

Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Recherche de souches d'entérocoques
multirésistantes chez les animaux d'élevage**

Présenté par :

HAMANI Ghanima & KHENICHE Sihem

Soutenu le : 30-05-2018

Devant le jury composé de :

M. KECHA M
M. TOUATI A
M. ADJEBLI A

Professeur	Président
Professeur	Encadreur
MCB	Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Nous tenons à remercier Pr. TOUATI. A pour son encadrement.

Nos remerciement s'adresse à notre co-promotrice, M^{elle} MAIRI .A pour sa patience, ses encouragements, son aide pratique, son soutien morale et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail.

Nous tenons également à remercier les éleveurs pour leur gentillesse et leur soutien lors de prélèvements.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail

A mes chers parents

*Ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.
Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

A mon mari Riadh

Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré. Cher mari j'aimerai bien que tu trouve dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour...

Que Dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.

C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je t'aime mon bébé et je te souhaite tous le bonheur du monde.

A ma sœur Meriem et mon frère Ishak : J'espère que mon travail sera le témoignage de mon respect et de mes sentiments les plus sincères.

A ma grande mère Zhira.

A mes beaux parents Horia et Mokranne que j'aime.

A mes belles sœurs : Hinda, Sihem, Chafia et Warda.

A mes beaux frères : Lamine et Faicel.

A toute la famille Kheniche et Aoudia.

A mes copines : Asma, Karima et Dihia.

A ma binôme Ghanima.

A toute l'équipe de petit laboratoire et à la section de microbiologie fondamentale MII

Dont le grand plaisir leur revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Sihem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes très chers parents, pour leur tendresse, leur sacrifice, leur
patience et leur soutien.*

A mes chers sœurs Fazia et Saida.

A mes chers frères Nadjem, Nourdinne et Rachid.

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

Que Dieu vous gardes et vous protèges.

*A tous mes amis sans exception : Nabila, Mounia, Souhila, Nawal,
Ouafa, Iman, Jouhra, Kanza, Samia, Mounira, Katia, Linda et a toute la
section de Master II Micro Biologie fondamentale.*

A ma binôme : siheme.

A mes copine de chambre : wassila et wissam

*A toute l'équipe de petit laboratoire, qui j'ai partagé avec eux des
agréables moments.*

A tous ceux qui mon aidé a l'élaboration de ce travail.

Ghanima

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
I- Animaux d'élevage.....	2
I.1- Généralité.....	2
I.2- Usage des ATB en élevage.....	2
II- Entérocoques	4
II.1- Histoire et taxonomie.....	4
II.2- Les caractères bactériologiques	4
II.2.1- Habitat des entérocoques.....	5
II.2.2- La pathogénicité	5
III- Mécanismes de résistance des entérocoques aux antibiotiques	6
III. 1- Résistances naturels des entérocoques aux antibiotiques.....	6
III. 2- Résistance acquise des entérocoques aux antibiotiques.....	6
III.3- Les voies de transmission des BMR	8
IV- Matériel et méthodes	9
IV.1- Origine et prélèvement des échantillons.....	9
IV.2- Procédure d'isolement et d'identification des entérocoques	10
IV.2.1- Coloration de Gram	11
IV.2.2- Recherche de la catalase.....	11
IV.2.3- La croissance sur bouillon hyper salé	11
IV.2.4- Test de la résistance à la chaleur	12
IV.2.5- La résistance au tellurite de potassium.....	12

Sommaire

IV.3- Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	12
IV.4- Etude de la C.M.I des souches vis-vis de la vancomycine	13
Résultats	14
Discussion et conclusion	24
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

AM : Ampicilline

ATB : Antibiotique

BEA : Bile Esculine Azide

BMR : Bactéries multirésistante

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CIP : Ciprofloxacine

D-ala-D-ala : D-analyl-D-alanine

E .feacalis : *Entérocooccus feacalis*

E .faecium : *Entérocooccus faecium*

GM17 : M17 addistionnée de Glucose

IPM : Imipénème

LEV : Levofloxacine

MH : Mueller Hinton

SXT : Triméthoprime

VA : Vancomycine

Liste des tableaux

Tableau 1: Les aliments concentrés et leur valeur nutritionnels.....	2
Tableau 2: Lieux des prélèvements.....	9
Tableau 3: Caractérisation des antibiotiques testés	12
Tableau 4: Préparation des différentes concentrations de vancomycine	13
Tableau 5: Répartition des prélèvements	14
Tableau 6: Résultats des tests d'identification des souches d'entérocoques	18
Tableau 7: Répartition des souches d'entérocoques isolées par animal	19
Tableau 8: Résultats de la concentration minimal inhibitrice vis-à-vis de la vancomycine	20
Tableau 9: Résultats d'antibiogrammes obtenus pour chacune des souches d'entérocoques isolées	20
Tableau 10: Taux de portage des entérocoques résistante à la vancomycine par animal	22

Liste des figures

Figure 1: Cycle de transmission des bacteries multirésistante	8
Figure 2: Protocole d'isolement et d'identification des entérocoques.	10
Figure 3: Isolement des entérocoques sur gélose BEA et M17.....	15
Figure 4: Aspect microscopique des entérocoques	15
Figure 5: Résultat du test de la catalase	16
Figure 6: Résultats du test de la Croissance des entérocoques sur bouillon hypersalé et le test de résistance à la chaleur	16
Figure 7: Test positif de résistance au tellurite de potassium (<i>E. faecalis</i>).....	17
Figure 8: Résultats des concentrations minimales inhibitrices (résistance à la vancomycine) 19	
Figure 9: Résultat d'un antibiogramme d'une souche d'entérocoque isolée.....	21
Figure 10: Taux de résistance des souches d'entérocoques aux différents antibiotiques testés	21
Figure 11: Taux de portage des entérocoques résistante à la vancomycine par région	23

Introduction

Introduction

Les animaux d'élevage constituent une source très importante pour l'alimentation humaine. Parmi ces produits se démarque la viande, le lait et les œufs. Et pour cela les éleveurs additionnent des antibiotiques dans les aliments dans le but d'améliorer la vitesse de croissance et l'indice de consommation des animaux (Corpet, 2000). Cependant, l'utilisation irrationnelle de ces antibiotiques favorise la sélection d'une flore bactérienne multirésistante (Guillot et al ,2014).

Les animaux d'élevages peuvent acquérir une flore bactérienne résistante par différentes voies à savoir : assimilation directe par voie alimentaire basée essentiellement sur les végétaux (fourrages) qui peuvent être facilement contaminés par le sol. De plus, les digestions animales utilisées pour fertiliser les terres sont également une source de contamination qui favorise la diffusion de bactéries pathogènes dans l'environnement. Ainsi le cycle de transmission s'élargit pour atteindre un grand nombre de vivants compris l'Homme (David Francoz et al. 2014).

Les entérocoques sont des hôtes naturels du tube digestif de l'Homme et des animaux. Il a été démontré que les deux espèces prédominantes sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* responsables d'infections nosocomiales, d'infections du tractus urinaire, bactériémies et d'endocardites (Aguilar-Galvez et al ,2012). Leur résistance aux glycopeptides a émergé d'abord aux Etats-Unis et plus récemment en Europe. Les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont un des microorganismes à haut risque de transmissibilité et de développement croisé de résistance aux antibiotiques avec un risque de transférer leur gènes de résistance à d'autres bactéries pathogènes comme le *Staphylococcus aureus* (Senne et al ,2013).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui vise à rechercher des entérocoques multirésistants chez les animaux d'élevage suite d'un plan de travail basé sur la :

- Réalisation des prélèvements rectaux chez les animaux d'élevage.
- Isolement et identification des souches d'entérocoques.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des souches d'entérocoques isolées à la vancomycine.
- Etude de la sensibilité des souches d'entérocoques vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques.

**Synthèse
bibliographique**

I- Animaux d'élevage

I.1- Généralités

Les animaux d'élevage sont des animaux domestiques destinés à la production des produits alimentaires (viandes, lait, œufs...). Leur alimentation est fondée exclusivement sur les fourrages pour les bovins et ovins (M'Bodji, 1973). Tandis que pour la volaille elle est à base de céréales (Yo et al. , 1994). Dans le but de réduire les coûts de production et améliorer la qualité et la traçabilité des produits alimentaires, les éleveurs utilisent des compléments alimentaires qui sont définis comme « *des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentré de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique* » (Valette, 1988). Le tableau 1 donne quelques exemples de compléments alimentaires.

