

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر سعيدة  
Université MOULAY Tahar, Saida



N° d'Ordre

كلية العلوم  
Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

Thème

---

**Caractérisation génomique et physiologique  
d'*Enterococcus faecium* B319 multirésistant isolé  
des fèces de rat (wistar)**

---

Présenté par :

- Mr : ARAB Abdelkrim

Soutenu le : 22/09/2022

Devant le jury composé de :

Président	Mr. BENREGUIG MOKHTAR	MCA Université MOULAY Tahar, Saida
Examinateur	Mr. BELLIL YAHIA	MCA Université MOULAY Tahar, Saida
Rapporteur	Mr. BENABBOU TAHA AHMED	MCA Université MOULAY Tahar, Saida

**Année universitaire 2021/2022**



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة موالى الطاهر، سعيدة  
Université MOULAY Tahar, Saida



N° d'Ordre

كلية العلوم  
Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

Thème

---

## **Caractérisation génomique et physiologique d'*Enterococcus faecium* B319 multirésistant isolé des fèces de rat (wistar)**

---

Présenté par :

- Mr : ARAB Abdelkrim

Soutenu le : 22/09/2022

Devant le jury composé de :

Président	Mr. BENREGUIG MOKHTAR	MCA Université MOULAY Tahar, Saida
Examinateur	Mr. BELLIL YAHIA	MCA Université MOULAY Tahar, Saida
Rapporteur	Mr. BENABBOU TAHA AHMED	MCA Université MOULAY Tahar, Saida

**Année universitaire 2021/2022**

Dédicaces

***Je dédie ce modeste travail :***

À mes parents que dieu leur offre la santé et le bonheur.

À ma grande mère bon santé et longue vie pour elle.

À mon frère Boubaker mes sœur.

À toute ma famille sans exception.

À mes collègues de travail.

A toutes mes amies sans exception.

À ceux qui ont pris une place dans mon cœur et je n'ai pas cité, ne croyez pas que je  
vous ai oublié je vous porte toujours dans mon cœur.

---

## Remerciements

Je dois profiter cette occasion pour exprimer mes sincères remerciements et ma reconnaissance à :

Dieu, le tout puissant qui ma donner la force, la santé et la patience pour continuer les études et accomplir ce modeste travail.

Mon encadreur **Dr. BENABBOU Taha Ahmed**, non seulement pour avoir pris soin, mais surtout pour ces précieux conseils, et ça patience, il m'a dirigé tout au long de la préparation du mémoire de master.

Les membres de jury :

- **Dr. BENREGUIG MOHAMED.**

- **Dr. BELLIL YAHIA.**

D'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance et mon sincère gratitude à tous les enseignants de la filière biologie de Université MOULAY Tahar, Saida, sans exceptions, pour les efforts qu'ils ont fournis durant ces cinq années de formation.

J'exprime mes vifs remerciements à toute l'équipe de laboratoire de Microbiologie pour leur aide précieuse durant la réalisation de mon travail et spécialement AMI AHMED.

Je tiens à souhaiter une bon continuation pour mes collègue les étudiant de microbiologie et biochimie et notamment : Younes, Walid , Tayeb, Amine , Rekai, waffa .

---

## Liste des abréviations

LAB: lactic acid bacteria.

*E. faecium* : *Enterococcus faecium*.

ERV: *E. faecium* résistantes à la vancomycine.

CM I: Une concentration minimale inhibitrice.

CML: Une concentration minimale létale.

CM B: Une concentration minimale bactéricide.

PLP: Pyridoxal phosphate.

MLS: Macrolides- Lincosamides- Streptogramines.

BGN : bacilles gram négatif.

PABA: acide para-aminobenzoïque.

DH PS: la dihydroptéroate synthétase.

DH F: acide ttradrophiles.

ATB: Antibiotique

ATBs: Antibiotiques.

LPS: lipopolysaccharide.

BM R: bactérie multirésistante.

ERG: Entérocoque résistant aux glycopeptides

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Principales caractéristiques d' <i>Enterococcus faecium</i> .....	8
<b>Tableau 2:</b> Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé des bactéries pathogènes.....	9
<b>Tableau 3:</b> Antibiotiques agissant sur la paroi.....	17
<b>Tableau 4:</b> Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique.....	18
<b>Tableau 5:</b> Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique.....	18
<b>Tableau 6:</b> Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques.....	19
<b>Tableau 7:</b> Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique.....	19
<b>Tableau 8:</b> Caractéristique de différents éléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes résistance.....	29
<b>Tableau 9:</b> Caractéristique phénotypique et génotypique des opérons chez <i>E. faecium</i> .....	30
<b>Tableau 10:</b> Profil de résistance de la souche B319.....	45
<b>Tableau 11:</b> Résultat de la qualité des données brutes.....	47
<b>Tableau 12:</b> Résultat de la qualité des données brutes après nettoyage.....	48
<b>Tableau 13:</b> Résultats de l'assemblage du génome entier de <i>E. faecium</i> B319.....	50
<b>Tableau 14:</b> Gènes de résistance aux antibiotiques chez la souche <i>E. faecium</i> B319.....	53
<b>Tableau 15 :</b> Modifications des acides aminés dans la séquence <i>pbp5</i> de la souche de <i>E. faecium</i> B319.....	57
<b>Tableau 16:</b> Liste des gènes de virulence présents dans <i>E. faecium</i> B319.....	58
<b>Tableau 17:</b> Liste et position des prophages de <i>E. faecium</i> B319.....	61

**Tableau 18:** Composants de l'élément génétique mobile de *E. faecium*  
B319.....62

---

**Liste des figures**

<b>Figure 1:</b> Arbre phylogénétique de 49 genres d'Enterococcus basé sur les séquences de l'ARNr16.....	6
<b>Figure 2:</b> Aspect en microscopie optique (x 1000) de <i>E. faecium</i> après coloration de Gram. B) Aspect en microscopie électronique à balayage (x 1000) de <i>E. faecium</i> .....	7
<b>Figure 3:</b> A) Portrait d'Alexander Fleming (1881-1955) B) – Photographie de la plaque.....	12
<b>Figure 4:</b> Schéma récapitulatif montre les différentes familles des antibiotiques avec leur cible.....	15
<b>Figure 5:</b> Les mécanismes de résistances aux ATBs .....	21
<b>Figure 6:</b> Le mécanisme de résistance aux ATBs par la modification des PLP au niveau de la bactérie.....	22
<b>Figure 7:</b> L'action des enzymes $\beta$ -lactamase sur les ATBs agissant sur la bactérie. ....	22
<b>Figure 8:</b> Le mécanisme de résistance par modification des porines de la membrane bactérienne.....	23
<b>Figure 9:</b> Le mécanisme d'efflux exercé par la bactérie sur l'ATB.....	24
<b>Figure 10:</b> Schéma de conservation courte durée de la souche B319.....	34
<b>Figure 11:</b> Schéma représentatif de la détection de production de gaz .....	36
<b>Figure 12:</b> Aspect des colonies bactériennes sur milieu MRS gélosé de la souche B319. ....	42
<b>Figure 13:</b> Aspect microscopique après coloration de Gram de la souche B319 (Grossissement X1000).....	42

---

<b>Figure 14:</b> Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide en présence de 6,5% de NaCl (A), à 45 °C (B), à pH 9,6 (C) et le résultat du test de la thermorésistance (D). .....	44
<b>Figure 15:</b> Culture bactérienne de la souche B319 en présence de 0,1% et 0,3% de bleu de méthylène (A) et le résultat du test de type fermentaire (B).....	44
<b>Figure 16 :</b> Résultats de test antibiogramme de la souche B319 (sur boîte).....	46
<b>Figure 17:</b> Scores de qualité des bases (Sanger/Encodage Illumina 1.9) avant nettoyage.....	48
<b>Figure 18:</b> Scores de qualité des bases (Sanger/Encodage Illumina 1.9) après nettoyage.....	49
<b>Figure 19:</b> Arbre phylogénétique représente la relation entre la souche B319 et les autres espèces du genre <i>Enterococcus</i> .....	51
<b>Figure 20:</b> Carte génomique circulaire de la souche B319 indiquant la position des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence.....	59
<b>Figure 21:</b> Régions prédites des prophages déterminés dans la souche B319 .....	60
<b>Figure 22:</b> Visualisation de la structure prédite d'oriT .....	62
<b>Figure 23:</b> Visualisation de la localisation de l'élément génétique mobile dans le génome de <i>E. faecium</i> B319 et des ORF des gènes de résistance .....	63

## Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la souche multi-résistante *E. faecium* B319, les premiers tests ont montré que la souche est dotée d'une résistance : à une forte concentration de sel jusqu'à 6,5% en NaCl, à des températures pouvant aller jusqu'à 45°C voire 63°C et d'autres caractéristiques physiologiques qui ont confirmé son appartenance au genre *Enterococcus*. Le profil de résistance de cette souche était établis-à-vis 14 antibiotiques, les résultats ont montré l'existence d'une forte résistance envers la plupart des antibiotiques, en revanche la grande sensibilité était exprimée envers le chloramphénicol. Après traitement des séquences brutes suivi de leur assemblage, le génome de la souche représentait une longueur de 2,5 Mb avec 2461 CDS, 43 ARNt et 3 ARNr. La recherche de gènes de résistance et de virulence a permis d'identifier 11 gènes de résistance aux antibiotiques (*aac(6)-II*, *eat(A)*, *tet(M)*, *msr(C)*, *vanZ-A*, *vanY-A*, *vanX-A*, *vanA*, *vanH-A*, *vanS-A*, et *vanR-A*) et un gène de virulence (*acm*). L'analyse génomique a également identifié 2 prophages tempérés de *Listeria* et *Enterococcus* et 1 élément génétique mobile transposable et conjugatif. La recherche de mutations génétiques a fait apparaître un ensemble de 13 mutations ponctuelles identifiées dans le gène *pbp 5* conférant une résistance à l'ampicilline. Nos résultats suggèrent que les VRE peuvent agir comme un réservoir de gènes transmissibles à d'autres bactéries pathogènes dans la mesure où ils peuvent se propager très facilement d'un patient à l'autre dans un environnement hospitalier.

**Mots clés :** *E. faecium*, VRE, génome, multirésistance, transfert horizontal.

---

## Abstract

The main objective of this work is to study the multi-resistant strain *E. faecium* B319, the first tests showed that the strain is endowed with resistance: to a high concentration of salt up to 6.5% in NaCl, to temperatures up to 45°C and even 63°C and other physiological characteristics that confirmed its belonging to the genus *Enterococcus*. The resistance profile of this strain was established towards 14 antibiotics, the results showed the existence of a strong resistance towards most of the antibiotics, on the other hand the high sensitivity was expressed towards chloramphenicol. After processing of the raw sequences followed by their assembly, the genome of the strain represented a length of 2.5 Mb with 2461 CDS, 43 tRNA and 3 rRNA. The search for resistance and virulence genes identified 11 antibiotic resistance genes (*aac(6')-II*, *eat(A)*, *tet(M)*, *msr(C)*, *vanZ-A*, *vanY-A*, *vanX-A*, *vanA*, *vanH-A*, *vanS-A*, and *vanR-A*) and one virulence gene (*acm*). Genomic analysis also identified 2 temperate prophages of *Listeria* and *Enterococcus* and 1 mobile transposable and conjugative genetic element. Genetic mutation search revealed a set of 13-point mutations identified in the *pbp 5* gene conferring ampicillin resistance. Our results suggest that ERVs may act as a reservoir of genes transmissible to other pathogenic bacteria as they can spread very easily from one patient to another in a hospital environment.

**Key words:** *E. faecium*, VRE, genome, multidrug resistance, horizontal transfer.

## ملخص

الهدد الرئيسي س-م-هـ الاعم هو دراسة الس لة منعددة المقاومة *E. faecium* B319، حيث أظهر الاختبارا الأول أن الس لة نمت المقاومة: لتكتع عا م الم حـا 6.5٪ ف كوريد الصودوم ، إل درجا حرارة نصـ إل 45 درجة C وحـا 63 درجة مئوية وغتها م الخصائص الفسيولوجية البـ أكد انماؤها إل جـ الم كورا الم عوية. تم إنشا ملـ المقاومة لهـ الس لة نحو 14 مـ المضادا الحيوية ، وأظهر النتائج وجود مقاومة قوية نجـا معظم هـ المضادا ، م ناجية آخر ، تم النعت عـ الحساسية العالبة نحو الكورامفي يكو . بعد معالجة التسلسـ الأولية منبوعة بنجمي عها ، يتم جينوم الس لة 2.5 ميغاباز مـ CDS 2461 و TRNA 43 و RRNA 3. حدد البحث عـ جينا المقاومة والفعوة 11 جينا مقاومة للمضادا الحيوية (II-'6) AAC ، EAT (A) ، TET (M) ، Vanr-A و Vans-A و Vanh-A ، VANA ، Vanx-A ، Vany-A ، Vanz-A ، MSR (C) ، واحد للفعوة (acm). حدد التحليل الجيـ أيضا عا ئيا م اللبـ سنتيا والمكورا الم عوية وعنصـ وراث قابل لنقا . كـشـ البحث عـ الطفرة الوراثية عـ مجموعة مـ طفرا 13 نقطة تم تجديدها ف الجينا PBP5 البـ تمن مقاومة ألامبيسيلـ. نشيت نتائجنا إل أن VRE قد نـمـ كـخزان للجينا القابلة للنفا إل البكتيتيا المسببة للمرا ألنها يتمكـ أن ننشـ بسهولة شديدة مـ مريـ إل آخر ف بيئة المس نشف.

الكلام المفناحية: *E. faecium* ، VRE ، الجينوم ، مقاومة الأوية المتعددة ، النقا ألنفا.

