogramme de société française de Microbiologie*.CHU Straobourg : Francois JEHL.102p.

Boyce, J.M., Opal, S.M., Potter-Bynoe, G., LaForge, R.G., Zervos, M.J., Furtado, G., et al. (1992). Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* , 36:1032-1039.

C

Cereda, F., Sader H., Jones, R, Sejas, L., Machado, A., Zanatta Y, et al.(2001). *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VAN A phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. *Braz J Infect Dis*, 5(1) :40–46.

Cetinkaya, Y., Falk, P, Mayhall, C.G., (2000).Vancomycin-resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 13: 686-707.

Courvalin, P. (2006).Vancomycin-resistance in Gram positive cocci. *Clin Infect Dis* ,42(1):25–34.

Courcol, R.(2009). Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ?.*MICROBIOLOGIE*, 416 :61-64.

Coignard,B .,Thiolet, JM et Lacavé,L.(2006). Enquête nationale de prévalence de des infections nosocomiales. InVS.

D

Delmas, J., Robin, F., Romaszko, J-P., Baraduc, R., Lesens , O., Sirot , J et Bonnet , R.(2005). Utilisation de la gélose VCA3 (bioMérieux) pour l'isolement sélectif des entérocoques résistants à la vancomycine à partirde prélèvements fécaux .*Pathologie Biologie*, 53 :485–489.

Dernuet, S.R.(1995). *Antibiotiques et antibiogrammes*, Paris - Montréal, Vigot- Décarie, 1995, 322p

Devriese, L. A., Pot, B. et Collins, M. D.(1993). *Enterococcus colombae*, a species from pigeon intistines. *FEMS Microbiol Lett*, 59 :247-251.

Dupont, H . et Plantefève, G. (2002), Infections sévères à entérocoque en réanimation.

541-554.

F

Foulquié Moreno,M.R.,Saratinopoulos,P.,Tsakaledou,E. et DeVuyst,L.(2006).The role and application of enterococci in food and health .*International Journal of Food Microbiology* ,106: 1-24.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H. et Stiles , M.E.(1999). Enterococci at the crossroads of food safty ?. *Int J Food Microbiol* ,47 :1-24.

Frankenberg,I.,Brugna, M et Hedertedt, L.(2002). Enterococcus faecalis heme-dependent catalase. *J Bacteriol*, 184:6351-6356

G

Godreuil, S . Marchandin, H., Boulier, A., Boumzebra,A., Campos,J et Jean-Pierre ,H. (2007) . year study of glycopeptides-resistant enterococci in 3 intensive care units of the University Hospital of Montpellier .*Pathologie Biologie*,55 :418–423.

Grayson, M.L., Eliopoulos, G.M, Wennersten, C.B., Ruoff, K.L., De Girolami, P.C., Ferraro, M.J et al. (1991).Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of Enterococcus faecium: a 22-year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother*.

35:2180-2184.

H

Hoen ,B., Alla, F., Selton-Suty ,C., Beguinot, I., Bouvet, A, Briancon, S., et al. (2002).Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 288:75-81

Huycke , M. M., Sahm, D. F et Gilmore ,M.S.(1998).Multiple-drug resistant enterococci : the nature of the problem and agenda for the future . *Emerging Infect Dis*, 4: 239-249

Henning, K et Brown, A.E.(1995).Vancomycin resistant enterococci. *Infect. Uro1*, 8 (6): 185-187.

J

Jupeau-Vessieres, A.M et Scavizzi, M.R. Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Encyc.L.Méd. Chîr. (paris - FRANCE), *Maladies Infectieuses*, 8-006-0-10, 1994, 16p.

K

Klein,G.,Bonaparte,C.et Reuter, G .(1998).Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria .*Int. J. Food. Microbiol*, 41: 103-125.

L

Lelievre, H., Lina, G., Jones, M.E., Olive, C., Forey, F., Roussel Delvallez, M., et al. (1999). Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol*, 37:3452-3457.

Lepelletier, D., Richet, H. (2001).Surveillance et contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans les hôpitaux français. *BEH*, 6:25-27.

Ladjouzi, R. (2013).*Analyse des mécanismes de tolérance aux antibiotiques ciblant la paroi chez les entérocoques*. Travail de diplôme en vue de l'obtention du diplôme doctorat, aspect moléculaire et cellulaire de la biologie, Ecole doctorale normande biologie Intégrative, Sante, Envirennement, p. 225.

Ladjouzi, R., Bizzini, A., Lebreton, F., Sauvageot, N., Rincé, A., Benachour, A. & Hartke, A. (2013). Analysis of the tolerance of pathogenic enterococci and Staphylococcus aureus to cell wall active antibiotics. *J Antimicrob Chemother* .68, 2083–2091.