Tableau 1: Les aliments concentrés et leur valeur nutritionnelle (Gaudé, 2015).

Lieu de fabrication des compléments alimentaires	Forme d'aliments fabriqués	Valeur nutritionnelle
44% d'aliments concentrés sont fabriqués à la ferme	Sous forme de mélange raisonné de matières premières (Céréales, Racines, Tubercules secs,...).	Assure les besoins protéiques et énergétiques
56% D'aliments concentré sont fabriqués par les industries	96% sous forme des granules ou de farines.	Energie, Matières azotés, Vitamines, Oligo-éléments, Enzymes, Acides aminées et Minéraux.
	Sous forme de minéraux.	Phosphore, Calcium, Magnésium,...
	Sous forme de pierres à sels.	Sont destinées à allaitement des jeunes animaux.

I.2- Usage des ATB en élevage

Les antibiotiques sont utilisés depuis les années 50 en médecine vétérinaire dans le but de traiter et de contrôler les maladies infectieuses d'origine bactériennes chez les animaux de rente et les animaux de compagnie (Sandars, 2005). Cependant, l'usage des antimicrobiens dans l'élevage se fait selon différentes modalités à savoir :

- **Effet préventif:** administration d'antibiotiques à des doses thérapeutiques ou sub thérapeutiques à des animaux à risque de développer la maladie.

Synthèse et bibliographique

- **Effet métaphylactique** : administration d'antibiotiques à des doses thérapeutiques à des animaux qui sont malades et qui sont soit en incubation de la maladie ou à fort risque de la développer.

- **Effet curatif** : administration des antimicrobiennes à des doses thérapeutiques qui ce fait en majorité dans l'eau ou dans la nourriture (Chatellet, 2007).

Les principales molécules d'antibiotiques utilisées par les éleveurs en filière bovine, en France, sont représentées par les aminosides (40%), les pénicillines (42%), tétracyclines (30%) et les polypeptides (27%) (Cazeau et al. ,2010).

Cependant, en Europe, hors pays nordiques la plupart des animaux d'élevage reçoivent des compléments alimentaires avec un antibiotique administré à faible dose dans l'alimentation animale (100% chez le veau, 95% chez le poulet et 35% chez les bovins) (Corpet ,2000). En revanche, en absence de la maladie, les antibiotiques sont administrés dans le but d'améliorer la croissance et favoriser le gain de poids des animaux (Dardenne et al. , (2002) ; Sanders, 2005).

Par ailleurs, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance favorise une augmentation du taux de résidus d'antibiotiques dans les denrées animales (viandes, les abats, lait,...) (Mensah et al , 2014) et sélectionne également des bactéries résistantes chez l'animal et peuvent être rejetés dans l'environnement (Mondial de la santé , 2017).

II- Entérocoques

II.1-Histoire et taxonomie

Enterococcus faecalis a été décrite pour la première fois en 1886 par Eschirich sous le nom de *Micrococcus ovalis*. La description originale et officielle de cette souche est donnée par Thiercellin en 1899 qui est une bactérie de forme sphérique, diplocoque, Gram+, d'origine intestinale et selon ses critères la bactérie porte le nom *Enterococcus*. Après sept ans, un groupe de streptocoque isolé au sein de l'intestin humain est dénommé *Streptococcus faecalis* par Andrewes et Horder et à la même période une similarité entre *Enterococcus* et *S. faecalis* a été découverte. En 1921, Dible propose de rassembler les *Enterococcus* et *S. faecalis* dans un groupe isolé à partir de tractus intestinal humain, diplocoques et résistants à la chaleur (Flahaut et al.2011).

A partir de 1930, les entérocoques étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D) et avec le développement de la biologie moléculaire et des nouvelles techniques, ils ont subi une nouvelle classification. Ils sont classés dans le règne Bactéria du phylum Firmicutes, appartiennent à la famille des *Enterococcaceae*, classe Bacilli et l'ordre des Lactobacillales (Aguilar –Galvez et al. 2012).

Le genre *Enterococcus* renferme plusieurs espèces dont deux dominant en pathologie humaine : *E. faecalis* (80-90 %) et *E. faecium* (5-10%) (Cattoir et leclercq., 2010).

II.2- Les caractères bactériologiques

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif de morphologie ovoïde disposés en diplocoques ou en courtes chainettes. Ils sont immobiles, non sporules et rarement capsulés.

Ces bactéries sont aéro-anaérobies facultatives, oxydase positive, dépourvues de la catalase mais certaines espèces présentent une activité pseudocatalase, hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. Le germe *E. faecalis* a la capacité de réduire le tellurite de potassium.

Ce sont des microorganismes qui peuvent survivent dans des milieux hostiles de 6.5 % de NaCl et un pH compris entre 4.4 et 9.6, mésophiles capables de se développer à des températures allant de 10 à 45°C et dont certaines espèces peuvent résister à des températures de 60°C pendant 30min (Flahaut et al. ,2011 ; Aguilar –Galvez et al. , 2012).

II.2.1-Habitat des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires appartenant à la flore commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, de la cavité buccale ainsi que les conduits urogénitaux (Flahaut et al. , 2011).

Ils peuvent se retrouver également dans les différentes eaux (douces, usées et de mer), dans le sol et sur les végétaux (Aguilar –Galvez et al. 2012).

Une spécificité d'hôte existe malgré que plusieurs espèces cohabitent au sein d'une même niche. Les espèces les plus rencontrées chez l'Homme sont *E. faecalis* et *E. faecium*, cette dernière est l'espèce la prédominante chez la volaille et les porcins. Par contre chez les veaux, *E. faecalis* est l'espèce la plus fréquemment détectée dans les fèces, accompagnée de *E. faecium* (Sanders ,2005).

II.2.2- Pathogénicité

Par rapport à d'autres bactéries pathogènes, les entérocoques ne sont pas des germes très virulents. Pour se faire ils ont besoin d'exprimer des facteurs de virulence qui permettent la colonisation et l'invasion des tissus. Parmi les facteurs de virulence les plus étudiés sont la production de la cytolysine ou β - hémolysine qui est une toxine peptidique lysant la cellule animale en générant des pores au niveau de la membrane cellulaire. Les gènes de cette toxine sont souvent portés par des plasmides, la production d'une substance d'agrégation (glycoprotéine codée par un gène plasmidique) qui joue un rôle primordiale dans la colonisation de l'hôte et production d'enzymes hydrolytiques tels que l'hyaluronidase, gélatinase et la protéase à sérine (Aguilar –Galvez et al., 2012).

Les entérocoques provoquent plusieurs infections telles que les infections nosocomiales, urinaires, biliaires, intra-abdominales ainsi que d'autres maladies telles que les endocardites, méningites, pneumonies, péritonites, abcès viscéraux et septicémies (Flahaut et al., 2011 ; Leclercq, 2001).

III- Mécanismes de résistance des entérocoques aux antibiotiques

Il existe de nombreuses molécules d'antibiotiques mais on peut les regrouper selon leur cible en cinq grands groupes : les antibiotiques qui agissent sur la paroi, la membrane, la synthèse des protéines, la synthèse des acides nucléiques et des antibiotiques agissant sur le métabolisme intermédiaire.

III.1-Résistances naturelles des entérocoques aux antibiotiques

Les entérocoques se caractérisent par une résistance naturelle de bas niveau vis-à-vis de nombreux antibiotiques tel que les aminosides (due à une anomalie de transport membranaire de ces antibiotiques), à la clindamycines, aux lincosamines, aux sulfamides, aux quinolones et aux β -lactamines. La résistance à ces dernières est liée à la présence d'une PLP particulière qui est la PLP₅ de faible affinité pour les pénicillines. Cette PLP₅ est d'une CMI élevée qui est dix à 100 fois supérieure à celle observée pour les autres streptocoques. Les céphalosporine sont naturellement inactives sur les entérocoques (Quincampoix et Mainardi.,2001) .

III.2 -Résistance acquise des entérocoques aux antibiotiques

-Résistance aux aminosides

La résistance acquise aux aminosides est associée à trois mécanismes à savoir ; altération de la cible ribosomale, modification de transport de l'antibiotique et détoxification enzymatique de l'antibiotique. Cette dernière liée à la présence d'enzymes modificatrices des aminosides qui sont divisées en trois classes en fonction de la réaction qu'elles catalysent (Dut-kamalen et Courvalin. , 1994).