---

**Table des matières**

Généralités sur les Entérocoques.....	5
<i>Enterococcus faecium</i> .....	6
Pouvoir Pathogène.....	7
Effet probiotique .....	9
Probiotique contiennent des <i>Enterococcus faecium</i> .....	10
Les antibiotiques .....	11
Historique (Découverte).....	11
Définition.....	12
Classification des antibiotiques .....	13
Selon l'origine .....	13
Selon la structure chimique .....	13
Selon le spectre d'activité.....	13
Selon le mode d'action.....	14
Principales familles d'antibiotiques.....	15
La résistance aux antibiotiques .....	15
Types de résistances.....	16
Résistance naturelle.....	16
Résistance acquise.....	20
Mécanisme de résistance.....	20
Mécanisme génétique .....	20
La résistance chromosomique .....	20
La résistance extra chromosomique (plasmides).....	20
Mécanisme biochimique.....	21
Modification de la cible d'ATB .....	21
Inactivation enzymatique de l'ATB.....	22
Diminution de la perméabilité .....	23
Excrétion de l'ATB par mécanisme d'efflux .....	24
Profile de résistance .....	25

---

La multirésistance .....	25
Facteurs de virulence et Gènes de Résistance .....	25
Définition des facteurs de la virulence.....	25
Facteur de virulence d' <i>Enterococcus faecium</i> .....	26
Gène de résistance.....	28
La phénotypiques et génotypiques des opérons chez les <i>E. faecium</i> .....	29
Étude expérimentale.....	32
Matériel.....	32
Verreries .....	32
Liquide et Produit .....	32
Instruments .....	32
Milieu de culture.....	32
Matériel biologique .....	32
Revivification de la souche B319 .....	32
Purification .....	33
Observation macroscopique .....	33
Observation microscopique.....	33
Conservation à court duré.....	34
Étude biochimique et Physiologique .....	34
Recherche oxydase.....	34
Recherche de catalase .....	34
Teste de croissance à différente températures.....	35
Teste de croissance au milieu hyperalcalin .....	35
Type de fermentation.....	35
Teste du lait de Shermen.....	36
Teste de thermorésistante.....	36
Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl .....	36
Détermination du profil de résistance .....	37
Technique de l'antibiogramme .....	37

---

---

Évaluation de la qualité des données brutes .....	38
Élimination des séquences contaminantes .....	38
Élimination des parties de reads de mauvaise qualité .....	38
Assemblage.....	39
Annotation du génome et génomique fonctionnelle .....	39
Annotation spécialisée .....	40
Cartes circulaires du génome .....	40
Revivification et vérification de la pureté de la souche B319 .....	42
Antibiogramme .....	45
Analyses bioinformatiques des données de séquençage .....	46
Évaluation de la qualité des données brutes.....	47
Nettoyage des données brutes .....	48
Résultats de l'assemblage <i>de novo</i> du génome.....	49
Annotation du génome et génomique fonctionnelle.....	51
Annotation spécialisée .....	52
Gènes et mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	52
Résistance aux macrolides, lincosamide, streptogramine (MLS) et quinolone.....	54
Résistance aux aminoglycosides .....	54
Résistance aux tétracyclines.....	55
Résistance aux glycopeptides.....	55
Résistance aux Pleuromutilines et macrolides .....	56
Mutations ponctuelles .....	56
Annotation des facteurs de virulences .....	58
Annotation des prophages .....	59
Annotation des éléments génétiques mobiles .....	61

# I. INTRODUCTION

---

## Introduction

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires, trouvées dans la flore microbienne normale du tractus gastro-intestinal de l'Homme, des autres mammifères et des animaux à sang chaud. Ils peuvent aussi être retrouvés de façon normale dans les voies génitales féminines, et dans les voies respiratoires supérieures (Sweet and S., 2009). Ils sont donc de bons indicateurs de contamination fécale. Le défi de la maladie causée par les entérocoques est aggravé par leur sensibilité limitée aux antibiotiques, en raison de résistances intrinsèques et acquises aux antibiotiques. En particulier *Enterococcus faecium*. C'est un commensal intestinal dans l'intestin humain, peu de souches fournissent un effet bénéfique à humains comme probiotiques, alors que peu sont responsables de l'infection nosocomiale (Geldart and Kaznessis., 2017) notamment les infections des voies urinaires, les infections abdominales et des plaies, l'endocardite et la bactériémie (Willems and Schaik., 2009) et agit comme un pathogène opportuniste en raison d'une variété de facteurs de virulence, y compris les lipopolysaccharides et la formation de biofilm (Natarajan and Parani., 2015). Bien que généralement considérées comme inoffensives. Ces dernières années, vous pouvez remarquer une forte augmentation des infections à *E. faecium* qui pourrait être en lien avec l'acquisition rapide de multiples résistances aux antibiotiques. Les résistances les plus souvent mises en évidence concerne l'ampicilline et la vancomycine ce qui a fait de ces bactéries des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe) et parmi les bactéries les plus surveillées de nos jours. Il a été rapporté que la plupart des isolats cliniques à *E. faecium* en Europe et aux États-Unis même en Algérie sont résistants à ces antibiotiques (Di Cesare et al., 2014; AARN, 2018).

Dans cette étude, nous déterminons les caractéristiques physiologiques et génomiques d'une souche isolée des fèces de rat. Le

travail commence par une expérimentation qui a pour but l'analyse morphologique, physiologique et biochimique de la souche B319 mais également de préciser son profil de résistance/sensibilité aux antibiotiques. La deuxième étape vise à réaliser une analyse bioinformatique du génome complet de la souche en recherchant des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence ainsi que des éléments génétiques mobiles susceptibles de jouer un rôle dans le transfert horizontal de gènes.

# **II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## Généralités sur les Entérocoques

Le genre *Enterococcus* a été identifié en (1899) grâce à Thiercelin qui a été le premier à utiliser le terme de *Diplococcus* à Gram positif d'origine intestinale. En 1906, les genres *Enterococcus* ont toutes été reclassés comme *Streptococcus* en raison de leur capacité à former des chaînes courtes (Andrewes, 1906). En 1937, Sherman a classé les genres de *Streptococcus* en quatre sous-groupes : les streptocoques fécaux ou Entérocoques, les streptocoques lactiques, le groupe des viridans et les streptocoques pyogènes. Enfin, en 1984, Schleifer et Kilpper-Balz, en utilisant l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ARNr 16S, ont découvert que *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* étaient distincts des autres espèces de *Streptococcus* et les ont classés parmi le genre *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984; Van Tyne and Gilmore, 2014)

Selon le *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (BMSAB), les entérocoques appartiennent au :

**Règne** : Bacteria

**Embranchement** : Firmicutes

**Classe** : Bacilli

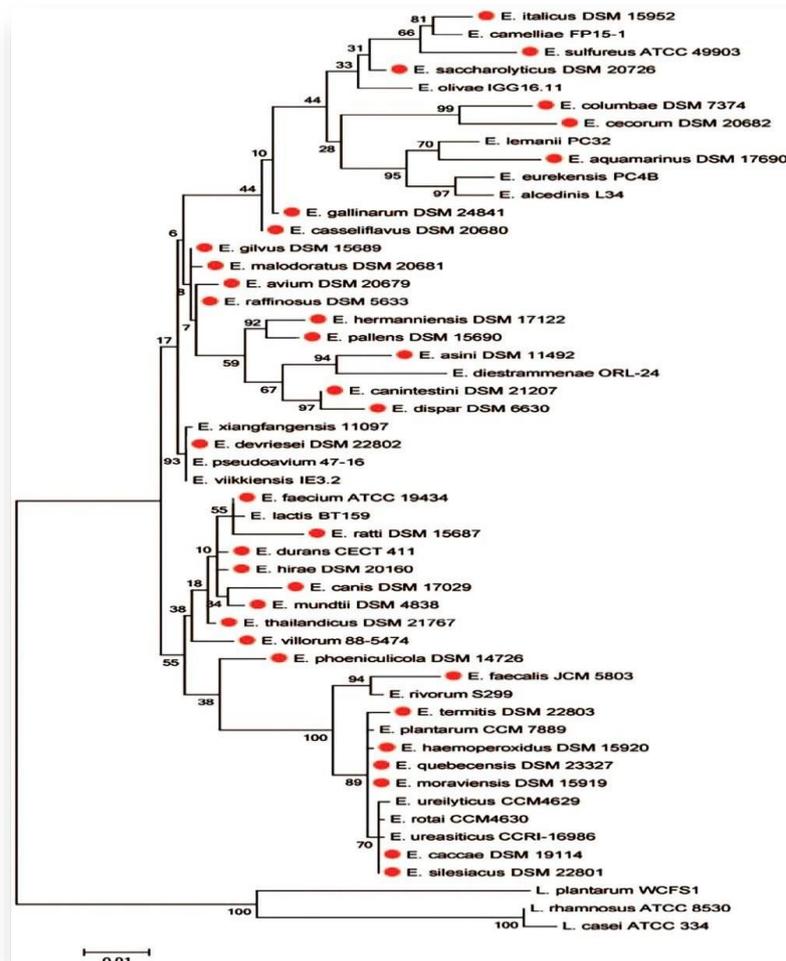
**Ordre** : Lactobacillales

**Famille** : Enterococcaceae

**Genre** : *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* appartient au groupe des bactéries lactiques (LAB) et représente le troisième plus grand genre LAB après *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Franz et al., 2011; Hanchi et al., 1971) Les genres de LAB parmi lesquels les entérocoques sont groupés possèdent une faible teneur en G + C <50 mol% (soit 37,5% de GC dans le chromosome d'*Enterococcus faecalis*) (Paulsen et al., 2003).

Quarante-neuf (49) espèces différentes ont été recensées sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S et sont représentés dans la figure 1 (Aguilar Galvez et al., 2012; Zhong et al., 2017).

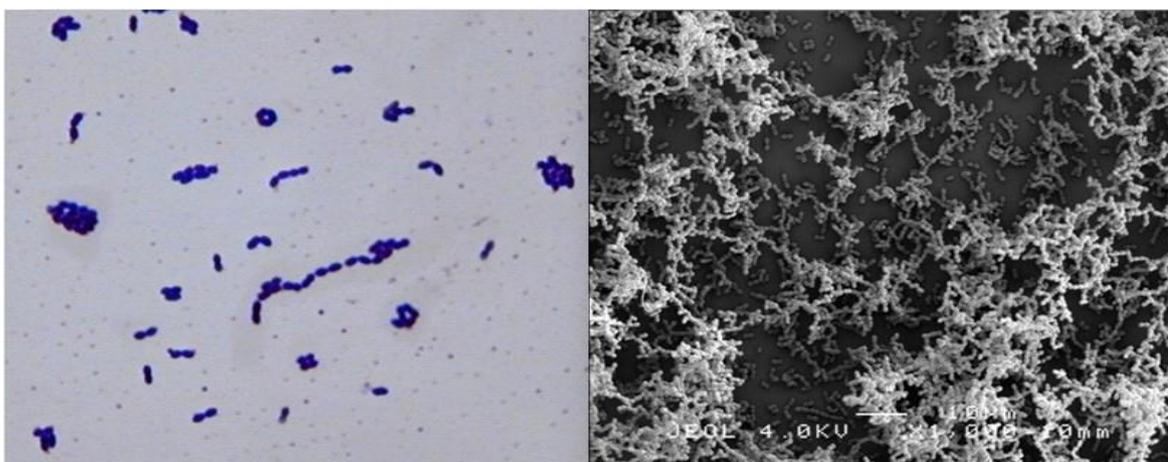


**Figure 1:** Arbre phylogénétique de 49 genres d'*Enterococcus* basé sur les séquences de l'ARNr16 (Bankevich et al., 2012).

### *Enterococcus faecium*

*Enterococcus faecium* est une bactérie anaérobie facultative à Gram positif de forme coccique qui peut se présenter par paires ou par chaînes. La figure 2 montre son aspect microscopique. Son habitat naturel comprend le tractus gastro-intestinal, la cavité buccale et le tractus vaginal d'une grande variété d'animaux. Les colonies produites apparaissent humides et ont une taille moyenne de 1-2 mm. *E. faecium*

peut survivre pendant de longues périodes à l'intérieur des hôpitaux, des égouts et du sol. Il a la capacité de proliférer dans des environnements basiques, acides, isotoniques ou hypertoniques avec des températures allant de 10 à 45 degrés Celsius. Les principales caractéristiques de cette espèce sont récapitulées dans le tableau ci-dessous.



**Figure 2:** Aspect en microscopie optique (x 1000) de *E. faecium* après coloration de Gram. B) Aspect en microscopie électronique à balayage (x 1000) de *E. faecium* (Isnard, 2017).

### Pouvoir Pathogène

*E. faecium* est un agent pathogène humain qui provoque des infections des voies urinaires, des endocardites, des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies nosocomiales. Les infections nosocomiales surviennent en milieu hospitalier lors du traitement d'une maladie antérieure, Ces infections sont souvent difficiles à traiter en raison de la résistance accrue aux antibiotiques associée à cet organisme (Arias and Murray, 2012). L'augmentation récente des souches d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine (ERV) dans les isolats cliniques est particulièrement préoccupante, car cet antibiotique de type glycopeptide reste souvent le dernier traitement disponible dans les infections potentiellement mortelles (Wheeler et al., 2002). La situation est encore compliquée par le fait que les entérocoques ont développé un certain nombre de mécanismes pour le transfert des gènes de résistance (Arias and

Murray, 2012). Par conséquent, la plus grande menace posée par l'ERV ne vient peut-être pas de ces organismes eux-mêmes, mais de la possibilité qu'ils puissent transférer leurs gènes de résistance à d'autres bactéries à Gram positif plus pathogènes, créant ainsi un agent pathogène très dangereux difficile à traiter avec les antibiotiques actuellement disponibles (Kramer, Schwebke and Kampf, 2006).

**Tableau 1:** Principales caractéristiques d'*Enterococcus faecium*

<b>Morphologie</b>	cci de 0.6 à 1µm en moyenne, ovalaires, isolés, en diplocoques, chaînettes ou chaînes.
<b>Coloration de Gram</b>	Gram+
<b>Mobilité</b>	Immobilés
<b>Type respiratoire</b>	Anaérobies facultatifs
<b>Oxydase</b>	Négatif
<b>Catalase</b>	Négatif
<b>fermentation des sucres</b>	Mannitol :+ Arabinose :+ Raffinose :- Xylose :- Sorbitol toujours:-
<b>Conditions de culture</b>	-Température générale : de +10 à +43°C -Température optimal : 37°C -pH optimal : de 7.2 à 7.4 ; croissance à pH 9.6 -Croissance dans des milieux hostiles à 6.5% de NaCl ou à 40% de bile -Croissance dans lait renfermant 0,1 % de bleu de méthylène -Croissance à une température de 60 ° C pendant 30 minutes
<b>Milieux de culture d'usage courant</b>	Gélose nutritive, gélosetrypcase soja...

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a dressé le 27 février 2017 une liste de bactéries pathogènes pour lesquelles il est urgent de trouver de nouveaux antibiotiques. Ces microorganismes sont classés en trois catégories représentatives du niveau de priorité : Critique (priorité 1), Élevée (priorité 2) et Moyenne (priorité 3) (Moussouni, 2020) (Tableau 2).

Parmi ces organismes se trouvent les entérocoques résistants à la vancomycine (priorité 2), en majorité *E. faecium*. Ces souches sont appelées VRE, pour « Vancomycin Resistant Enterococci ». Environ 80% des isolats cliniques d'*E. faecium* sont des VRE, contre 8 à 9% pour *E. faecalis* (Hanchi et al., 2018).