Lyytikäinen, O., Kanerva, M., Agthe, N., Mottonen, T et Ruutu, P. (2008). Helthcare-associated infection in Finnish acute care hospitals: a national prevalence survey, 2005.*J Hospn Infect*,69:288-294.

Lancefield, R.C.(1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci . *J Exp Med* ,57 : 571-595.

Lesensa,O (2009) . L'entérocoque résistant à la vancomycine (ERV) Vancomycin résistant Enterococci (VRE). *Néphrologie & Thérapeutiques*, 4 : 261—264.

Leclercq, R. (1994). Epidémiologie des infections nosocomiales Entérocoques. Méd Mal Infect, 24 :199 – 206 .

Leclercq, R et Courvalin, P. (1997) .Glycopeptides resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*, 24:545– 546.

Larpent, J.P. (1996). Lait et produits laitiers in Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaire. *Tec&Doc*,4-33.

Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Brisson-Noel, A., Molinas, C., Derlot E,Arthur, M, et al. (1992).Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis*,15:495–501.

M

Muhammad Ibrahim,G., Sundaramoort, S. et Madhavan, R. (2013). *Enterococcus*: An Emerging Global Superbug. *International Journal of Science and Researc*,.4:438.

Margot Phaneuf,Chantal Gadbois,(2010). Les infections nosocomiales - Agir ensemble

pour des milieux cliniques sains et sécuritaires.

Moufida, H., Ammari, H., Ghaffor, M., Benamrouche, N., Tali-Maamar, H., Tala-Khir, F ., Younsi, M et Rahal, K.(2013) Émergence d'Enterococcus faecium résistant aux glycopeptides en Algérie: à propos d'un cas. *Ann Biol Clin*, 71 (1): 104-6.

N

NNIS.(1999).National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1990 , issued June 1999. *Am Infect Control*, 27:520-532.

Na ,S., Park,H.J., Park,K.-H., Cho,O,H., Chong,Y.P.,Kim,S.H.,Lee,S.O ., Sung,H.,Kim ,M.N.et al (2012).Enterococcus avium bacteremia : a 12-year clinical experience with 53 patients . *Eurt J Clin Microbiol Infect Dis*, 31:303-310.

Noble, W. C .,Virani, Z. et Cree, R.G.(1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus* . *FEMS Microbiol Lett* , 72 :195-198.

O

Oprea, S.F., Zaidi, N., Donabedian, S.M., Balasubramaniam, M., Hershberger, E. et

Zervos, M.J. (2004) Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant

Enterococcus faecalis. *J. Antimicrob. Chemother*, 53 : 626-630.

Ogier, J.-C et Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus . *Int J Food Microbiol*, 126:291-301.

P

Pieniz et Martin., (2015).Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect.

Patel,R.,(2003). Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* ,51 Suppl 3:13-21.

R

Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (page consultée le 10/04/2011). Alerte *Enterococcus faecium* Van A, [en ligne].http://www.sante.dz/aarn/alerte.htm.)

Rice, L.B. (2001).Emergence of vancomycin-resistant enterococci. Emerg Infect Dis, 7:183-187.

Rybkine, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E et Gutmann, L. (1998) .Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J Infect Dis*,178:159-1563

S

Schleifer,K et Kilpper-Balz,R.(1984). Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Union of Microbiological Societies*.43: 31-34

Swampillai , J., Liang ,M ., Fisher,R. et al .(2012). *Enterococcus gallinarum* causing native valve endocarditis and aorto-atrial fistula : a case report and literature review. *Echocardiography*, 29: 873-875.

Shepard,B. D., et Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci : the mechanisms and dynamies of drug introduction and resistance .*Microbes Infect*, 4 :215-224.

Sood, S., Malhotra, M., Das BK et Kapil A.(2008). Enterococcal infections and antimicrobial resistance. *Indian J Med Res,* 128(2):111-121.

Stiles, M .E et Holzapfel, W H. (1997) .Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology,* 36: 1-29.

Sanguinetti, M et Posteraro, B.(2014).MALDI-TOF Mass Spectrometry :Any Use for Aspergilli ?. *Mycopaologia*, 1-2.

T

Terzaghi B.E. et Sandine W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and

their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29:807-813.

V

Vijayakrishnan, R et Rapose,A.(2012).Fatal *Enterococcus durans* aortic valce endocarditis : a case report and review of the literature. *BMJ Case Rep* .