-Résistance aux macrolides

La résistance acquise aux macrolides est liée à deux mécanismes : une résistance par la modification de la cible de l'antibiotique et l'expression du système d'efflux (Quincampoix et Mainardi. , 2001).

-Résistance aux β -lactamines

Deux mécanismes de résistance sont impliqués chez les entérocoques à savoir : la résistance par production d'une pénicillinase plasmidique qui a été rapportée pour la première fois en 1981 chez *E. faecalis* et la résistance par modification de la cible (mutation au niveau du gène codant pour la PLP₅ décrite chez *E. faecium*) (Gutmann, 1994 ; Quincampoix et Mainardi., 2001).

-Résistance aux glycopeptides

L'activité de la vancomycine est déterminée par la spécificité du substrat des enzymes qui déterminent la structure des précurseurs du peptidoglycane (courvralin, 2006).

Le mécanisme de résistance à la vancomycine est lié à la présence d'opéron qui code pour les enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs modifiés de la paroi (terminé par D-ala-D-lactate ou D-ala-D-serine) (Cattoir et Leclercq., 2010).

Selon les critères phénotypiques et génotypiques, il existe neuf types de résistance aux glycopeptides dont *van* (A, B, D, E, G, L, M, N). Concernant le phénotype *vanA* il se caractérise par une résistance à haut niveau à la vancomycine et à la téicoplanine, tandis que, *vanC* donne une résistance de bas niveau à la vancomycine avec une sensibilité à la téicoplanine (Lelercq, 1997).

III.3-Les voies de transmission des BMR

L'usage abusif des antimicrobiens ou leur utilisation inadéquate dans l'élevage chez les animaux destinés à la production alimentaire développe la sélection des bactéries multi résistantes tel que les ERV qui peuvent être transmis essentiellement de l'animale à l'éleveur, et particulièrement à l'Homme par contacte directe ou via la chaine alimentaire. Aussi, il faut ajouter la contamination de l'environnement (eau, sol et végétaux) par la matière fécale des animaux (David Francoz et al . ,2014 ; Traoré et al. ,2002).

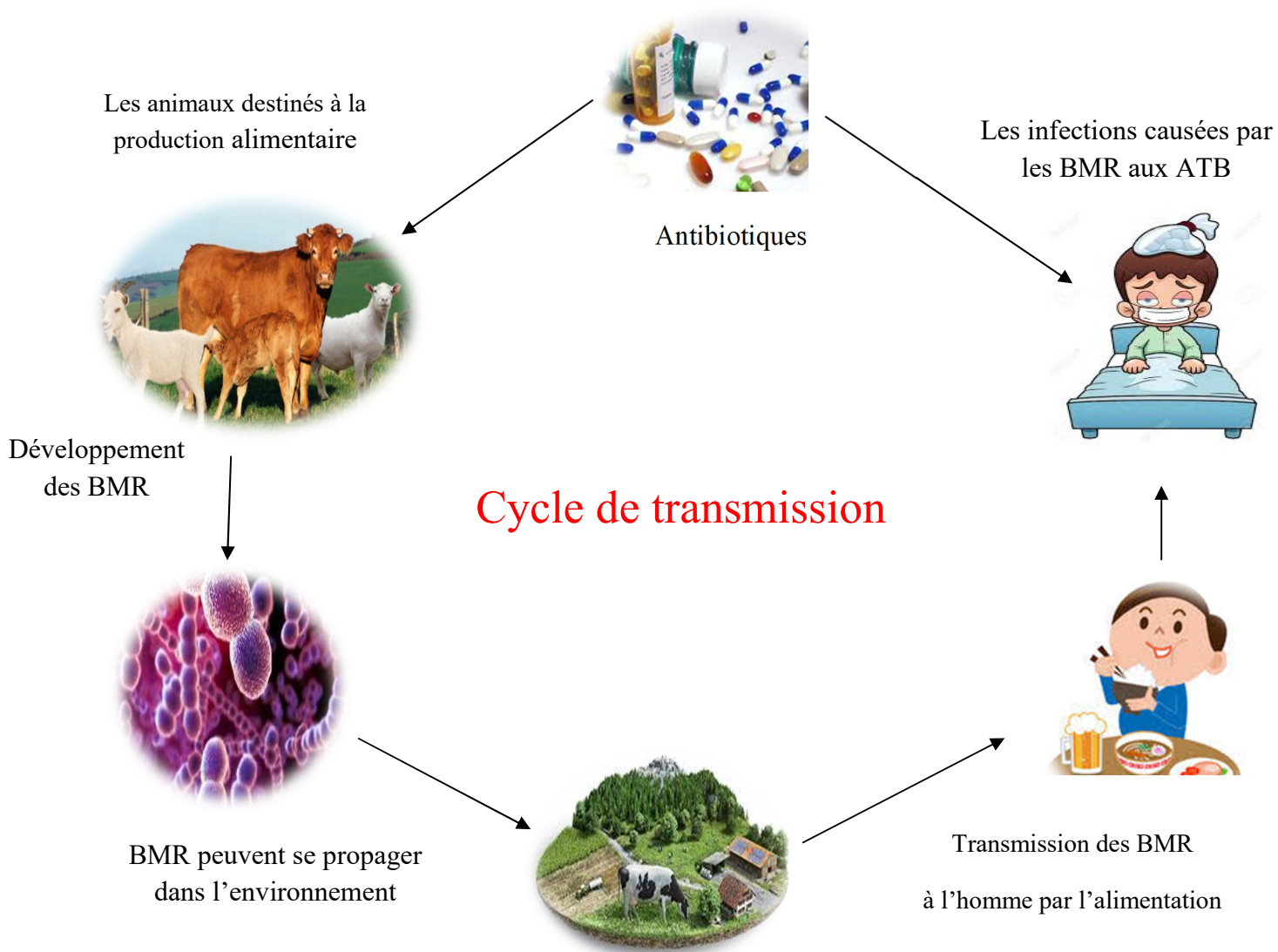


Figure 1: Cycle de transmission des bacteries multirésistantes

Matériel et méthodes

IV-Matériel et méthodes

IV.1-Origine et prélèvement des échantillons

Durant la période allant du 05/02/2018 au 07/04/2018, des écouvillonnages rectaux ont été effectués chez des animaux d'élevage dans différentes fermes de la région de Bejaïa, Bouira, Boussaâda et de Constantine. En parallèle, des échantillons d'aliments et d'eau ont été également prélevés. Les différents prélèvements ont été acheminés dans une glacière au niveau du laboratoire d'écologie microbienne (LEM) de l'université Abderrahmane Mira Bejaïa, ou ils ont été analysés.

Tableau 2: Origine et prélèvement des échantillons

Les wilayas	Les régions
Constantine	Serawi bachir (lekhroub)
	Ben madani
M'Silla	Maader commun maarif, दौरا Boussaâda
Bouira	Mechdalah
Bejaia	Beni-ksila
	El-kseur
	Souk-tenine
	Tazemalt
	Melbou
	Semaoune
	Tichy
	Sahel boulimat
	Oued ghir
	Beni-maouche
	Sidi aich
	Ouzlaguene
	Akbou

IV.2-Procédure d'isolement et d'identification des entérocoques

Le protocole d'isolement et d'identification des entérocoques est donné dans la figure 2 :