**Tableau 2:** Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé des bactéries pathogènes

Priorité 1 : Critique	Priorité 2 : Elevée	Priorité 3 : Moyenne
<i>Acinetobacter baumannii</i> , résistance aux carbapénèmes	<b>Enterococcus faecium</b> , résistance à la vancomycine	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , insensible à la pénicilline
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , résistance aux carbapénèmes	<i>Staphylococcus aureus</i> , résistance à la méthicylline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine	<i>Haemophilus influenzae</i> , résistance à l'ampicilline
Enterobacteriaceae, résistance aux carbapénèmes, résistance aux céphalosporine	<i>Helicobacter pylori</i> , résistance à la clarithromycine	<i>Shigella spp.</i> , résistance aux fluoroquinolones
	<i>Campylobacter spp.</i> , résistance aux fluoroquinolones	
	<i>Salmonella spp.</i> , résistance aux fluoroquinolones	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones	

### Effet probiotique

Différents critères sont requis pour faire d'une souche microbienne un bon probiotique. La souche doit être identifiable et ne doit pas présenter de risque pathogène. Elle doit être capable de survivre au processus de fabrication et à la digestion. Elle doit aussi pouvoir s'implanter dans le

système digestif, stimuler le système immunitaire, contrer les pathogènes et équilibrer le microbiote intestinal (Holzapfel et al., 2018).

Dû à son implication dans diverses infections, le genre *Enterococcus* pose problème en ce qui concerne la sécurité de son utilisation en tant que probiotique. Cependant, même si les genres et espèces possèdent des caractéristiques communes, on ne peut juger un micro-organisme ni au rang du genre ni même au rang de l'espèce, seulement à celui de la souche. Or, certaines souches d'entérocoques ont des traits probiotiques avantageux tout en ne présentant pas de risque pathogène, et il n'y a que peu de risque d'infection à entérocoques en dehors de l'environnement médical (Marciňáková, Simonová and Lauková, 2004)

Les entérocoques, principalement des *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, produisent des bactériocines (substances qui élimine certains micro-organismes ou inhibe leur croissance) appelées entérochine. Ces entérochine sont efficaces contre des pathogènes d'origine alimentaire comme *Listeria monocytogenes* (responsable de la listériose).

### **Probiotique contiennent des *Enterococcus faecium***

L'entérocoque le plus connu dans le milieu des probiotiques est probablement *Enterococcus faecium*, particulièrement la souche *E. faecium* SF 68 qui se trouve dans différents probiotiques et qui est utilisée dans la production de nourritures fermentées. Cette souche est originellement une des premières bactéries lactiques transmises par le lait maternel et qui contribue au bon développement du microbiote intestinal du nouveau-né. Les entérocoques sont déjà utilisés depuis plusieurs années pour le bétail et les animaux domestiques.

Il n'y a en France que quelques produits qui contiennent des Enterococcus, mais il est possible que d'autres apparaissent sur le marché dans le futur, au fur et à mesure que la recherche progresse.

En voici quelques-uns :

- Bioflorin® (Sanofi) : faecium SF68,  $150 \times 10^6$  à  $225 \times 10^6$  UFC/DJ, Traitement des diarrhées dont diarrhées associées aux antibiotiques. C'est un médicament.

- Symbioflor® 1 (Symbiopharm) : faecium, autolysat de  $10^7$  bactéries pour 1mL. Utilisé pour combattre les bronchites et sinusites chroniques, et aider contre l'asthme. FortiFlora® (Purina) : Pour les chiens et les chats.

*E. faecium* SF68,  $10^{15}$  UFC/g. Pour remédier aux troubles digestifs (diarrhées, flatulences, etc).

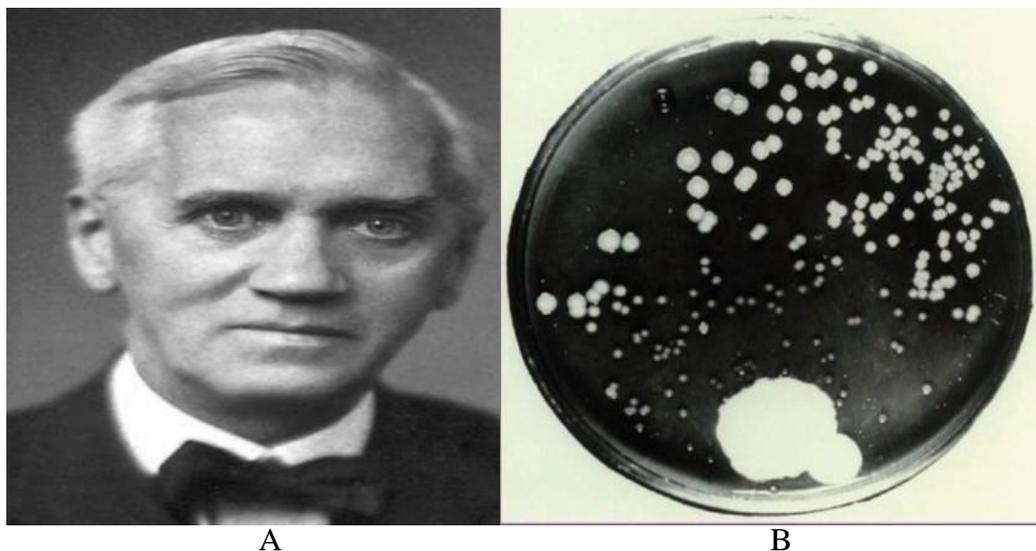
- Parmi les souches qui ont été proposées comme probiotiques se trouvent *E. faecium* EF9296 possédant une activité antimicrobienne contre *Listeria spp*, et *E. mundtii* ST4V (Todorov et al., 2008).

## Les antibiotiques

### Historique (Découverte)

Le 3 septembre 1928, le docteur Alexander Fleming rentre de vacances s'aperçut que certaines de ses cultures bactériennes dans des boîtes de Petri avaient été contaminées par des colonies de moisissure d'un blanc verdâtre (figure 3). Il s'agissait de souches d'un champignon microscopique, le *Penicillium notatum*. Fleming s'aperçut qu'autour des colonies de moisissure, le staphylocoque qu'il cultivait ne s'était pas développé. Il émit l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon était responsable de ce phénomène et lui donna le nom de pénicilline. Il venait de découvrir le premier des antibiotiques. L'industrie pharmaceutique s'en est emparée dès les années 1930-1940 et avec succès,

plus d'une centaine de molécules antibiotiques ont ainsi été commercialisées. Sauf que les bactéries ne se sont pas laissées faire : elles ont su développer des mécanismes de résistance et c'était la fin du remède miracle.



**Figure 3:** A) Portrait d'Alexander Fleming (1881-1955) B) – Photographie de la plaque

### Définition

Un antibiotique est défini comme toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes (Rania and Wided, 2020). Les antibiotiques ont une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle (Assel, Dhib and Zouaoui, 2021). Chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique et une cible bien déterminée. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries, ils peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Allem, Boutemine and Khennouchi, 2020)

## **Classification des antibiotiques :**

### **Selon l'origine :**

Selon leurs origines, il existe des antibiotiques naturels, semi-synthétiques (antibiotiques ayant une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants) ou synthétiques (obtenus par synthèse chimique totale ou partielle), 70% de ces antibiotiques proviennent d'actinomycète, 20% proviennent des champignons et 10% proviennent des bactéries notamment des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Chelkia and Gueriani, 2019).

### **Selon la structure chimique :**

La nature chimique permet de classer les antibiotiques en plusieurs familles, à titre d'exemple le cycle  $\beta$ -lactame dont le nom de la famille est  $\beta$ -lactamines est présent chez tous les antibiotiques de cette famille.

### **Selon le spectre d'activité :**

Chaque antibiotique est caractérisé par un spectre qui correspond à l'éventail des germes qu'il peut toucher, à dose plus ou moins élevée, on rencontre :

Les antibiotiques à spectre large : ils sont efficaces sur un grand nombre de types d'agents pathogènes. Ils sont actifs sur une grande partie de tous les cocci et tous les bacilles ; et utilisés lorsque la bactérie n'est pas encore identifiée.

Les antibiotiques à spectre étroit : ils sont efficaces sur un nombre limité d'agents infectieux leur permettant de cibler une pathologie en particulier.

Cette activité antibactérienne est caractérisée par :

*Une concentration minimale inhibitrice (CMI) : c'est la faible concentration d'un antibiotique dont le développement est empêché après 24h d'incubation, elle indique le pouvoir bactériostatique.*

*Une concentration minimale létale (CML) ou bactéricide (CMB) : c'est la faible concentration qui entraîne la mort de 99,9% des bactéries, elle indique le pouvoir bactéricide.*

On détermine l'activité intrinsèque d'un antibiotique selon le rapport CMB/CMI :

CMB/CMI  $\leq$  2 Antibiotique bactéricide

CMB/CMI = 4 à 16 Antibiotique bactériostatique

CMB/CMI > 16 Bactérie dit "tolérante" à l'antibiotique (Allem, Boutemine and Khennouchi, 2020).

### **Selon le mode d'action :**

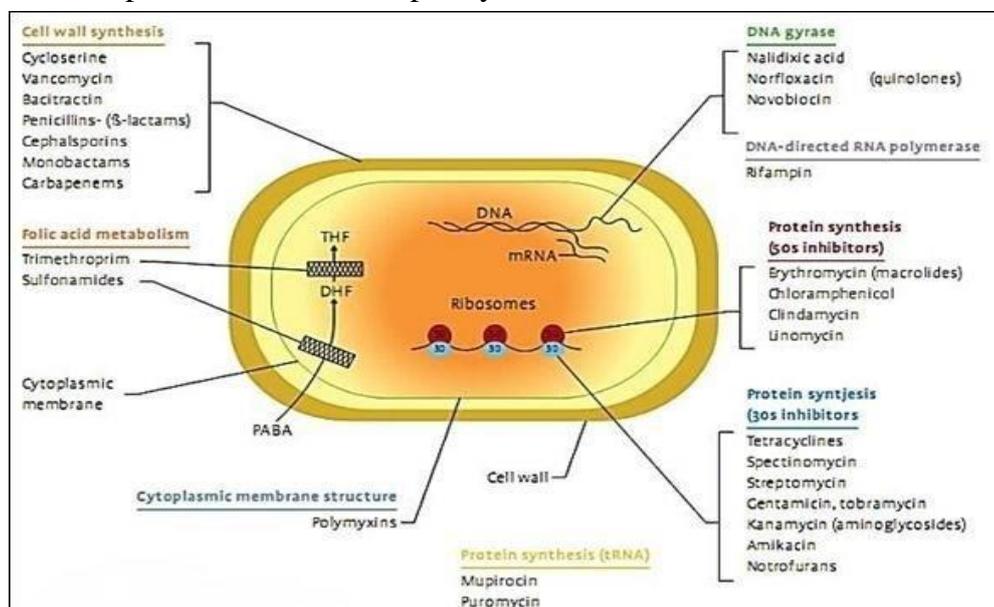
Selon le site spécifique d'action, un antibiotique peut agir par :

1- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne «  $\beta$ -lactamines, glycopeptides, et quelques molécules d'intérêt mineur comme fosfomycine, cyclosérine

2- Inhibition de la synthèse protéique : par action sur les ribosomes « aminosides, macrolides, acide fusidique ».

3- Action sur la synthèse des acides nucléiques « les quinolones qui bloquent la réplication de l'ADN, les fluoroquinolones, les rifamycines, nitrofuranes ».

4- Action sur les membranes cytoplasmiques « les polymyxines qui sont actifs sur les bactéries Gram négatif dont la colistine est le représentant le plus connu, et les daptomycine



**Figure 4:** Schéma récapitulatif montre les différentes familles des antibiotiques avec leur cible (Madigan and Martinko, 2007)

### Principales familles d'antibiotiques

Les principales familles d'antibiotiques sont classées dans les tableaux 3, 4, 5, 6 et 7.

### La résistance aux antibiotiques

Une bactérie est dite résistante à un ATB lorsque le taux nécessaire à inhiber sa croissance in vitro est supérieur aux taux qui peuvent être couramment atteints in vivo. On parle alors de résistance bactérienne quand un micro-organisme s'adapte au milieu et réussit à modifier son métabolisme pour continuer à se développer en présence de l'ATB qui devrait le détruire (Okrani and Hamdani, 2017).

La résistance des bactéries aux ATBs est rencontrée en milieu communautaire (c'est à dire en dehors du milieu hospitalier) ou en milieu hospitalier.

## **Types de résistances**

La résistance aux ATBs peut être naturelle ou acquise :

### **Résistance naturelle**

Résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien à un ATB. Ce caractère de résistance est présent dans son chromosome bactérien, il est constant et stable, transmis uniquement de manière héréditaire (Okrani and Hamdani, 2017).