Z

Zouain, M.G et Araj,G.F.(2001). Antimicrobial resistance of Enterococci in Lebanon. *International journal of Antimicrobial agents*, 17:209-213

Annexes

Milieu M17 Agar (OUADGHIRI, 2009).

-Tryptone.....2,50 g
- Peptone pepsique de viande .....2,50 g
- Peptone papaïnique de soja .....5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....2,50 g
- Extrait de viande .....5,00 g
- Lactose .....5,00 g
- Glycérophosphate de sodium .....19,00 g
- Sulfate de magnésium .....0,25 g
- Acide ascorbique .....0,50 g
- Agar bactériologique.....15,00 g

Mueller-Hinton

- Hydrolysât acide de caséine .....17,5 g
- Infusion de viande.....2,0 g
- Amidon soluble .....1,5 g
- Agar agar bactériologique.....17,0 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

Milieu Bile Esculine Azide de Sodium

- Tryptone.....17,00 g
- Peptone pepsique de viande .....3,00 g
- Extrait autolytique de levure.....5,00 g
- Bile de boeuf bactériologique .....10,00 g
- Chlorure de sodium.....5,00 g
- Esculine .....1,00 g
- Citrate ferrique ammoniacal .....0,50 g
- Azide de sodium .....0,15 g
- Agar agar bactériologique.....13,00 g

PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.00

Résumé

Bien que faisant partie de la flore intestinale de l'Homme, les entérocoques peuvent être à l'origine de différentes infections qui s'avèrent parfois difficile à éradiquer. Le but de ce travail vise à établir un état des lieux des infections dues aux entérocoques dans la région de Bejaia afin de prévenir l'apparition des entérocoques vancomycine résistants, comme c'est les cas aux USA et en Europe. Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail consiste à isoler puis à identifier les souches d'entérocoques isolées au CHU de Bejaia (Khelil Amrane). En outre, l'identification de ces bactéries est suivie par une caractérisation des phénotypes de résistance aux antibiotiques majoritairement utilisés en clinique pour le traitement des infections dues aux entérocoques. L'ensemble des résultats obtenus indiquent que la majorité des infections causées par les entérocoques sont d'origine urinaire (63%). Par ailleurs, les résultats d'identification des isolats montrent que *Enterococcus faecalis* est à l'origine de 77% des infections, suivie par *E. faecium* (15%) puis par *E. avium* (4%). La caractérisation des phénotypes de résistance aux antibiotiques de l'ensemble des isolats cliniques révèle des multi-résistances aux divers antibiotiques au sein du même isolat. Un taux de 96% des souches sont résistantes à la clindamycine, 70% à la streptomycine, 60% à la tétracycline et 55% à l'érythromycine ainsi qu'à la rifampicine. A un degré moins, d'autres résistance ont été également obtenues à l'égard des β-lactamines, de la norfloxacine et des aminoglycosides. Cependant, tous les isolats sont sensibles aux glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) et à la lincomycine. Enfin, notre étude nous a permis de faire un état des lieux préliminaire dans la région de Bejaia afin de prévenir l'émergence des entérocoques vancomycine résistants.

Mot clés : Entérocoques, Résistances aux antibiotiques, Infections nosocomiales.

Abstract

Enterococci are widespread in nature and intestinal commensals of humans. These organisms cause increasing concerns in public health causing infections difficult to eradicate. The aim of this study is to establish an inventory of infections due to enterococci in the region of Bejaia in order to prevent the emergence of vancomycin-resistant enterococci as is the case in the USA and Europe. In this context, the first objective of this work is to isolate and identify enterococci isolated from the Bejaia UHC (Khelil Amrane). Furthermore, identification of the bacteria is followed by a characterization of antibiotic resistance phenotypes mainly used in clinic for the treatment of enterococci infections. The overall results indicate that the majority of enterococci infections are from the urinary origin (63%). Moreover, the identification results of the isolates show that *Enterococcus faecalis* is responsible for 77% of infections, followed by *E. faecium* (15%) and by *E. avium* (4%). The characterization of antibiotic resistance phenotypes of all clinical isolates reveals multiresistance to the various antibiotics. A rate of 96% of strains resistant to clindamycin, 70% to streptomycin, , 60% to tetracycline and 55% to erythromycin and to rifampicin. At a less degree, other resistance were also obtained to β-lactam, norfloxacin and aminoglycosides antibiotics. However, all isolates were susceptible to glycopeptides (vancomycin, teicoplanin) and lincomycin. Finally, our study allowed us to make a preliminary repport in the Bejaia region in order to prevent the emergence of vancomycin-resistant enterococci.

Key words: Enterococci, Antibiotic resistance, nosocomial infection