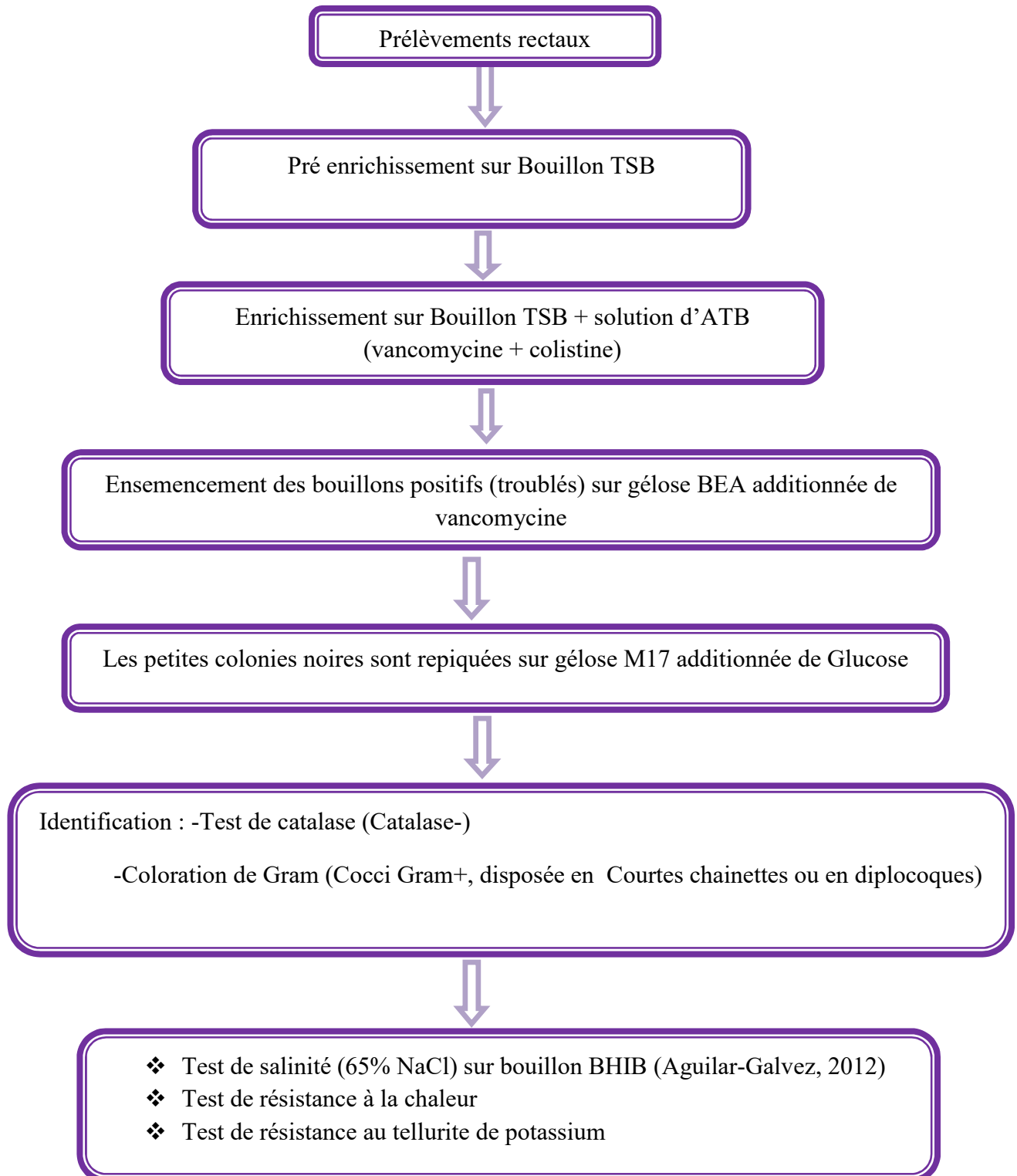


Figure 2: Protocole d'isolement et d'identification des entérocoques.

A fin de réaliser un pré-enrichissement, nous avons introduit les écouvillons rectaux dans des tubes à hémolyses contenant 1ml du TSB (Bouillon Trypticase Soja), et nous les avons incubé pendant 24h à 37°C.

Pour réaliser l'enrichissement, nous avons ajouté un volume de 50ul du bouillon de pré-enrichissement à 1ml de bouillon de TSB additionné de la vancomycine et de la colistine, puis nous avons incubé des tubes à 37°C pendant 24h.

Après 24h d'incubation, nous avons réalisé un isolement sur gélose BEA (Bille Esculine Azide, la composition de ce milieu est donnée en Annexe I) additionné de vancomycine. Les boites ont été ensuite incubé à 37°C/24h.

Après incubation nous avons repiqué des petites colonies translucides entourées d'un halo noir sur la gélose M17 (la composition de ce milieu est donnée en Annexe I) additionnée de glucose et nous avons incubé à 37°C /24h.

Pour identifier les souches d'entérocoques nous avons réalisé un ensemble de tests incluant :

IV.2.1 -Coloration de Gram

Nous avons réalisé un frottis bactérien que nous avons coloré (la composition des colorants est donnée en Annexe I) et observé au microscope optique. Les entérocoques apparaissent sous forme de cocci, déposé en diplocoques ou en courtes chainettes colorées en violet (Gram positif).

IV.2.2 -Recherche de la catalase

Sur une lame propre nous avons déposé une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) puis nous avons ajouté quelques colonies à l'aide d'une pipette Pasteur. Le résultat négatif se traduit par l'absence d'effervescence.

IV.2.3- Croissance sur bouillon hypersalé

A partir des boite BEA positives, nous avons préparé des suspensions bactériennes à partir du quelle nous avons prélevé une quantité, que nous avons ajouté dans BHIB additionné de 6.5% de NaCl. Les tubes ont été incubés à 37°C/24h. L'apparition d'un trouble indique que le test est positif (les entérocoques sont tous capables de se développer en milieu hypersalé (6.5% NaCl) contrairement aux streptocoques).

IV.2.4-Test de la résistance à la chaleur

A partir des suspensions bactériennes préparées nous avons ensemencé des tubes contenant 1 ml de TSB. Nous avons mis les tubes ensemencés dans un bain marie à 60°C pendant 30min puis nous avons incubé à 37°C/24h. L'apparition d'un trouble indique la présence d'une croissance bactérienne dans le tube.

IV.2.5-Test de résistance au tellurite de potassium

Les souches d'*E. faecalis* sont capables de réduire le tellurite de potassium. A fin de mettre en évidence ce test, nous avons ajouté 1ml de la suspension bactérienne à 4.5ml de TSB additionné de 0.5ml de tellurite de potassium préalablement dilué. L'apparition d'un noircissement au fond du tube à essai indique la présence d'*E. faecalis*.

IV.3 -Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode d'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton (la composition de ce milieu est donnée en Annexe I) (Conda, Espagne) selon les recommandations de L'EUCAST 2017. Les disques d'antibiotiques (tableau 3) ont été déposés à la surface de la gélose. Après incubation à 37°C pendant 24h à 48h, nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition et les résultats ont été interprétés selon les recommandations de L'EUCAST 2017.

Tableau 3: Caractérisation des antibiotiques testés

ATB	Famille d'ATB	Abréviation	Charge des disques (ug)	Diamètres critiques (mm)	
				S _≥	R<
Triméthoprim	Triméthoprim	SXT	25	50	21
Levofloxacine	Fluoroquinolones	LEV	5	15	15
Ciprofloxacine	Fluoroquinolones	CIP	5	15	15
Imipénème	Carbapénèmes	IMP	10	21	18
Ampicilline	Pénicillines	AM	10	10	8

IV.4-Etude de la C.M.I des souches d'entérocoques vis-vis de la vancomycine

Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I) nous avons préparé une solution stock de vancomycine d'une concentration de 10240 mg /L (EUCAST, 2000). A partir de cette solution, nous avons réalisé des dilutions tel que indiquer dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4: Préparation des échantillons élevés

La concentration d'antibiotique dans la solution stock (mg / L)	Volume de la solution stock (ml)	Volume d'eau distillée (ml)	La concentration d'antibiotique obtenue (mg/L)	La concentration finale après l'addition de 19 ml d'agar
10240	1	3	2560	128
2560	1	1	1280	64
2560	1	3	640	32
2560	1	7	320	16
320	1	1	160	8
320	1	3	80	4

Dans des boites Pétri, nous avons répartie 1 ml de chaque dilution auquel nous avons ajoutée 19 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion. Des suspensions bactériennes ont été préparées, un volume de 10 μ l de ces suspensions a été ensemencé en spots. Après nous avons incubé les boites à 37°C pendant 24h.

Résultats

1-Répartition des échantillons étudiée

Au cours de notre étude, un total de 330 prélèvements a été collecté à partir des animaux d'élevage (n=298), échantillons d'aliments (n=16) et échantillons d'eaux (n=16). La répartition des prélèvements par animal et par région est donnée dans le tableau 5.