**Tableau 3:** Antibiotiques agissant sur la paroi

<b>Famille</b>	<b>Groupe</b>	<b>Exemple d'antibiotiques</b>	<b>Mode d'action</b>
$\beta$ –lactamines	<u>Pénames</u>	<u>Ampicilline Amoxicilline</u>  <u>Carbénicilline</u>	<p>Ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP ont une activité transpeptidasique, carboxypeptidasique et transglycolasique.</p> <p>L'inhibition des PLP aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes rondes ou filamenteuses qui aboutissent à la lyse bactérienne</p>
	<u>Pénèmes</u>	<u>Imipénème, Méropénème</u> <u>Ertapénème.</u>	
	<u>Oxapénames ou clavams (acide clavulanique)</u>	<u>Amoxicilline Acide clavulanique</u> <u>Ticarcilline</u> <u>Acide Clavulanique</u>	
	<u>Céphèmes</u>	<u>Céfazoline</u> <u>Céfoxitine</u> <u>Céftriaxone</u>	
	<u>Monobactames</u>	<u>Aztréonam</u>	
Glycopeptides		<u>Vancomycine Teicoplanine</u>	<p>Ils bloquent la polymérisation du peptidoglycane en se fixant sur la partie DAla-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane</p>
Non classé		<u>Fosfomycine</u>	<p>Elle se fixe sur une enzyme impliquée dans la formation de l'acide, N- acétylmuramique qui est l'un des précurseurs du peptidoglycane.</p>

**Tableau 4:** Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode action</b>
Aminosides	Streptomycine, Kanamycine Gentamicine	Ils se fixent sur la Sous unité <b>30S</b> du ribosome ou ils s'interfèrent avec la synthèse des protéines
Macrolides, Lincosamides, Streptogramines, (MLS)	Spiramycine, Lincomycine Pristinamycine	Ils agissent au niveau de la S/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation
Tetracyclines	Chloramphénicol Thiamphénicol	Inhibition de la peptidyl- transférase, en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien
Phénicolés	Chloramphénicol Thiamphénicol	Inhibition de la peptidyl- transférase, en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien
Oxazolidinones	Linézolide	Se fixent sur la sous unité ribosomale 50S et empêchent la liaison à la sous unité 30S

**Tableau 5:** Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode action</b>
Polymixines	Polymixine B Colistine	Elles se fixent sur les phospholipides, et perturbent ainsi les transferts transmembranaires de nutriments et inhibent les phosphorylationsoxydatives du métabolisme, énergétique

**Tableau 6:** Antibiotiques agissant sur la synthèse des acides nucléiques

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode d'action</b>
Quinolones et Fluoroquinolons	Acide nalidixique, Acide pipémidique, Acide Oxolinique, Fluméquine.	Ils agissent sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse : ADN gyrase (cible principale des BGN) il forme un complexe ADN gyrase- Quinolones qui vabloquer la progression de l'ADN polymérase bactérienne au cours de la réplication ADN topo- isomérase IV L'interaction entre l'ADN, quinolone et topoisomérase stimule la coupure de l'ADN et inhibe la relégation
	Péfloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacine	
Rifamycines	Rifamycine, Rifamycine SV	Inhibition de la transcription de l'ADN en ARNm par inhibition de l'ARN polymérase.
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne, Furazolidone, Nifuroxazide	Elles agissent directement sur l'ADN provoquant diverses lésions (coupures et substitution de bases)

**Tableau 7:** Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Mode d'action</b>
Sulfamides	Sulfaméthoxazole, Sulfaméthizole, Sulfaguanidine	Inhibent la synthèse des folates, agissent en compétition avec le PABA pour le site actif, la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse une réaction essentielle à la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (DHF) nécessaire à la production des purines et pyrimidines pour la synthèse de l'acide nucléique
2-4 Diaminoptéridine	Triméthoprime	Inhibent la synthèse des folates, en se fixant sur la dihydrofolate réductase
Sulfamides + Triméthopme	Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (Cotrimoxazole)	Agissent sur les deux enzymes précédentes

### **Résistance acquise**

Il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques souches d'une espèce bactérienne. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du patrimoine génétique de la bactérie soit par mutation chromosomique ou bien extra-chromosomique lui permettant de tolérer une concentration d'ATB plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Okrani and Hamdani, 2017).

### **Mécanisme de résistance**

On distingue deux grands mécanismes de résistance :

#### **Mécanisme génétique**

##### **La résistance chromosomique**

Elle résulte d'une mutation phénomène rare, indépendant, due au hasard. Il n'est pas provoqué par la présence de l'ATB, mais ce dernier révèle la mutation de la résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes. Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique. Une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'ATB (Okrani and Hamdani, 2017).

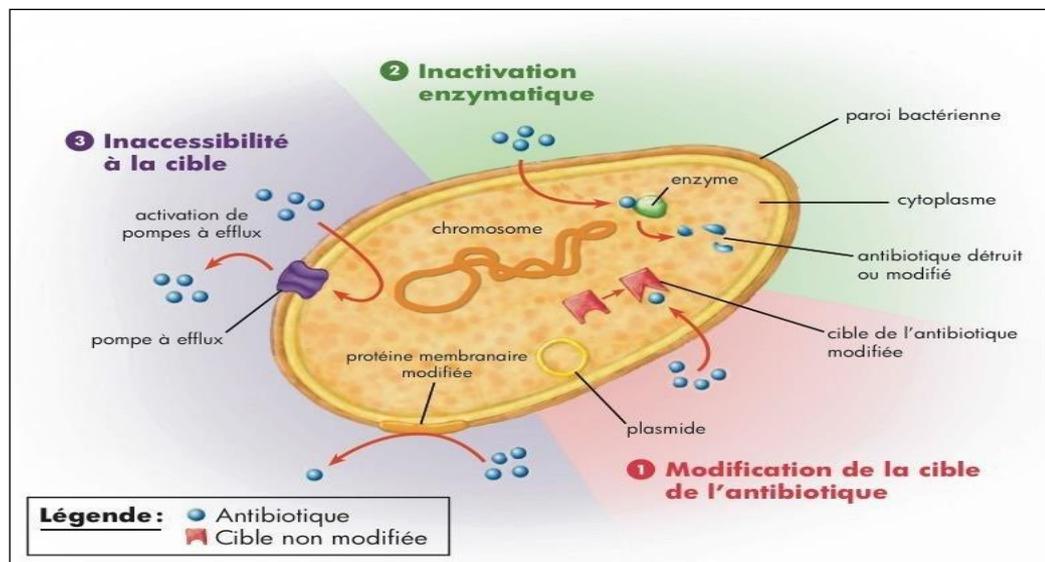
##### **La résistance extra chromosomique (plasmides)**

La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées et ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'ATB.

Elle résulte d'acquisition d'un plasmide qui est transféré par les pilis sexuels par contact direct entre des bactéries. Le donneur et le receveur ont à la fin du processus une copie du plasmide.

### Mécanisme biochimique

On distingue trois principaux mécanismes de résistances : inactivation enzymatique, inaccessibilité à la cible et modification de la cible de l'antibiotique (figure 5) :



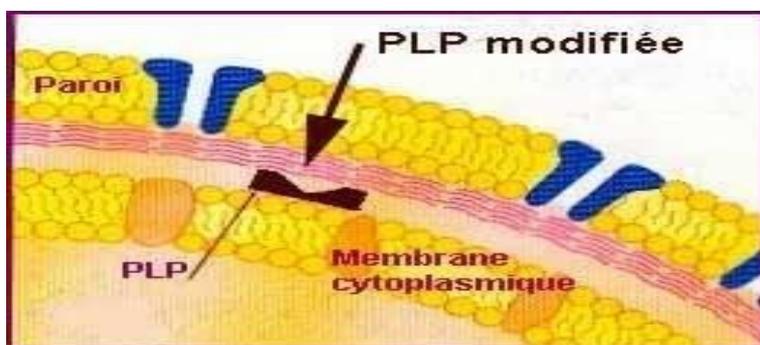
**Figure 5:** Les mécanismes de résistances aux ATBs.

### Modification de la cible d'ATB

Après pénétration cellulaire de l'ATB, il existe une phase de reconnaissance de la cible. C'est à ce niveau qu'intervient ce type de résistance. Il s'agit de :

- Modification des PLP (figure 6) ;
- Modification du précurseur de peptidoglycane ;
- Modification du ribosome ;
- Modification des topoisomérases ;
- Modification de l'ARN polymérase ;
- Modification des enzymes impliquées dans la synthèse des folates ;
- Modification du facteur d'élongation.

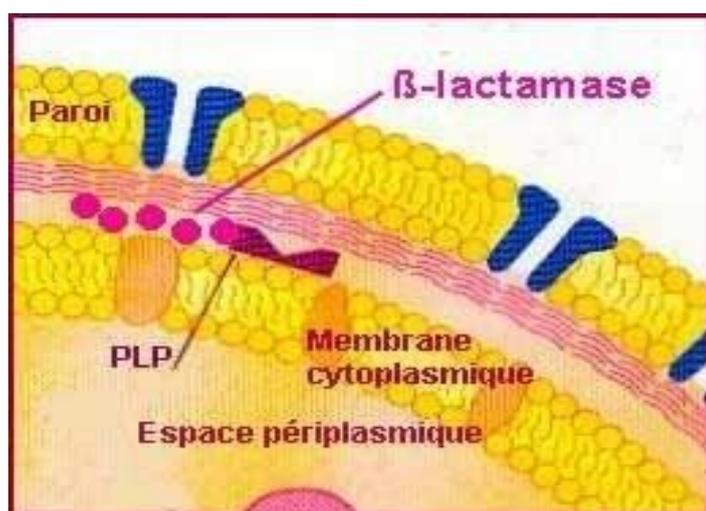
Chaque ATB se lie à cette cible et bloque son fonctionnement. La modification d'affinité de la cible envers l'ATB entraîne une diminution de la liaison entre la protéine cible et la molécule ATB, ce dernier sera alors moins efficace.



**Figure 6:** Le mécanisme de résistance aux ATBs par la modification des PLP au niveau de la bactérie

### Inactivation enzymatique de l'ATB

La bactérie peut produire des enzymes inactivant l'action des ATBs soit à l'extérieur de la bactérie : enzyme exocellulaire, soit à l'intérieur de la bactérie : enzyme endocellulaire ou périplasmique. Les classes d'ATBs visées par ces enzymes sont les Bêtalactamines les Macrolides-incosamides-Streptogramines (MLS), les Aminosides et les Phénicolés (Okrani and Hamdani, 2017)(figure 7).

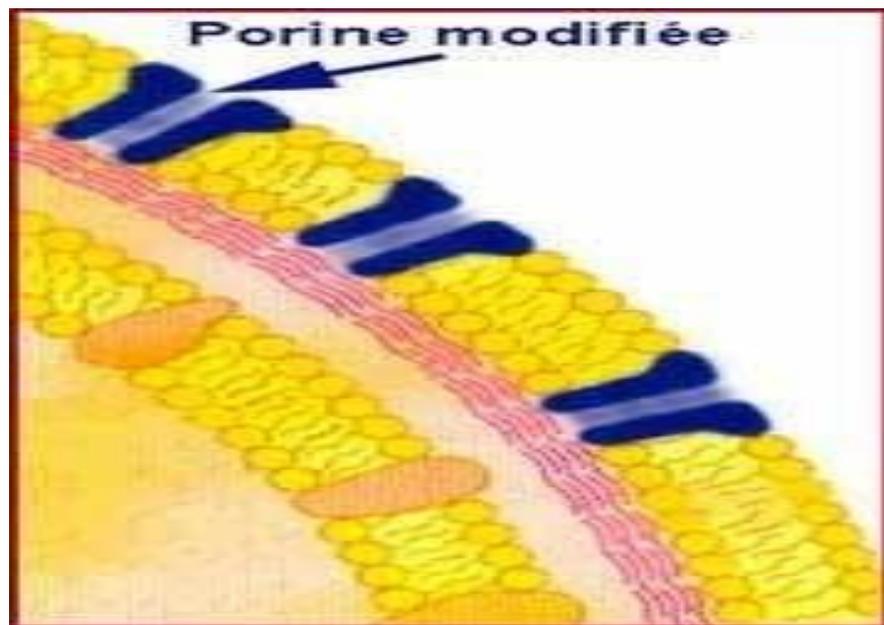


**Figure 7:** L'action des enzymes  $\beta$ -lactamase sur les ATBs agissant sur la bactérie.

### Diminution de la perméabilité

Pour agir, les ATBs doivent pénétrer dans la cellule bactérienne et utilisent les systèmes de transport propres à la bactérie pour ses échanges avec l'extérieur. Pour se défendre, la bactérie empêche cette entrée de toxiques en diminuant la perméabilité de sa membrane par :

Une altération des porines (protéines formant les pores de la membrane) : ce mode de résistance n'affecte que les bactéries Gram négatif, chez qui la membrane externe constitue une barrière de diffusion très efficace. L'ATB ne peut traverser cette barrière qu'en empruntant des structures particulières (les porines). Toute modification des porines rend le passage des molécules hydrophobes (comme la famille des Bêtalactamines) encore plus difficile (figure 8) ;



**Figure 8:** Le mécanisme de résistance par modification des porines de la membrane bactérienne.

L'absence de passage ou l'augmentation du temps de passage protège les bactéries et les rend résistantes ;

Une inhibition du transport actif ;

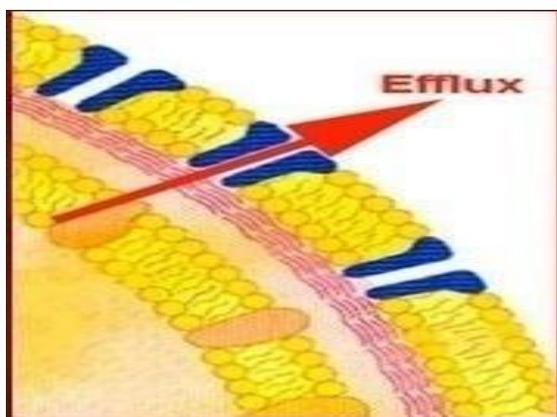
Une inhibition de la pénétration à travers les peptidoglycanes recouvrant la membrane plasmique chez les bactéries Gram positives ;

La modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS), au niveau du polysaccharide, peut aussi être à l'origine d'une diminution de la perméabilité.

Ce mécanisme n'est cependant pas très performant, car il suffit d'augmenter les doses d'ATBs pour faire face à cette baisse de la perméabilité membranaire. Néanmoins, ce système lorsqu'il est associé à d'autres systèmes de résistance, peut protéger de façon efficace la bactérie même à des doses importantes d'ATBs.

### **Excrétion de l'ATB par mécanisme d'efflux**

L'ATB ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de ce dernier vers l'extérieur de la bactérie (efflux). Les transporteurs d'efflux de plusieurs ATBs sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux ATBs favorise une surexpression par mutation de transporteurs, entraînant une hausse de la résistance bactérienne. Il est possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause d'une exposition à un ATB d'une autre classe (figure 9).



**Figure 9:** Le mécanisme d'efflux exercé par la bactérie sur l'ATB.

### **Profile de résistance**

L'identification de la bactérie permet de déterminer son premier profil de résistance. Pour connaître la sensibilité d'une souche bactérienne et l'acquisition de résistance vis-à-vis d'un ATB, il faut réaliser un antibiogramme. L'antibiogramme permet de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la concentration d'ATB la plus faible pour arrêter la croissance bactérienne. En fonction de cette CMI, la souche bactérienne est classée en trois catégories :

- Souche sensible : forte probabilité de succès thérapeutique dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée ;
- Souche résistante : forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement et la dose ATB utilisée ;
- Souche intermédiaire : succès thérapeutique imprévisible (Okrani and Hamdani, 2017).

### **La multirésistance**

Une bactérie est dite multirésistante (BMR) aux ATBs lorsqu'elle n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'ATBs habituellement actif en thérapeutique, par l'accumulation de résistances naturelles et/ou acquises.

En pratique, une bactérie est dite BMR lorsqu'elle est sensible à moins de 3 familles d'ATBs.

## **Facteurs de virulence et Gènes de Résistance**

### **Définition des facteurs de la virulence**

Pour les bactéries, les facteurs de virulence sont des molécules qui leur permettent de survivre et de se multiplier dans différents microenvironnements (hôte) quand la bactérie progresse pendant l'infection. Parmi ces facteurs on trouve :

- Toxines
- Facteurs d'Adhérence
- Effecteurs bactériens intervenant dans l'invasion et la survie intracellulaire
- Facteurs de virulence enzymatiques (Hashim, 2016).