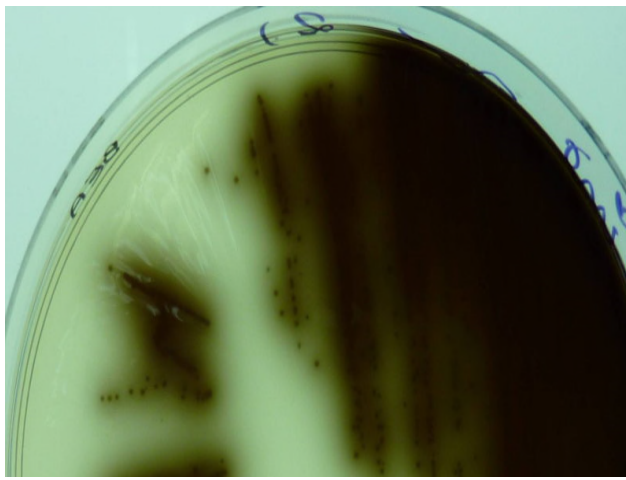
Tableau 5: Répartition des prélèvements

Animal/ Région	volaille			Bovins		Ovins		Caprins		Lapin	Aliments	eaux
	Poulet de chair	Poule pondeuse	Dinde	Vache	Taureau	Mouton	Brebis	Chèvre	Bouc			
Beni-ksila	10	00	00	00	00	00	00	00	00	00	F	F
Mechdalah	15	00	00	00	00	00	00	00	00	00	F	F
El-kseur	10	00	00	00	00	00	00	00	00	00	F	F
Souk-tenine	10	00	00	00	00	00	00	00	00	00	F	F
Tazemalt	10	15	00	00	00	00	00	00	00	00	F	F
Melbou	00	10	10	00	00	00	00	00	00	00	F	F
Semaoune	00	10	00	00	00	00	00	00	00	00	F	F
Tichy	00	00	4	15	4	8	8	3	1	00	F	F
Sahel boulimat	00	00	00	18	2	00	00	00	00	00	F	F
Oued ghir	00	00	00	10	6	00	00	00	00	00	F	F
Beni- maouche	00	00	00	11	10	00	00	8	2	00	F	F
Sidi aich	00	00	00	00	00	3	1	3	00	00	F	F
Ouzlaguene	00	00	00	00	1	10	2	00	00	7	F	F
Boussaada	00	00	00	11	2	7	8	00	00	00	F	F
Constantine	00	00	00	27	00	00	00	00	00	00	F	F
Akbou	00	00	00	00	00	4	1	1	1	00	F	F
TOTAL	55	35	14	92	21	34	20	15	4	7	16	16
	104			113		53		20		7		
	104			194								
330												

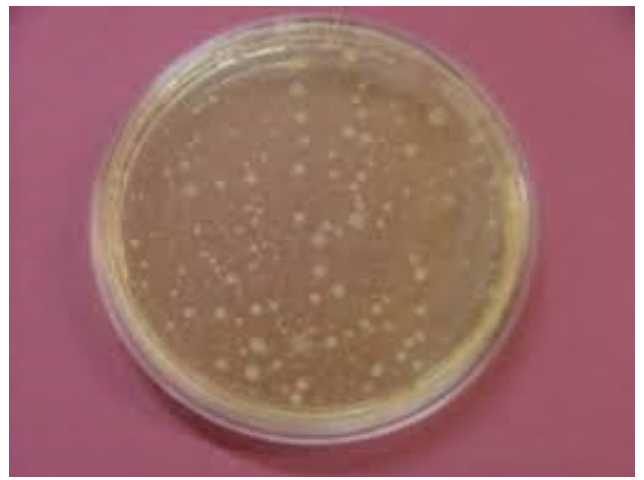
2-Identification des souches bactériennes

L'aspect macroscopique sur milieu BEA montre des petites colonies translucides entourées d'un halo noir. Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer. (Figure 3- a)

Le repiquage sur gélose M17 glucosé montre des colonies de petite taille (figure 3-b).



(a)



(b)

Figure 3: Isolement des entérocoques sur gélose BEA et M17

Après coloration de Gram, l'examen microscopique montre des cellules de morphologie cocci disposées en diplocoques ou en courtes chainettes de couleur violette (bactéries à Gram positif).

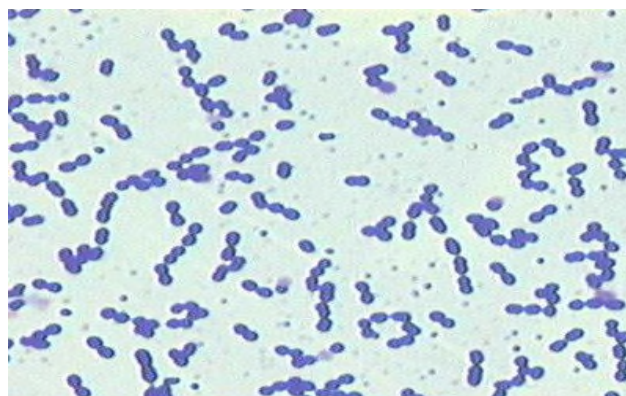


Figure 4: Aspect microscopique des entérocoques

Le résultat du test de la catalase est négatif pour toutes les souches (absence des bulles d'air).

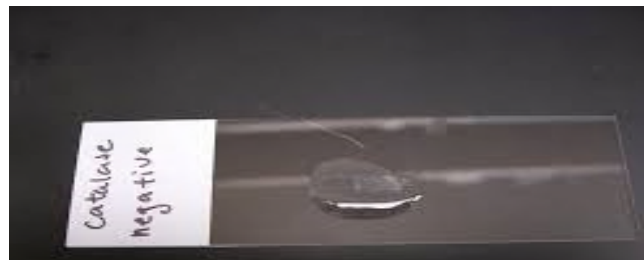
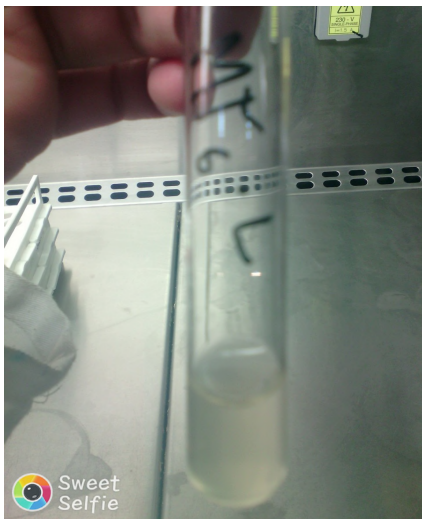


Figure 5: Résultat du test de la catalase

Les entérocoques et les streptocoques partagent les mêmes critères macroscopiques et microscopiques. Afin de différencier entre ces deux genres, deux tests ont été réalisés, le test de résistance à la chaleur et de croissance sur le bouillon hypersalé. Dans notre étude, les résultats de ces deux tests montrent que toutes les souches testées résistent à la chaleur et croissent sur un bouillon hypersalé.

La résistance à la chaleur (figure 6-a) et la croissance sur bouillon hypersalé (figure 6-b) montre des tubes troublés pour les deux tests.



(a)



(b)

Figure 6: Résultats du test de la croissance des entérocoques sur bouillon hypersalé et le test de résistance à la chaleur

Afin de différencier entre *E.faecium* et *E.faecalis*, un test de réduction du tellurite de potassium a été réalisé. *E.faecalis* est la seule espèce qui réduit le tellurite de potassium qui se révèle par un noircissement au fond du tube.

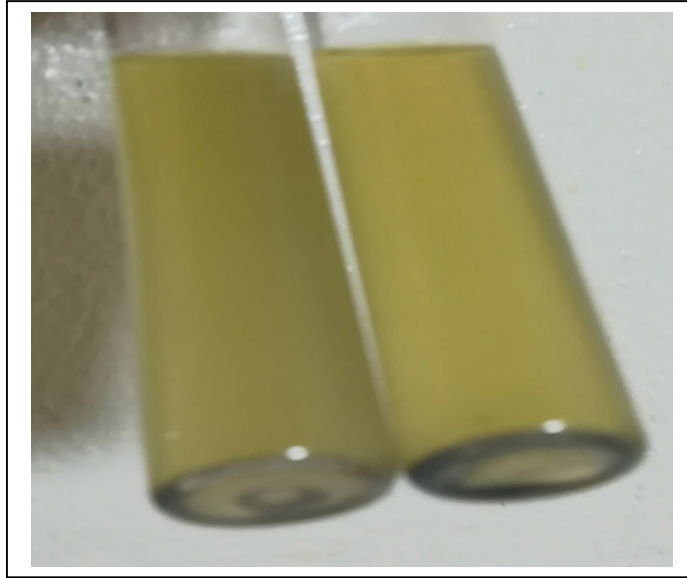


Figure 7: Test positif de résistance au tellurite de potassium (*E. faecalis*)

2.1- Souches isolées

Au cours de notre étude, onze (11) souches ont été isolées et identifiées sur la base de la coloration de Gram, aspect des colonies, test de catalase, croissance sur le bouillon hyper salé et test de la résistance à la chaleur (tableau 6).

Tableau 6: Résultats des tests d'identification des souches d'entérocoques

test souche	Catalase	GRAM	Croissance sur le bouillon Hypersalé	Résistance à la chaleur	Réduction de Téllurite de potassium	Espèce
V3L	N	P	P	P	+	<i>E. faecalis</i>
V8L	N	P	P	P	+	<i>E. faecalis</i>
V43L	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
V48L	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
ch10	N	P	P	P	+	<i>E. faecalis</i>
PC50	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
PC51	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
PC52	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
PP37	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
Dd14	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>
Aliment	N	P	P	P	-	<i>E. faecium</i>

Légendes : (N : Négatif, P : Positif)

(- : Négatif, + : Positif)

2.2-Répartition des souches d'entérocoques isolées

Au total, onze (11) souches d'entérocoques ont été identifiées (10 souches à partir des écouvillonnages d'animaux et une souche par aliment).

– **Par animal**

D'après le tableau 7, on constate que les souches d'entérocoques sont fréquemment isolées chez les bovins (4 souches) et poulet de chair (3 souches).

Tableau 7: Répartition des souches d'entérocoques isolées par animal

Animal	Bovin	ovin	caprin	Poulet de chair	Poule pondeuse	Dinde	lapin
Nombre des souches	4	0	1	3	1	1	0

3-Sensibilité des souches d'entérocoques à la vancomycine

Après identification et réalisation de la CMI, nous avons identifié 6 (54.54%) souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine (V43L, V48L, PC50, PC51, PC52 et aliment Boulimat) sur un total de 11 souches d'entérocoques isolées. Il est à noter que les souches V43L et V48L ont été isolées chez l'espèce bovine, tandis que les souches PC50, PC51 et PC52 ont été isolées chez le poulet de chair. Les résultats de la CMI sont donnés dans le tableau 8.

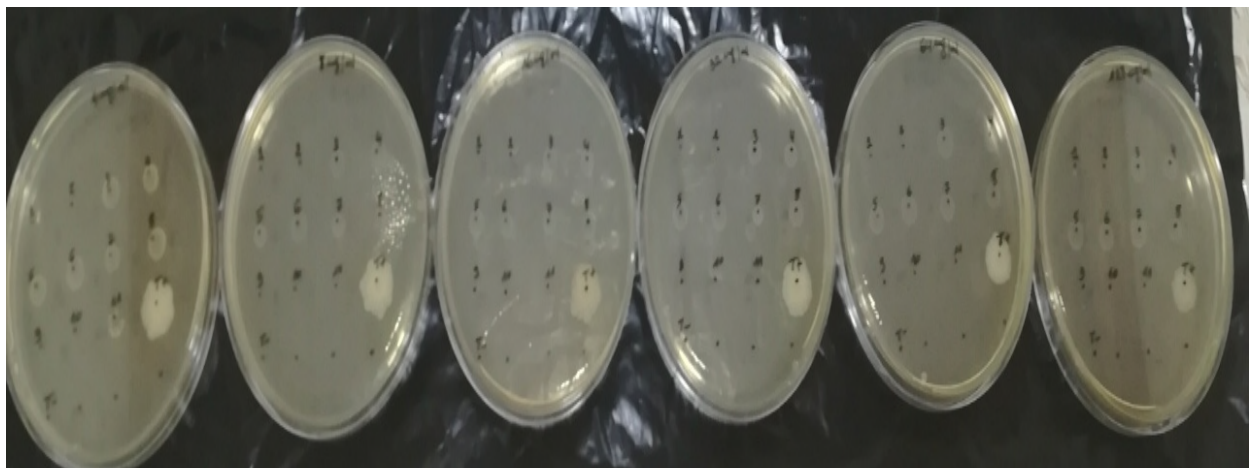


Figure 8:Résultats des concentrations minimales inhibitrices (résistance à la vancomycine)

Tableau 8: Résultats de la CMI vis-à-vis de la vancomycine

Code	V3L	V8L	V43L	V48L	CH10L	PC50	PC51	PC52	PP35	Dd14	Aliment Boulimat
CMI ug/ml	<4	<4	>128	>128	<4	>128	>128	>128	<4	<4	>128

4-Sensibilité des souches d'entérocoques à d'autres antibiotiques

Le tableau 9 donne les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés

Tableau 9: Résultats d'antibiogrammes obtenus pour chacune des souches d'entérocoques isolées

Souche	CIP5		IPM10		LEV5		AM10		STX25	
V3L	6	R	21	S	6	R	25	S	6	R
V8L	13	R	20	R	16	S	25	S	25	R
V43L	28	S	32	S	25	S	36	S	30	R
V48L	30	S	28	S	27	S	31	S	34	R
ch10	6	R	13	R	6	R	25	S	6	R
PC50	30	S	32	S	22	S	34	S	34	R
PC51	28	S	31	S	26	S	32	S	6	R
PC52	30	S	26	S	26	S	30	S	6	R
PP37	25	S	24	S	23	S	25	S	30	R
Dd14	23	S	24	S	21	S	22	S	27	R
Aliment	30	S	29	S	24	S	34	S	6	R

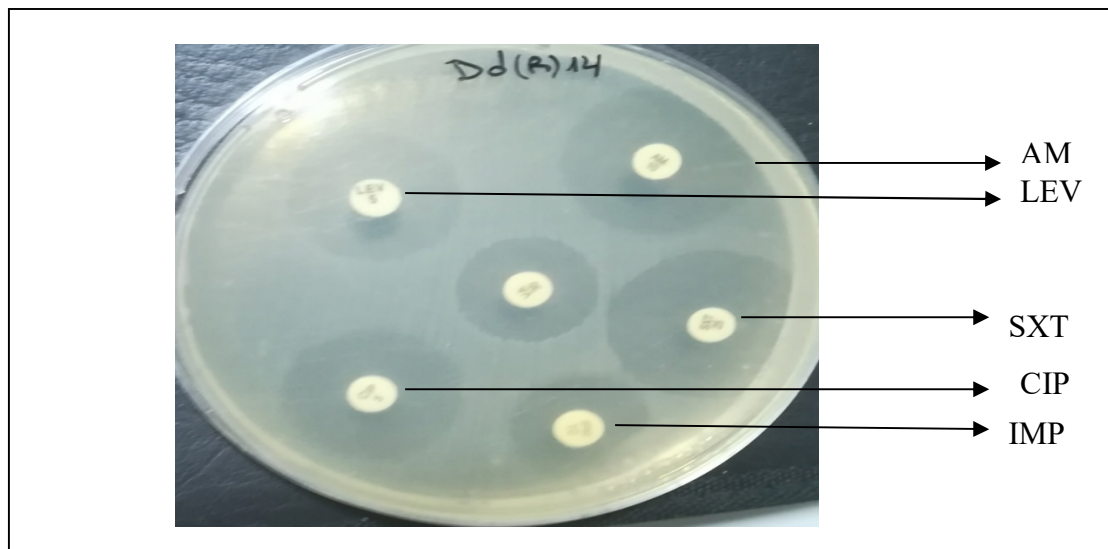


Figure 9: Résultat d'un antibiogramme d'une souche d'entérocoque isolée

D'après la figure 10, on observe une résistance importante des souches vis-à-vis du triméthoprim avec un taux de 100%, suivi de la ciprofloxacine avec un taux de résistance de 27.27% et un taux de 18.18% pour la levofloxacine et l'imipénème. Toutes les souches ont été sensibles à l'ampicilline.