### **Facteur de virulence d'*Enterococcus faecium* (Hashim, 2016)**

Les facteurs associés à la virulence chez *E. faecium* sont :

**Esp** : Le gène de la protéine de surface de l'entérocoque, *esp*, a été impliqué dans la formation de biofilms et l'adhésion à des matériaux abiotiques contribuant à l'établissement d'infections nosocomiales par la formation de biofilms sur les instruments médicaux. Il a été démontré que le gène *esp* d'*E. faecium* est impliqué dans les infections des voies urinaires. *Esp* améliore les infections des reins et de la vessie chez les souris (Leendertse, 2009).

**hylefm** : Le gène *hylefm* qui code pour une hyaluronidase putative se trouve également principalement dans les isolats épidémiques d'*E. faecium* résistants à la vancomycine d'origine clinique. Le *hylefm* était associé à un grand plasmide (plus de 145 kb). Il a été démontré que ce gène renforce la capacité de cette bactérie à coloniser le tractus gastro-intestinal. Ce gène a également été observé comme étant responsable de la virulence accrue d'*E. faecium* dans un modèle de péritonite chez la souris.

**sagA** : Parmi les facteurs de virulence putatifs qui ont été identifiés chez *E. faecium* se trouve le gène *sagA* qui peut être impliqué dans le métabolisme de la paroi cellulaire.

**Acm** : *Acm*, été largement étudiée chez *E. faecium*. Il a été montré que ce gène joue un rôle important dans la pathogenèse d'*E. faecium* dans un modèle d'endocardite chez le rat mais pas dans la péritonite.

**Scm** : Une étude bioinformatique basée sur le génome du projet de génome de la souche TX0016 dérivée de l'endocardite d'*E. faecium* a été réalisée. Sur la base de l'analyse, ces auteurs ont identifié un certain nombre de gènes codant potentiellement pour des composants de surface microbiens reconnaissant des molécules de matrice adhésive (MSCRAMM) dans *E. faecium*. Parmi les 15 protéines de surface ancrées d'*E. faecium* (Fms) identifiées Fms10, connue plus tard sous le nom de Scm s'avère coder un deuxième collagène.

**SgrA** : Cinq gènes codant pour les protéines ancrées à la paroi cellulaire LPXTG exposées à la surface (CWAP) enrichies de manière distinctive dans le complexe clonal 17 (CC-17) *E. faecium* ont été identifiés. En plus de Esp et Acm, une protéine de surface LPXTG, SgrA, qui a une région de répétition riche en sérine et il a été supposé que cette protéine pourrait adhérer au fibrinogène (Hendrickx et al., 2007 ; Hendrickx et al., 2009).

**EcbA** : Initialement, la protéine A de liaison au collagène d'*E. faecium*, EcbA, était connue sous le nom de protéine de surface LPXTG, et le gène de cette protéine était également enrichi en complexe clonal (CC-17) EcbA est l'un des MSCRAMM d'*E. faecium* qui se lie au collagène de type V.

**Pili** : Outre scm et acm, un autre gène, pilA, a été identifié. L'ebpABC d'*E. faecium* (ebpABCfm), est transcrit en un seul opéron, se polymérise en une protéine de sous-unité majeure du pilus, EbpCfm. EbpCfm est maintenant appelé PilB et cette protéine est présente à la surface d'*E. faecium*. Une étude plus approfondie par eux a montré l'importance du matériau de pili polymérisé dans l'interaction et l'adhérence entre les cellules individuelles qui pourraient servir de médiateur à la formation de la matrice de biofilm.

**AsrR** : Un capteur de stress oxydatif et un régulateur de réponse, AsrR (antibiotique et régulateur de réponse au stress) a été identifié chez *E. faecium* et signalé comme détectant le peroxyde d'hydrogène. Ce gène est conservé parmi tous les isolats d'*E. faecium*.

**gelE** : Ces enzymes, responsables de la protéolyse, sont également appelées gélatinase car elles sont capables de liquéfier la gélatine. La gélatinase, codée par le gelE chromosomique, est une endopeptidase à zinc extracellulaire qui hydrolyse le collagène, la gélatine et les petits peptides. Récemment, la présence de gelE a été rapportée dans une souche clinique d'*E. faecium* isolée chez des patients souffrant d'une maladie de Crohn.

### **Gène de résistance**

Les Entérocoques Résistant à la Vancomycine, aussi appelés VRE (entérocoque vancomycine résistant) ou ERG (entérocoque résistant aux glycopeptides) sont des bactéries devenues résistantes à certains antibiotiques en particulier à la classe des glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) . La résistance aux glycopeptides concerne principalement *E. faecium* et, à un moindre degré, *E. faecalis*. Les gènes de résistance (codés VanA à VanG) permettent à la bactérie de synthétiser des précurseurs modifiés de la paroi (peptidoglycane), cible d'action des glycopeptides, ce qui aboutit à une perte d'action des glycopeptides. Le gène vanA (le plus fréquent) entraîne une résistance de haut niveau à la vancomycine et à la téicoplanine. Les souches porteuses du gène vanB (moins fréquentes) restent sensibles in vitro à la téicoplanine. Ces gènes de résistance sont localisés sur des séquences d'ADN transposables appelées transposons rendant ainsi leur transfert possible à d'autres bactéries Gram positif et en particulier aux staphylocoques. La pathogénicité des VRE semble faible mais ils ont un haut risque de transmissibilité et de développement croisé

de résistance aux antibiotiques raison pour laquelle il est nécessaire de limiter leur diffusion (Yousfi, 2020)(tableau 8).

**Tableau 8:** Caractéristique de différents éléments génétiques impliqués dans la dispersion des gènes résistance.

Élément génétique	Caractéristiques	Rôles
Plasmide conjugative	Circulaire Élément de répllication autonome Présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison	-Transfert de gènes de résistance -Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Plasmide mobilisable	Circulaire Élément de répllication autonome Présence des gènes permettant d'utiliser l'appareil de conjugaison d'un plasmide conjugative	-Transfert de gènes de résistance
Transposon et ISCR	Capacité de déplacement depuis un segment d'ADN vers un autre à l'intérieur d'une bacteria.	-Transport de gènes de résistance du chromosome vers un plasmide et vice versa
Transposon conjugative	Élément intégré pouvant s'exciser pour former un intermédiaire de transfert non répllicatif Présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison	-Transfert de gènes de résistance -Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Cassette de gène	Circulaire - Segment d'ADN non répllicatif Présence seulement d'une fenêtre de lecture ouverte Intégration dans les intégrons	-Porte des gènes de résistance
Intégron	Segment d'ADN intégré Présence d'une intégrase, d'un promoteur, et d'un site d'intégration pour la cassette de gène	-Groupe de gènes de résistance dont l'expression est sous le contrôle du promoteur de l'intégron
Ilot génomique et EIC	Segment d'ADN chromosomique Présence des gènes nécessaires aux déplacements et au transfert par conjugaison	- Transfert de gènes de résistance - Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Bactériophage	Virus de bactérie Circulaire ou non Élément de répllication autonome	-Transfert de gènes de résistance -Mobilisation d'autres éléments portant des gènes de résistance
Fragment d'ADN isolé dans le milieu	Transféré par transformation d'une bactérie compétente	-Porte des gènes de résistance

### La phénotypiques et génotypiques des opérons chez les *E. faecium*

Caractéristique phénotypique et génotypique des opérons chez *E. faecium* sont illustrés dans tableau 9.

**Tableau 9:** Caractéristique phénotypique et génotypique des opérons chez *E. faecium*

<b>Van-opéron</b>	<b>Espèces</b>	<b>Niveau de résistance vancomycine vs téicoplanine</b>	<b>Expression Phénotypique</b>	<b>Location &amp; mobilité</b>
<b>VanA</b>	<i>E. faecium</i>	Élevé pour les deux	Inductible	Chromosome
<b>vanB; vanB1,B2, B3</b>	<i>E. faecium</i>	Transférable élevé-variable pour la vancomycine	Inductible	Chromosome
<b>vanD; vanD1, D2, D3, D4,D5</b>	<i>E. faecium</i>	Bas à Élevé pour les deux	Constitutive Inductible	Chromosome
<b>VanM</b>	<i>E. faecium</i>	Élevé pour les deux	Inductible	Unknown Transférable
<b>VanN</b>	<i>E. faecium</i>	Bas pour la vancomycine Sensible à la teicoplanine	Constitutive	Plasmide Transférable

# **III. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---

L'objectif principal de cette étude est d'examiner le profil de résistance aux antibiotiques et d'effectuer une caractérisation génomique et physiologique de la souche *E. faecium* B319 isolée des fèces de rat.

## **Étude expérimentale**

### **Matériel**

#### **Verreries**

Boîtes de Pétri, tube à essai, pipette Pasteur, écouvillons, anse à boucle, micropipette, embouts (0,1 et 1 ml), spatule, pince, cuve de spectrophotomètre, lame pour microscope, flacon en verre, pipette (10 ml), cloche de Durham, éprouvette, bécher, tubes pour la centrifugation.

#### **Liquide et Produit**

L'eau physiologie, L'eau distillé, violet de gentiane, Lugol, l'alcool 95°, fuchsine de Ziehl, NaCl, bleu de méthylène, disques d'antibiotiques.

#### **Instruments**

Étuve, Vortex, Bec Bunsen, Autoclave, Spectrophotomètre, Balance électronique, Microscope optique, Réfrigérateur, Bain-Marie, pH mètre, Centrifugeuse.

#### **Milieu de culture**

MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe) agar et bouillon.

#### **Matériel biologique**

La souche *Enterococcus faecium* 319 était isolée à partir des fèces de rats traités à l'ampicilline (Benabbou, Karam and Karam, 2019).

#### **Revivification de la souche B319**

La revivification consiste à décongeler notre souche de d'études qui a été conservées préalablement à une température de -18°C dans le lait reconstitué et en ensemercer aseptiquement quelques microlitres dans le

bouillon MRS spécifique pour les souches lactiques (Bohoua, 2008) Après incubation à 30°C pendant 72h les souches ont été ensemencées sur gélose MRS par des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de colonies isolées.

### **Purification**

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS avec une incubation à 30°C et ou 45 °C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (Idoui et al., 2009).

### **Observation macroscopique**

L'examen macroscopique est porté sur l'observation macroscopique qui permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, taille, pigmentation contour, viscosité....) (Djimli, Bouachir and Benaziza, 2019)

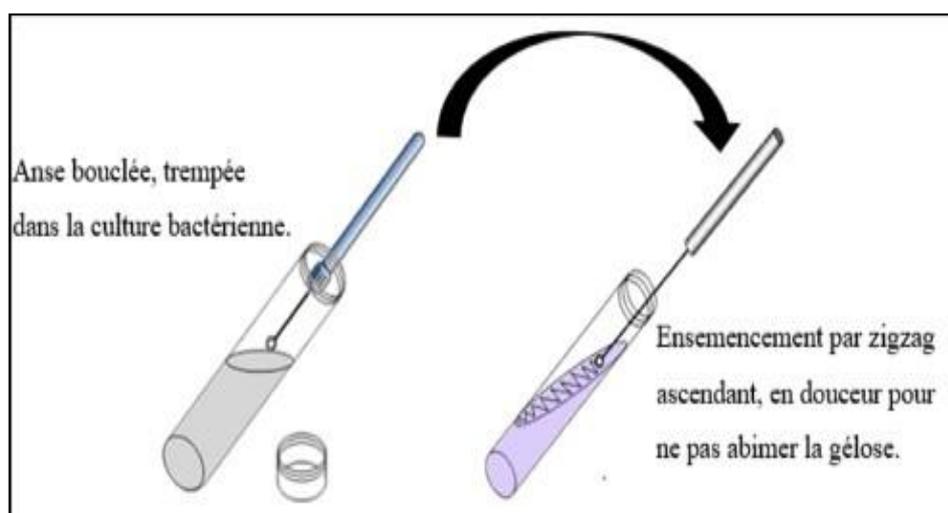
### **Observation microscopique**

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être appartenir à notre souche, l'isolat a été soumis à la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et de nous renseigner sur le mode d'association (Idoui et al., 2009).

La coloration de Gram consiste à déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant 1 minute, après rinçage, on redépose du Lugol pendant 1 minute, les bactéries sont décolorées à l'alcool 95° puis on rince avec de l'eau distillée. Enfin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 20 secondes. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique (Idoui et al., 2009).

### Conservation à court duré

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu MRS solide incliné (figure 10). Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines.



**Figure 10:** Schéma de conservation courte durée de la souche B319

## Étude biochimique et Physiologique

### Recherche oxydase

Il consiste à prendre une partie d'une colonie pure du milieu MRS et la mettre en contact avec un disque « Ox ». Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme cytochrome oxydase (Kovács et al., 1995).

### Recherche de catalase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme non identifiée de la chaîne respiratoire. Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de connaître si notre bactérie est catalase négatives (-) ou catalase positives (+). Les entérocoques ne possédant pas cette enzyme en général (Chenouf et al., 2014)

### **Teste de croissance à différentes températures**

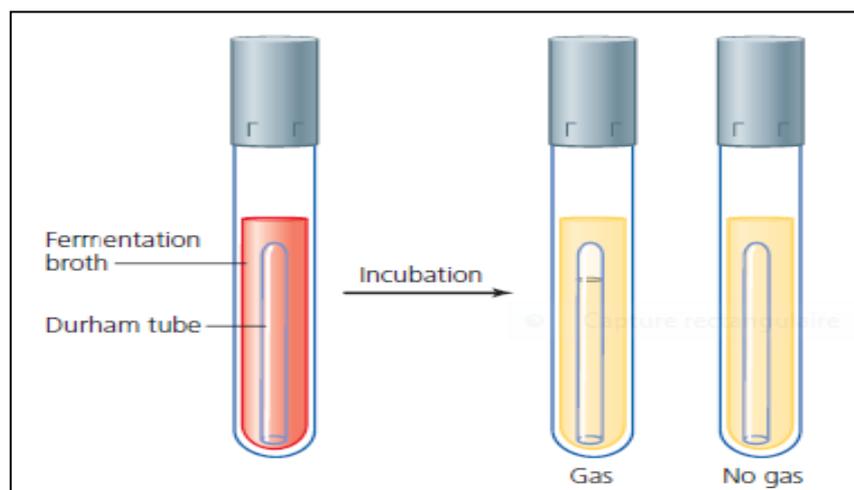
Ce test est important car il permet de connaître si notre bactérie est mésophile ou thermophile (Kalogridou-Vassiliadou et al., 1994), il est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble dans le milieu après 24-48 heures à 4 °C, 30 °C, 37 °C et 45 °C (Djimli, Bouachir and Benaziza, 2019).