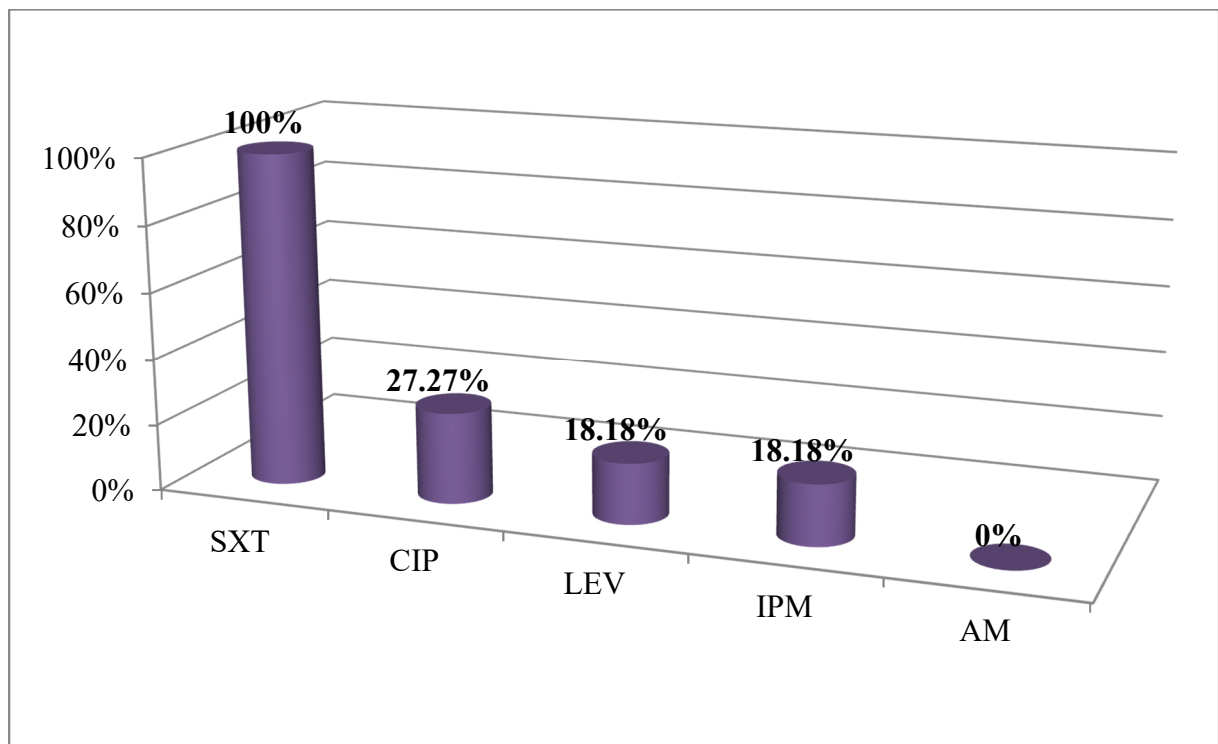


Figure 10: Taux de résistance des souches d'entérocoques aux différents antibiotiques testés

4.1-Portage des entérocoques résistants à la vancomycine

– Portage des VRE par animal

Au cours de notre étude, le taux de portage total de VRE obtenu est de 2.97% (5/168). Nous avons noté que le taux de portage le plus élevé est observé chez le poulet de chair avec un taux de 5.45 %, tandis que aucune VRE est observée chez la poule pondeuse, dinde, ovins, caprins et les lapins (Tableau 10).

Tableau 10: Taux de portage des VRE par animal

Animaux	volaille			bovins	ovins	caprins	lapins
	Poulet de chair	Poule pondeuse	dinde				
Portage							
Nbre d'animaux	55	35	14	113	53	20	7
Animaux porteurs de VRE	5,45% (3 Souches)	0% (0)	0% (0)	1.77% (2 Souche)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

– Portage des VRE par région

Concernant le portage par région, nous avons noté que les taux de portage les plus élevés sont observées dans deux régions Tazmalt et Boulimat avec des taux de 12% et de 10% respectivement. Tandis que le portage des VRE est nul dans les autres régions (figuer 11).

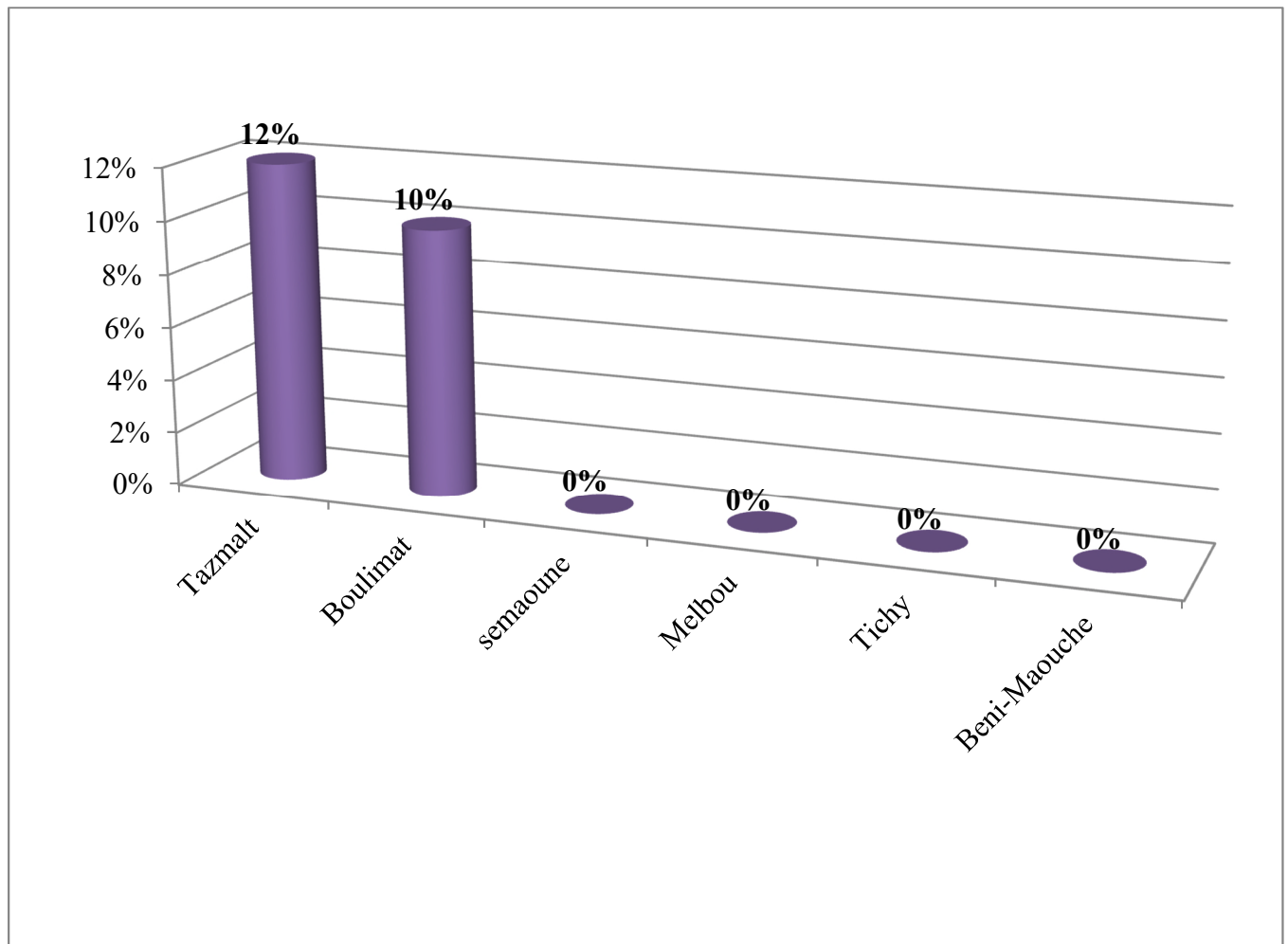


Figure 11: Taux de portage des VRE par région

Discussion et conclusion

Durant notre étude le taux de portage des *E. faecalis* résistant à la vancomycine chez les bovins est nul. Tandis que le taux de résistance des *E. faecium* à la vancomycine est largement inférieur à celui rapportés en Tanzanie. Cette différence de taux de portage des entérocoques résistant à la vancomycine est due probablement à l'absence d'usages des antibiotiques chez les bovins. (Madoshi et al., 2018)

Chez le poulet de chair nous avons obtenu un taux de portage d'*E. faecium* résistant à la vancomycine de 5.45%. Plusieurs travaux en Grèce (entre mai 2005 et juin 2008), et d'autres pays européens, ont rapporté des taux de portage respectivement de 22.6% et 23%. (Tzavaras et al., 2012) .

Dans notre étude les profils de résistance aux antibiotiques des 11 souches étudiées montrent un taux de résistance au Triméthoprim de 100%. Ces résultats sont plus élevés à ceux retrouvés en Cameroun chez les souches d'entérocoques isolée en clinique (Kanga et al., 2015) .

A l'inverse, aucune résistance à l'ampicilline n'a été observée pour les isolats. Ces résultats sont approximativement les mêmes que ceux rapportés par Scipp et Diskson, (Scipp et Diskson, 2012).