### **Teste de croissance au milieu hyperalcalin**

L'habilité des bactéries à croître dans milieu hyperalcalin est testé sur bouillon MRS à pH 9.6 pendant 2 à 3 jours. Après le temps d'incubation, l'observation d'un trouble signifie que la bactérie a pu résister dans ces conditions (Saidi et al., 2002).

### **Type de fermentation**

Ce test permet de connaître si notre bactérie est homofermentaire ou hétérofermentaire. Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO<sub>2</sub>). Un tube contenant le bouillon MRS et une cloche de Durham est inoculé avec la souche à étudier après incubation de 24h à 30°C, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire, alors que leur absence indique les bactéries homofermentaires (Hariri et al., 2009) (figure 11).



**Figure 11:** Schéma représentatif de la détection de production de gaz

### **Teste du lait de Sherman**

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène à différentes concentrations. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 30°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. La réaction positive se traduit par la réduction de bleu de méthylène qui vire du bleu (forme oxydé) vers le transparent (forme réduite).

### **Teste de thermorésistante**

Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 min, elles sont incubées à 30°C pendant 48 à 72 h. Un résultat positif se traduit par un trouble (Badis et al., 2005).

### **Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl**

Sur des bouillons hypersalés contenant du NaCl à concentration de 2,5 ; 4 et 6,5% nous avons cultivé notre souche et incubée à 37°C pendant 24 à 72h. Le développement des cultures a été apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions.

### **Détermination du profil de résistance**

L'antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité a été testée par la méthode de diffusion sur milieu MRS. Notre souche a été soumise à une liste de molécules d'antibiotiques (tableau 10). L'interprétation des résultats, a été faite selon le manuel du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM, 2018) et selon les recommandations du CLSI (2014).

#### **Technique de l'antibiogramme**

La souche B319 a été repiquée sur le milieu MRS bouillon, et incubées pendant 18 heures à 37°C, dans le but d'avoir des cultures jeunes. Des suspensions bactériennes ont été préparées par ensemencement des cultures jeunes dans de l'eau physiologique. La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de  $\lambda=625\text{nm}$ . L'antibiogramme est réalisé par l'ensemencement de la suspension bactérienne sur les boîtes du milieu MRS à l'aide des écouvillons, en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la gélose. Ensuite, des disques d'antibiotiques sont appliqués à l'aide d'une pince stérile. L'incubation des boîtes est réalisée à 37°C/24H. La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, qui a été formée autour des disques d'antibiotiques. Après lecture des zones d'inhibition, les souches sont classées en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été interprétés en se référant aux diamètres discriminants fixés par CLSI M100-S (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012).

### **Évaluation de la qualité des données brutes**

Les fichiers récupérés sont des séquences brutes issues d'un séquençage par la méthode Illumina. Avant de commencer à les utiliser, la qualité des séquences a été contrôlé utilisant le software FastQC (Andrews, 2010).

### **Élimination des séquences contaminantes**

Les adaptateurs sont utilisés pour construire la banque, créer des clusters et les séquencer. Selon la taille des séquences initiales (avant formation des clusters) et la qualité de la construction initiale de la banque, les adaptateurs peuvent être présents en quantités variables. Ces séquences non génomiques peuvent poser un problème lors de l'assemblage. Pour éliminer ces séquences, nous avons utilisé le logiciel Trimmomatic sous Linux (Bolger et al., 2014), qui est capable de découper les séquences d'adaptateurs (entières ou non, avec index/mismatches) et d'éliminer les contaminants résiduels du multiplexage (séquençage de plusieurs individus en même temps) sans risque d'éliminer trop de séquences réelles. Le seuil de qualité choisi permet également d'éliminer les bases de mauvaise qualité situées à la fin des séquences.

### **Élimination des parties de reads de mauvaise qualité**

Des séquences de nucléotides de mauvaise qualité à la fin des reads peuvent induire des variantes mal détectées. Afin de ne conserver que les séquences de bonne qualité, nous avons retiré les nucléotides et les séquences de mauvaise qualité à l'aide du logiciel sous Linux fastx-toolkit (Hannon, 2010).

## **Assemblage**

En bio-informatique, l'assemblage consiste à aligner et/ou fusionner des fragments d'ADN ou d'ARN issus d'une plus longue séquence afin de reconstruire la séquence originale. Il s'agit d'une étape d'analyse *in silico* qui succède au séquençage de l'ADN ou de l'ARN d'un organisme unique, d'une colonie de clones (bactériens par exemple), ou encore d'un mélange complexe d'organismes.

Dans la présente étude, l'assembleur SPades a été utilisé pour l'assemblage *de novo* (Bankevich et al., 2012). L'assemblage a été exécuté sur une machine Intel CPU i7 8700k overclocké, contenant 12 cœurs (threads) de 5 GHz et un total de 64Go de RAM sous Linux Ubuntu 22.04 LTS. Cependant, l'utilisation de ce module demande à l'utilisateur d'être familier avec l'environnement linux et l'invite de commande.

Une fois l'assemblage des reads est terminé, la qualité du consensus peut être améliorée en alignant les reads Illumina aux contigs à l'aide de l'outil Pilon (Walker et al., 2014) qui consiste à corriger les erreurs de base (SNV/Indel) dans le génome généré par les longues lectures bruitées tandis que la génération de l'ordre et de l'orientation des contigs a été assurée par l'outil CONTIGuator (Galardini et al., 2011) guidé par le génome le plus proche identifié à l'aide de la base de données NCBI Blast+. Le logiciel Quast 5.0.2 (Gurevich et al., 2013) a été utilisé pour examiner les contigs et les scaffolds et pour évaluer statistiquement la qualité de l'assemblage.

## **Annotation du génome et génomique fonctionnelle**

L'annotation générale de l'ensemble du génome de la bactérie à tester a été réalisée par Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) algorithm of the National Center for Biotechnological Information (NCBI) (Tatusova et al., 2016).

### **Annotation spécialisée**

La recherche de gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence effectuée principalement à l'aide du logiciel ABRicate (Seemann, 2020). La recherche de gènes de résistance et de virulence a été effectuée à l'aide de la base de données AMRFinderPlus du NCBI (Feldgarden et al., 2019) et de la base de données VFDB (Chen et al., 2016), respectivement. La recherche de mutations génétiques qui codent pour un phénotype de résistance a été effectuée à l'aide de l'outil ResFinder (Acquired antimicrobial resistance gene finder) (Zankari et al., 2012).

Les gènes de biosynthèse des vitamines et les gènes de survie dans le tractus gastro-intestinal ont été comparés au génome du B319 à l'aide de la méthode NCBI BLASTX (Altschul et al., 1990).

L'annotation des phages a été réalisée par PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER) (Zhou et al., 2011; Arndt et al., 2016) qui est un serveur web conçu pour identifier, annoter et afficher graphiquement de manière rapide et précise des séquences de prophages au sein de chromosomes bactériens ou de plasmides.

La recherche d'éléments génétiques mobiles a été effectuée à l'aide du logiciel en ligne OriTfinder (Li et al., 2018), qui détecte les sites d'origine du transfert de l'ADN (oriT), ainsi que les relaxases.

ICEfinder (Liu et al., 2019) est un autre logiciel en ligne qui recherche les éléments intégratifs conjugatifs ICE.

### **Cartes circulaires du génome**

Le CGView Circular Genome View (Stothard and Wishart, 2005) a été utilisé pour générer des cartes génomiques circulaires de chacune des souches montrant les caractéristiques du génome des bactéries.

# **IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---

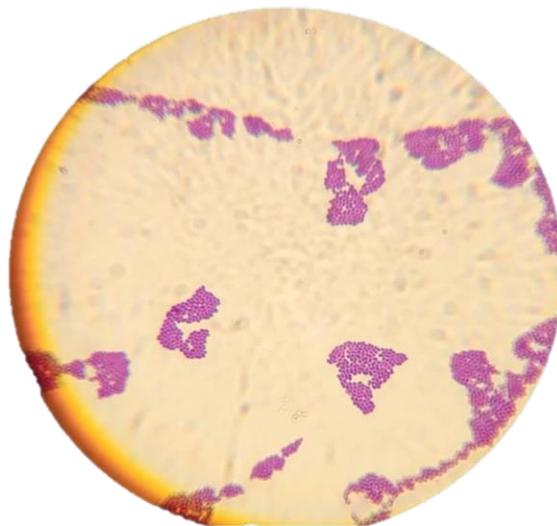
### **Revivification et vérification de la pureté de la souche B319**

Les colonies bactériennes de la souche B319 sur milieu MRS ont un diamètre d'environ 1 mm, sont de couleur blanchâtre, semi-bombées, à surface lisse et à pourtour circulaire régulier (figure 12).



**Figure 12:** Aspect des colonies bactériennes sur milieu MRS gélosé de la souche B319.

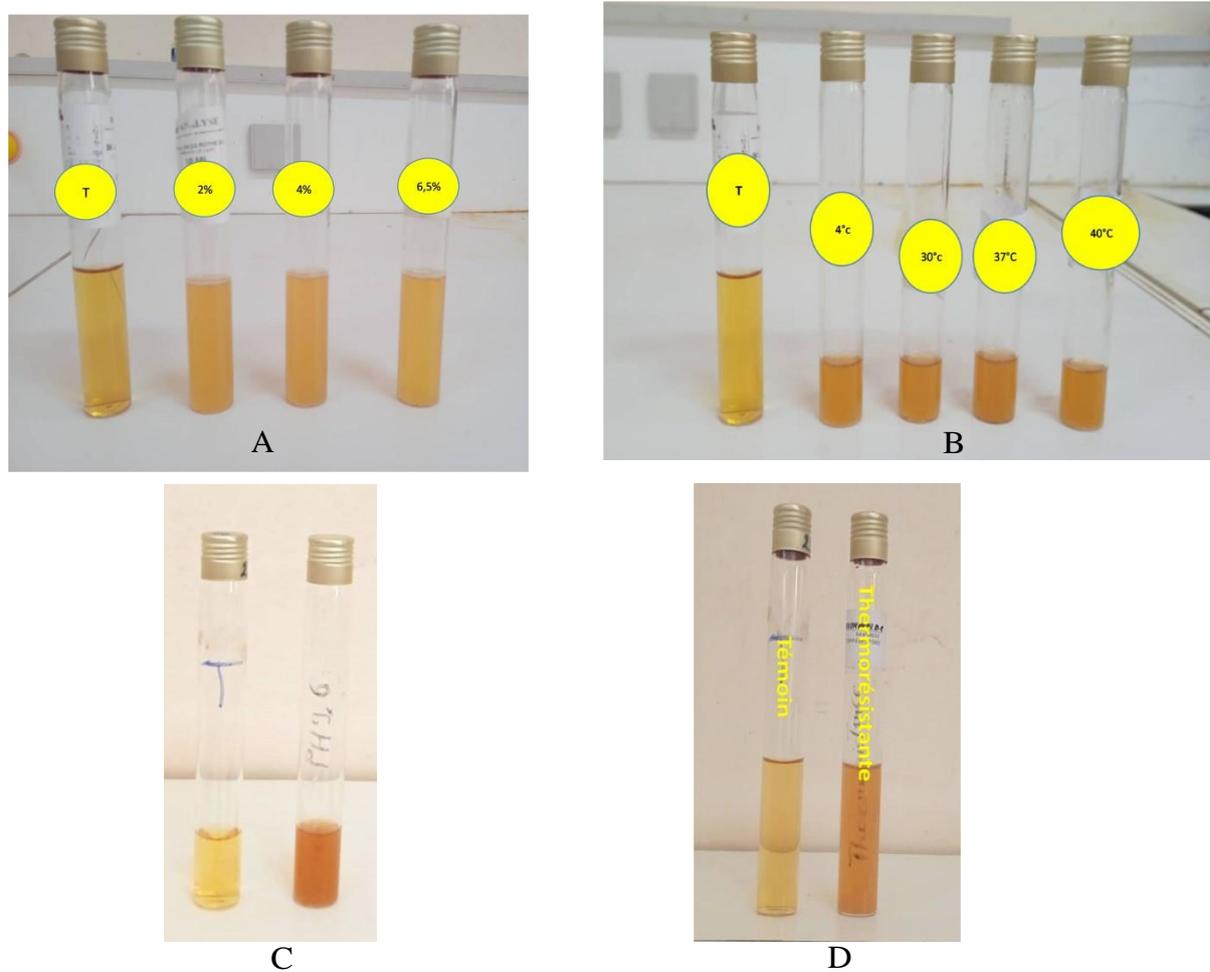
L'observation au microscope optique après coloration de Gram au grossissement X 1000 a montré des cellules de couleur violette, donc retiennent la coloration de Gram, et sont associées en paire ou regroupés. Elles sont parfois isolées. Leurs formes est ovoïde (figure 13).



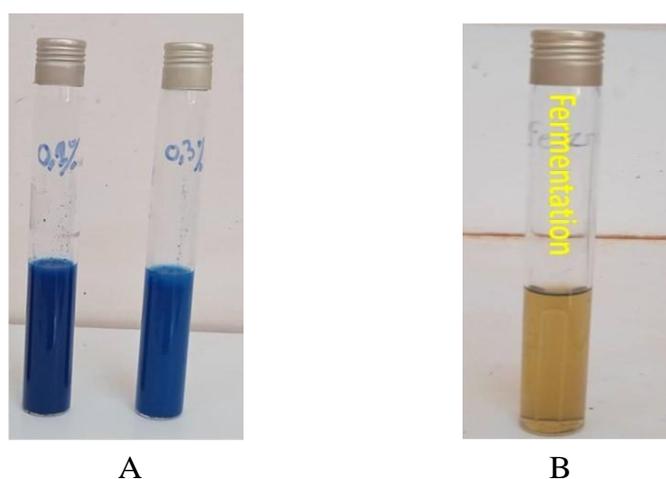
**Figure 13:** Aspect microscopique après coloration de Gram de la souche B319 (Grossissement X1000).