Ce travail sur les entérocoques isolés durant la période de deux mois, au laboratoire d'écologie microbienne (LEM) de l'université Abderrahmane Mira avait pour objectif de faire le point sur le taux de portage des souches VRE, et de tester leur sensibilité par rapport à différents antibiotiques. Malgré l'intérêt majeur de ces dernières en élevage dans la lutte contre les maladies infectieuses bactériennes, la vigilance reste de mise compte tenu des risques pour la santé animale et la santé humaine dans la sélection des bactéries multi résistantes. « *Une meilleure antibiothérapie implique une meilleure maîtrise des risques d'antibiorésistance* ».

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aguilar-Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain J, Campos D, Thonart P. (2012).** Les Entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol Agron Société Environ.* 16:67.
- Arias CA, Contreras GA, Murray BE. (2010).** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 16:555–562.
- Carle S. (2009).** La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important! *Pharmactuel*;42.
- Cattoir V, Leclercq R. (2010).** Les entérocoques résistants aux glycopeptides. *médecine/sciences*;26:936–942.
- Chatellet M-C. (2007).** Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin: enquête en Anjou. PhD Thesis; Thèse de doctorat, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, France.
- Collineau L, Parcheminal R, Zeller S, Belloc C. (2016).** Quels sont les facteurs clés de la réussite d'une démarche de réduction des usages d'antibiotiques en élevage porcin?
- Corpet DE. (2000).** Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Rev Médecine Vét.* 151:99–104.
- Courvalin P. (2006).** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*;42:S25–S34.
- Dardenne P, Vandeplass S, Romnee JM, Boudry C, Baeten V, Berben G et Renaville R. (2002).** Sécurité alimentaire et traçabilité.
- David Francoz DMV, Roy J-P, Labrecque O. (2014).** Bien utiliser les antibiotiques chez les bovins, pourquoi et comment?
- Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y. (2011).** Les enterocoques dans l'environnement proche de l'homme.
- Gaudé L. (2015).** Les matières premières dans les aliments composés pour animaux de ferme en 2015. Davantage de recours aux tourteaux de tournesol.

Références bibliographiques

- Gordoncillo MJN, Donabedian S, Bartlett PC, Perri M, Zervos M, Kirkwood R et Febvay C. (2013).** Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from swine in Michigan, USA. *Zoonoses Public Health*. 60:319–326.
- Guillot J-F, Bastien J, Bertin J, Bousquet-Melou A et Bruneau M. (2014).** Evaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liés aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. ANSES.
- Kamga HG, Gueye MJS, Toukam M, Mbassi AA, Kengne M et Adiogo D. (2015).** Résistance aux antibiotiques des entérocoques responsables des infections urinaires au Centre Hospitalier et Universitaire et à l'Hôpital Central de Yaoundé (Cameroun). *Afr J Pathol Microbiol*. e1–5.
- Leclercq R. (2001).** Faut-il identifier les entérocoques, et comment? *Lett Infect* 16:217–221.
- M'Bodji NO. (1973).** L'élevage de rente dans une exploitation agricole intégrée: bilan de quatre années d'activité. *Rev D'élevage Médecine Vét Pays Trop*. 26:263–267.
- Mensah SEP, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, et Abiola FA. (2014).** Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique: risques de santé publique. *Rev Sci Tech Int Epiz*. 33:975–986.
- Mondiale de la Santé O. (2017).** Lignes directrices de l'OMS pour l'utilisation chez les animaux de rente destinés à l'alimentation humaine des antimicrobiens importants pour la médecine humaine.
- Moulin G, Orand J-P. (2013).** Antibiorésistance: quelle stratégie pour l'ANMV à trois ans? *Cah Rech Santé Environ Trav*. 62–64.
- Muylaert A, Mainil J. (2013).** Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur "contagiosité". In: *Annales de Médecine Vétérinaire*. Université de Liège. pp. 109–123.
- Roy PH. (1997).** Dissémination de la résistance aux antibiotiques: le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries.

Références bibliographiques

- Sanders P. (2005).** L'antibiorésistance en médecine vétérinaire: enjeux de santé publique et de santé animale.
- Shipp GM, Dickson JS. (2012).** A longitudinal study of the establishment and proliferation of Enterococcus on a Dairy Farm. Foodborne Pathog Dis. 9:425–430.
- Traoré O, Souweine B, Leclercq R. (2002).** Dans quelles situations instituer des précautions de type «contact» chez les patients porteurs de bactéries multirésistantes? a. Réanimation. 11:451–463.
- Tzavaras I, Siarkou VI, Zdragas A, Kotzamanidis C, Vafeas G, E. Bourtzi-Hatzopoulou, S. Pournaras et D. Sofianou. (1818).** Diversity of vanA-type vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolated from broilers, poultry slaughterers and hospitalized humans in Greece. J Antimicrob Chemother 2012;67:1811.
- Valette J. (1988).** Les compléments alimentaires (définition, aspects réglementaires, cas pratique: un médicament qui évolue en complément alimentaire). Université de Limoges.
- Yo T, Picard M, Guérin H, Dauvilliers P. (1994).** Alimentation séparée (céréales grains entières+ aliment complémentaire granulé) chez les poulets de chair en climat chaud. Rev Délevage Médecine Vét Pays Trop. 47:319–327.

Annexes

Annexes

❖ Composition des milieux de cultures pour 1 litre d'eau distillé

Milieu de culture	composition	Quantité g/l
BEA	Extrait de viande	3g
	Peptones	17g
	Extrait de levure	5g
	Citrate de sodium	1g
	Citrate de fer	0.5g
	Chlorure de sodium	5g
	Esculine	1g
	Bile de bœuf	10g
	Azide de sodium	0.25g
M17	Peptone universelle	5g
	Peptone de farine	5g
	Extrait de levure	2.5g
	Extrait de viande	5g
	Acide ascorbique	0.5g
	B-glycérophosphate de sodium	19g
	Sulfate de magnésium	0.25g
MH	Infusion de viande de bœuf	300g
	Hydrolysate de caséine	17.5g
	Amidon	1.5g
	Agar	
	PH	7.3+/-0.1

❖ Produits chimiques (colorants) :

Colorant	Composition	Quantité
Fushine phénique	Fushine cristallisée	1g
	Alcool éthylique	10ml
	Phénol	5g
	Eau distillée	10ml
Violet de gentiane	Violet de gentiane	1g
	Phénol	11g
	Ethanol	10ml
	Eau distillée	100ml
Lugol	Iodure de potassium	2g
	Id métalloïde	1g
	Eau quod satis pour	100g

Résumé

Le portage des entérocoques résistants à la vancomycine chez les animaux d'élevage n'est pas documenté en Algérie. Notre étude a pour objectif de rechercher des entérocoques multirésistants chez les animaux d'élevage dans différentes régions en Algérie.

Un total de 330 prélèvements a été collecté incluant des animaux d'élevage (n=298), échantillons d'aliments (n=16) et échantillons d'eaux (n=16) dans différentes fermes de la région de Béjaïa, Bouira, Boussaâda et Constantine. L'isolement et l'identification des souches d'entérocoques a été effectué par un ensemble de tests biochimiques. La détection d'ERV a été déterminée par CMI. La sensibilité des souches d'entérocoques aux antibiotiques a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose Muller Hinton.

Au cours de notre étude, le taux de portage des ERV chez les animaux d'élevage dans différentes régions de la wilaya de Béjaïa est de 2,97%. Nous avons notés que le taux de portage le plus élevée est observé chez le poulet de chair avec un taux de 5,45%.

La présence des souches ERV chez les animaux d'élevage constitue un danger sur la santé animal et humaine.

Mots clés : Animaux d'élevage, ERV, Portage, Algérie.

Abstract

The carriage of vancomycin-resistant enterococci in livestock is not documented in Algeria. The objective of this study was to evaluate the rate of fecal carriage of multiresistant enterococci strains isolated from livestock in different Algerian localities.

A total of 330 samples were collected including farm animals (n = 298), food samples (n = 16) and water samples (n = 16) from different farms in the Bejaia city, Bouira, Boussaâda and Constantine. The isolation and identification of enterococcal strains was performed by a set of biochemical tests. The detection of VRE has been determined by MIC. The susceptibility of enterococci strains to antibiotics was evaluated by the Muller Hinton agar diffusion method.

In our study, the carrying rate of VRE in livestock in different regions of Bejaia city is 2.97%. We noted that the highest carriage rate is observed in broiler chickens at a rate of 5.45%.

The presence of VRE strains in livestock is a danger to animal and human health.

Key words: Livestock, VRE, Carriage, Algeria.