En plus des tests basés sur la morphologie bactérienne, nous avons utilisé d'autres tests physiologiques et biochimiques pour confirmer que la souche B319 appartient au genre *Enterococcus*, ces tests sont :

- La croissance dans des conditions hostiles : c'est-à-dire le test de croissance de la bactérie en présence de 6,5% de NaCl, à 45 °C, à pH 9,6 et le test de thermorésistance (Devriese et al., 1995). La figure 14 montre des exemples de cultures bactériennes de 18 heures d'incubation à 45 °C en milieu liquide ; de culture en présence de 6,5% NaCl, de culture à pH 9,6 et le test de la thermorésistance.
- La réduction du bleu de méthylène nous a également permis de confirmer ainsi le fait que la souche est du genre *Enterococcus*, étant donné que ce genre réduit le bleu de méthylène à 0,1% avec coagulation et non à 0,1%. La figure 15 montre des exemples de cultures bactériennes de 18 heures en présence de bleu de méthylène à 0,1% et 0,3%.
- L'étude du type fermentaire nous a permis de distinguer les coques lactiques "homofermentaires" que le genre *Enterococcus* fait partie (Kandler, 1986). La figure 17 montre des exemples de culture bactérienne de 18 heures d'incubation à 30 °C en milieu liquide muni d'une cloche de Durham.



**Figure 14:** Aspect des cultures bactériennes en milieu liquide en présence de 6,5% de NaCl (A), à 45 °C (B), à pH 9,6 (C) et le résultat du test de la thermorésistance (D).



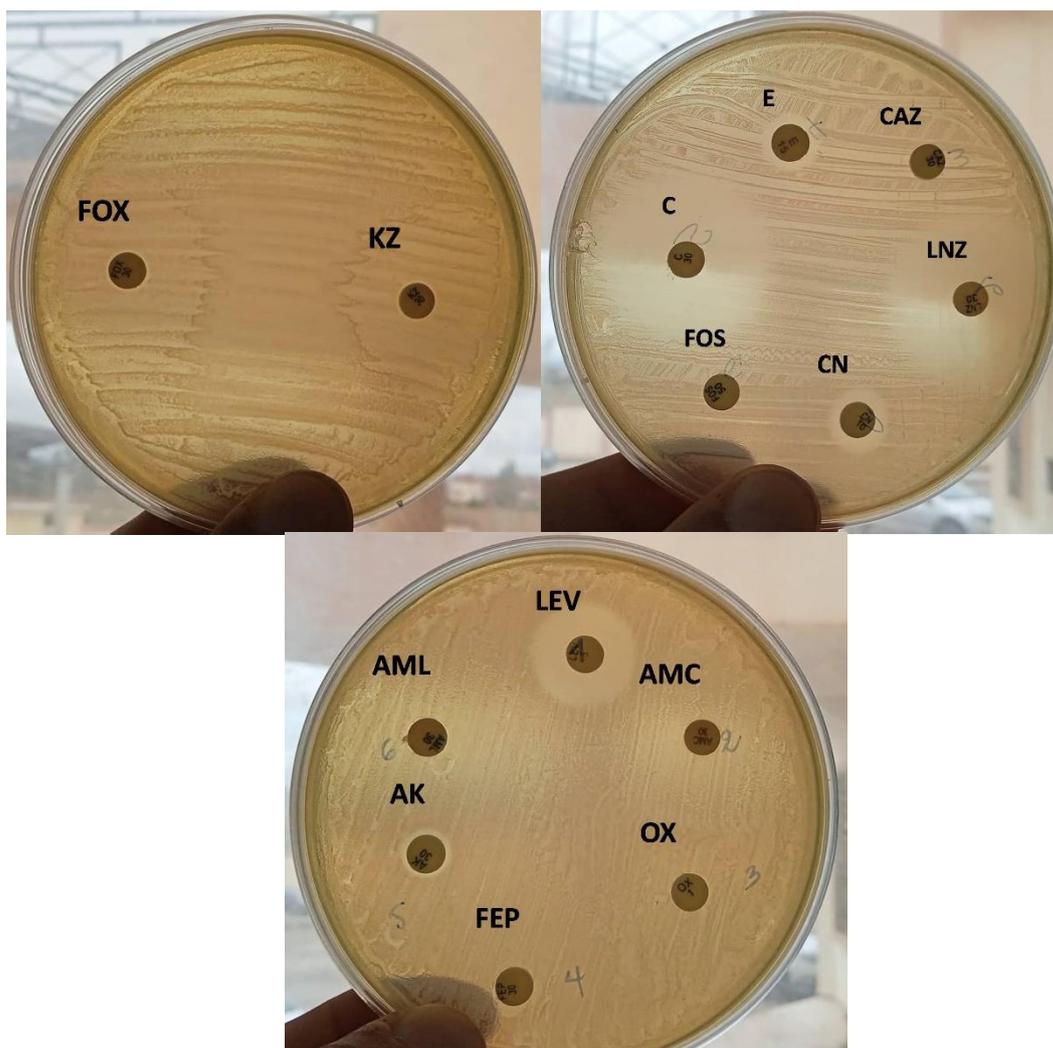
**Figure 15:** Culture bactérienne de la souche B319 en présence de 0,1% et 0,3% de bleu de méthylène (A) et le résultat du test de type fermentaire (B).

## Antibiogramme

La sensibilité de la souche B319 aux 14 antibiotiques utilisés a donné les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous. Un exemple des résultats de l'antibiogramme est présenté dans la figure 16. Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés et interprétés selon les directives du CLSI (2017). Parmi ces 14 antibiotiques, la souche B319 a montré une sensibilité à un antibiotiques à savoir le chloramphénicol. En revanche, la souche a montré une résistance à la plupart des antibiotiques testés, notamment la céfoxitine, la ceftazidime, le céfépime, l'amoxicilline et l'acide clavulanique, l'oxacilline, la céfazoline, la gentamicine, l'amikacine, l'érythromycine et la fosfomycine, ainsi qu'une résistance intermédiaire à la lévofloxacine et Linizolide.

**Tableau 10:** Profil de résistance de la souche B319

Antibiotique	Abréviation	Charge ( $\mu\text{g}$ )	Diamètre en mm	Résultat
Céfoxitine	Fox	30	0	R
Céftazidime	CAZ	30	0	R
Céfépime	FEP	30	0	R
Ampicilline	AML	30	0	R
Amoxicilline + acide Clavulanique	AMC	30	0	R
Oxacilline	OX	1	0	R
Céfazoline	KZ	30	0	R
Gentamicine	CN	10	10	R
Amikacine	AK	30	7	R
Erythromycine	E	15	10	R
Chloramphénicol	C	30	27	S
Linizolide	LNZ	30	21	I
Levofloxacine	LEV	5	16	I
Fosfomycine	FOS	50	0	R



**Figure 16** : Résultats de test antibiogramme de la souche B319 (sur boîte)

### **Analyses bioinformatiques des données de séquençage**

Évaluer la qualité des données brutes issues d'un séquençage haut-débit est la première étape que nous avons effectuée avant de se lancer dans des analyses bioinformatiques. Il est important de déterminer, entre autres :

- Le nombre de « reads » (lectures),
- La qualité des reads,
- La longueur des reads,
- Une éventuelle contamination

- La présence suspecte d'adaptateurs.

### Évaluation de la qualité des données brutes

Les fichiers récupérés sont des séquences brutes issues du séquençage par la méthode Illumina. Le contrôle de la qualité des reads était réalisé par le « software » FastQC (Andrews, 2010), les résultats sont résumés dans le tableau 11 et la figure 17.

**Tableau 11:** Résultat de la qualité des données brutes

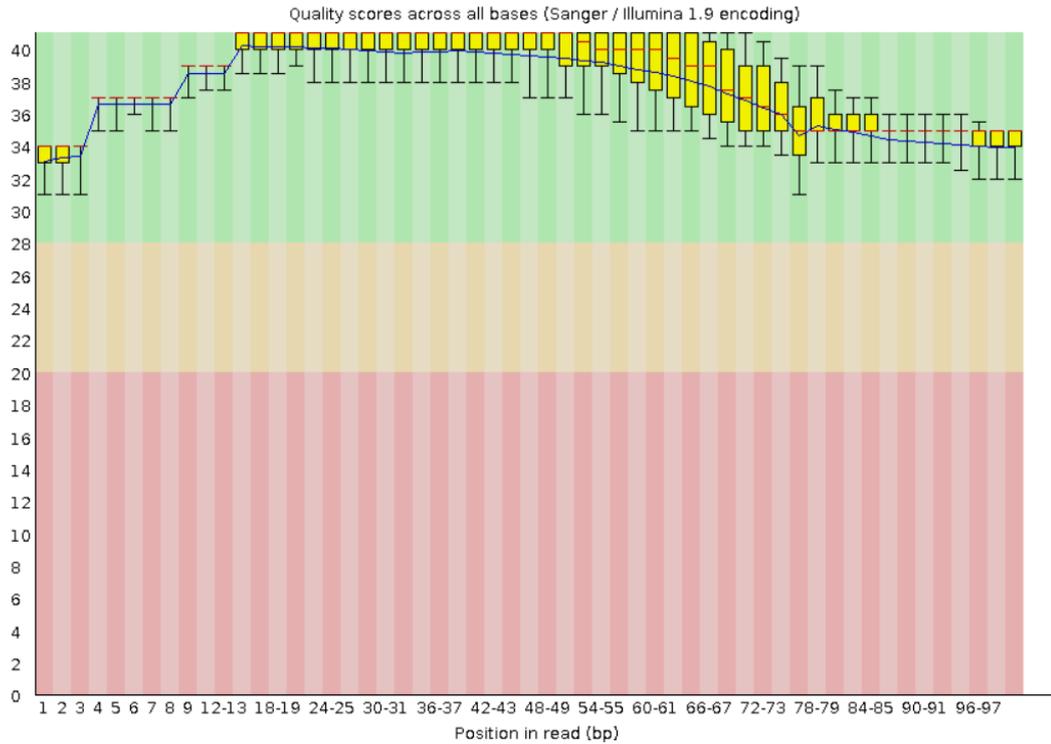
Mesure	Valeur
Nom de fichier	319-1.fastq
Encodage	Sanger / Illumina 1.9
Total des séquences	18251327
Séquences marquées comme étant de mauvaise qualité	0
Longueur de séquence	100
% GC	39

Le tableau 11 résume les résultats de la qualité des données brutes, il montre le type de séquençage (illumina) le nombre total des séquences (18251327), le nombre de séquences de mauvaise qualité (0), la longueur des séquences (35 et 301) ainsi que le pourcentage de GC (39%).

Le graphique de la figure 17 représente la qualité (score Phred, en ordonnée) de chaque base (en abscisse) pour tous les reads. À chaque position du read, la qualité de tous les reads est représentée sous la forme d'un « boxplot ». La médiane est en rouge. Le code couleur indique les scores de très bonne qualité en vert, bonne qualité en orange et mauvaise qualité en rouge. Généralement, la qualité baisse en fin de reads.

Pour notre cas, le « software » a indiqué une bonne qualité des séquences, mais un nettoyage est nécessaire pour éliminer les bases de mauvaises qualités situées sur la fin des séquences, ainsi que les séquences contaminantes comme les « trimmers » des adaptateurs.

### ✔ Per base sequence quality



**Figure 17:** Scores de qualité des bases (Sanger/Encodage Illumina 1.9) avant nettoyage.

### Nettoyage des données brutes

Le nettoyage des données brutes de séquençage était réalisé par Trimmomatic (Bolger et al., 2014) et Fastx-Toolkit (Hannon, 2010). Les résultats sont présentés dans le tableau 12 et la figure 18.

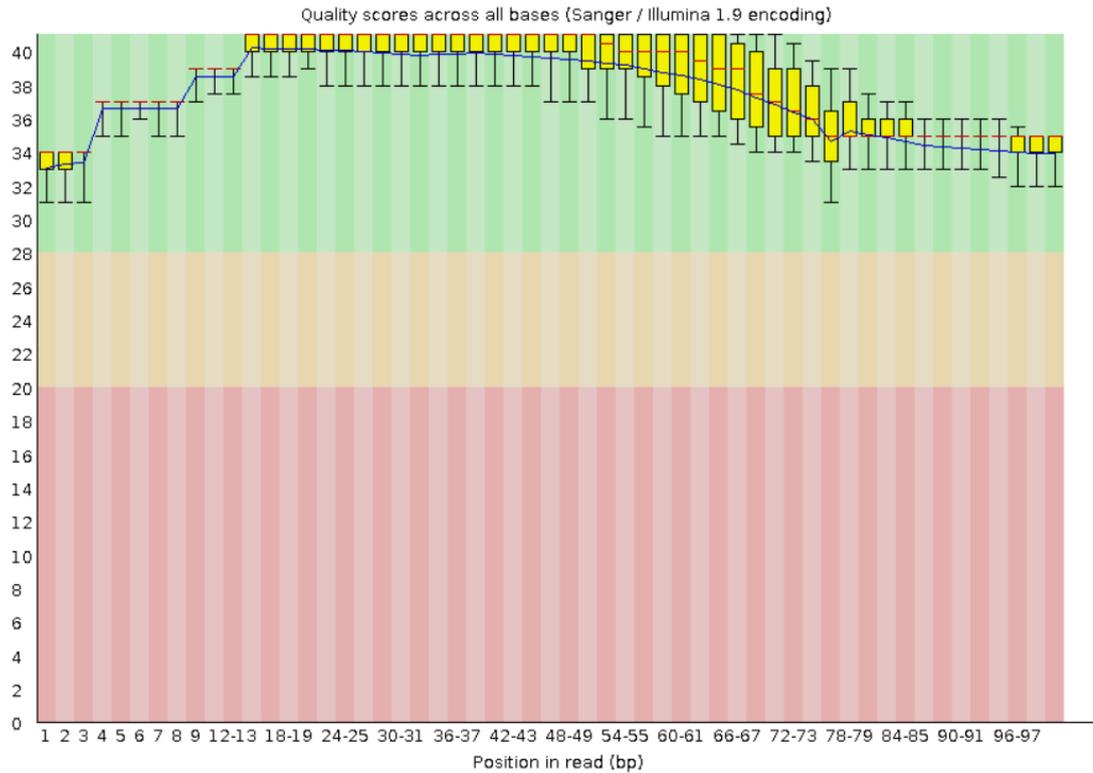
**Tableau 12:** Résultat de la qualité des données brutes après nettoyage

Mesure	Valeur
Nom de fichier	319-1 trim.fastq
Encodage	Sanger / Illumina 1.9
Total des séquences	18108822
Séquences marquées comme étant de mauvaise qualité	0
Longueur de séquence	31-100
% GC	39

Le nettoyage a permis d'éliminer les séquences contaminantes et de conserver que les séquences de bonnes qualités (18108822). La qualité de

chaque base est ainsi augmentée et le « software » a indiqué une très bonne qualité (figure 18).

### ✔ Per base sequence quality



**Figure 18:** Scores de qualité des bases (Sanger/Encodage Illumina 1.9) après nettoyage.

Le nettoyage des données brutes avant l'assemblage peut conduire à de bien meilleurs assemblages, car la contamination et les reads sujets aux erreurs de faible qualité auront été supprimées. Il donne également un meilleur guide pour le réglage des paramètres d'entrée appropriés pour le logiciel d'assemblage. Il est important d'effectuer ces étapes sur tous les fichiers lus car ils peuvent avoir des qualités très différentes.

### Résultats de l'assemblage *de novo* du génome

Dans la plupart des cas, nous avons essayé un ensemble de paramètres pour le software SPades afin d'optimiser l'assemblage et pour diminuer les erreurs.

Le software Quast 5.0.2 (Gurevich et al., 2013) était utilisé pour examiner les contigs et pour évaluer statistiquement la qualité de l'assemblage. Le fichier journal de Quast 5.0.2 contient des informations sur tous les assemblages exécutés. À la fin de ce fichier, il y a beaucoup d'informations concernant l'assemblage final. Cela comprend certaines données métriques sur les drafts contigs (N50, longueur maximale de contigs, nombre de contig, etc.). Les résultats de l'assemblage sont résumés dans le tableau 13.

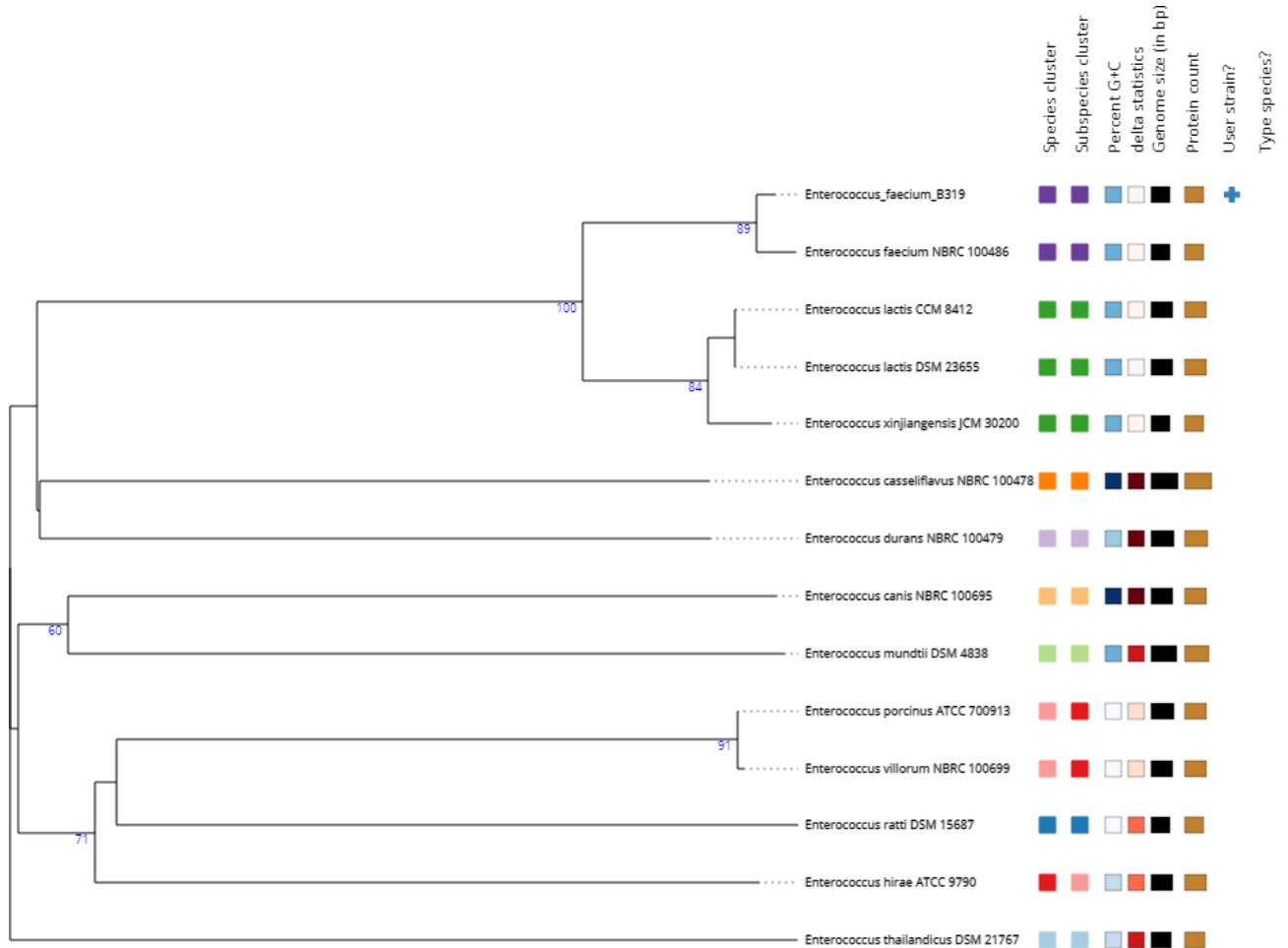
**Tableau 13:** Résultats de l'assemblage du génome entier de *E. faecium* B319.

Assembleur	Contigs	Contigs > 1 Kb	Large contig	Longueur totale	GC (%)	N50	Nb gènes
<b>SPades</b>	93	92	179647	2584075	38,05	65181	2461

Le nombre de contigs obtenus après assemblage est de 93 soit 92 ayant une taille supérieure à 1 kb, qui est le seuil arbitraire de sélection d'un contig de grande taille. Les contigs construisent un génome total de 2584075 pb avec un N50 de 65181 pb, signifiant que la moitié de l'assemblage final de MIRA se trouve dans des contigs ayant une taille supérieure à 65181 pb.

Dans cette étude, nous avons également vérifié que notre souche fait partie des entérocoques ; pour cette raison, nous avons essayé de donner une estimation des relations entre les taxons (ou séquences) et leurs ancêtres communs potentiels en construisant un arbre phylogénétique basé sur le génome entier de la souche en question (Figure 19). Cet arbre phylogénétique montre les différentes espèces d'*Enterococcus*, dont la souche B319 forme un clade avec une souche de l'espèce *Enterococcus faecium* NBRC 100486 avec un pourcentage de similarité de 89 %,

confirmant ainsi que B319 est plus étroitement liée à l'espèce *Enterococcus faecium* qu'aux autres espèces de ce genre.



**Figure 19:** Arbre phylogénétique représente la relation entre la souche B319 et les autres espèces du genre *Enterococcus*

### Annotation du génome et génomique fonctionnelle

Le logiciel PGAP a prédit à partir du génome de *E. faecium* B319 un ensemble de 2461 CDS, 43 ARNt et 3 ARNr, un ensemble de 96 pseudogènes et 250 protéines hypothétiques.

### Annotation spécialisée

#### Gènes et mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'acquisition de mécanismes spécifiques de résistance à différents antibiotiques, en particulier pour l'espèce *E. faecium*, a rendu les infections par ces microorganismes difficiles à traiter (Kristich, Rice and Arias, 2014; Shiadeh et al., 2019) ; en 10 ans seulement, la résistance aux antibiotiques s'est répandue rapidement parmi les entérocoques et est devenue une préoccupation importante pour la santé publique (AARN, 2018; Shiadeh et al., 2019).

*E. faecium* B319 a exprimé une résistance accrue à divers antibiotiques testés par antibiogramme. La recherche de gènes de résistance aux antibiotiques chez *E. faecium* B319 a montré l'existence de plusieurs gènes exprimant la résistance à différents antibiotiques (tableau 14). Les gènes pris en considération étaient ceux ayant un pourcentage d'identification supérieur à 90% et une longueur de gène supérieure à 80%.

Nous avons pu identifier :

- 11 gènes de résistance aux antibiotiques, dont *aac(6)-Ii*, *eat(A)*, *tet(M)*, *msr(C)*, *vanZ-A*, *vanY-A*, *vanX-A*, *vanA*, *vanH-A*, *vanS-A* et *vanR-A*

Un ensemble de 13 mutations chromosomiques ponctuelles identifiées dans le gène *pbp 5* conférant une résistance à l'ampicilline.

**Tableau 14:** Gènes de résistance aux antibiotiques chez la souche *E. faecium* B319

Origine	Gène	Début	Fin	% Cov	% Id	Classe d'antibiotique	Produit
Contig 10	aac(6)-Ii	14078	14626	100	99.82	Aminoglycoside	aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6)-Ii
Contig 15	eat(A)	18321	19823	100	99.53	Pleuromutiline	ABC-F type ribosomal protection protein Eat(A)
Contig 35	tet(M)	8275	10194	100	100	Macrolide	tetracycline resistance ribosomal protection protein Tet(M)
Contig 3	msr(C)	27601	29079	100	98,99	Macrolide	ABC-F type ribosomal protection protein Msr(C)
Contig 36	vanZ-A	10548	11459	100	100	Vancomycine	glycopeptide resistance protein VanZ-A
Contig 36	vanY-A	11887	12495	100	99,9	Vancomycine	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase VanY-A
Contig 36	vanX-A	12501	13532	100	100	Vancomycine	D-Ala-D-Ala dipeptidase VanX-A
Contig 36	vanA	13525	14493	100	100	Vancomycine	D-alanine--(R)-lactate ligase VanA
Contig 36	vanH-A	14708	15862	100	100	Vancomycine	D-lactate dehydrogenase VanH-A
Contig 36	vanS-A	15840	16535	100	99,93	Vancomycine	VanA-type vancomycin resistance histidine kinase VanS
Contig 36	vanR-A	10548	11459	100	99,85	Vancomycine	VanA-type vancomycin resistance DNA-binding response regulator VanR

**%Cov** : pourcentage de couverture

**%Id** : pourcentage d'identification

### **Résistance aux macrolides, lincosamide, streptogramine (MLS) et quinolone**

Les antibiotiques macrolides, lincosamide, streptogramine (MLS) constituent une thérapie alternative pour le traitement des infections insidieuses à entérocoques. Trois mécanismes différents expliquent la résistance acquise aux antibiotiques MLS chez les bactéries à Gram-positif : la modification de la cible, l'inactivation de l'antibiotique et l'efflux actif de l'antibiotique. Dans le premier cas, une seule altération de l'ARNr 23S confère une large résistance croisée aux antibiotiques macrolide-lincosamide-streptogramine B (MLSB), alors que le mécanisme d'inactivation ne confère une résistance qu'aux antibiotiques MLS structurellement apparentés (Miller, et al., 2014).

Dans cette étude, la résistance au macrolide-lincosamide-streptogramine a été conférée par les gènes *msrC* qui est associé aux pompes impliquées dans l'efflux actif des antibiotiques à l'extérieur de la cellule (Ross et al., 1990; Miller, Munita and Arias, 2014; Mišić et al., 2017).

### **Résistance aux aminoglycosides**

Les entérocoques présentent une tolérance intrinsèque (qui se manifeste par l'absence d'activité bactéricide) aux aminoglycosides. Ce phénomène semble être médié par deux facteurs principaux : une mauvaise absorption de l'antibiotique nécessitant des concentrations plus élevées pour favoriser l'entrée dans l'espace intracellulaire et une inactivation par modification covalente des groupes hydroxyle ou amino de la molécule d'aminoglycoside effectuée par des enzymes entérocoques naturelles, créant un obstacle stérique et diminuant la liaison à la cible ribosomique (Miller, Munita and Arias, 2014). Dans la présente étude, la résistance aux aminoglycosides a été conférée par le gène *aac(6')-Ii*. En effet, *E. faecium*

possède une enzyme 6'-acétyltransférase (AAC(6')-II) codée par un gène chromosomique, capable de modifier la tobramycine, la sisomicine, la kanamycine et la nétilmicine (Costa et al., 1993; Perera et al., 2020).

### **Résistance aux tétracyclines**

Les tétracyclines exercent leur effet antibactérien en se liant au ribosome et en interférant avec l'arrimage de l'aminocyl-ARNt. Cela se produit par association avec plusieurs boucles de l'ARNr 16S et de la protéine ribosomale S7, mais il s'agit d'un processus réversible et ces agents sont bactériostatiques (Schnappinger & Hillen, 1996). La résistance est médiée par de multiples gènes, mais suit deux stratégies générales, l'efflux de l'antibiotique et la protection ribosomique.

Dans notre cas, le gène *tetM* confère selon plusieurs études à une résistance à la doxycycline et à la minocycline ainsi qu'à la tétracycline, oxytétracycline et sont souvent associés à la famille des transposons conjugatifs Tn916 et Tn1545 (Pepper et al., 1987; Bentorcha, De Cespédès and Horaud, 1991; Clewell, Flannagan and Jaworski, 1995; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2019). Selon Chopra & Roberts (2001) le gène *tetM* code pour une protéine ayant une homologie significative avec les facteurs d'élongation bactériens (EF) et, comme ces derniers, ils sont capables d'hydrolyser le GTP en présence du ribosome, ce qui modifie la conformation ribosomique et déplace la tétracycline liée.

### **Résistance aux glycopeptides**

Les glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) se lient à la partie terminale D-alanine-D-alanine (D-Ala-D-Ala) des précurseurs de peptidoglycanes, empêchant ainsi la réticulation des chaînes de peptidoglycanes et inhibant la synthèse de la paroi cellulaire (Faron, Ledebauer and Buchan, 2016). La résistance aux glycopeptides est due à la production de précurseurs de la paroi modifiés (terminés par D-alanyl-D-

lactate ou D-alanyl-D-sérine) et à l'élimination des précurseurs naturels de haute affinité (terminés par D-Ala-D-Ala) (Cattoir & Leclercq, 2010).

Le phénotype reconnu de résistance à la vancomycine, VanA est médié par des groupes de gènes nouvellement acquis qui n'avaient pas été trouvés auparavant chez les entérocoques. Ce phénotype de résistance VanA a été décrits principalement chez *E. faecium*. Les gènes de van A possèdent une résistance inductible de haut niveau à la vancomycine (Arthur and Courvalin, 1993). Le gène vanA et d'autres gènes impliqués dans la régulation et l'expression de la résistance à la vancomycine (vanR, vanS, vanH, vanX, vanY et vanZ) sont situés sur un transposon de 10581 pb (Tn1546) de *E. faecium*, qui réside souvent sur un plasmide (Arthur et al., 1993). L'expression de ces gènes entraîne la synthèse de précurseurs anormaux du peptidoglycane se terminant en d-Ala-d-lactate au lieu de d-Ala-d-Ala. La vancomycine se lie au d-Ala-d-Lac avec une affinité nettement plus faible qu'au produit dipeptidique normal (Courvalin, 2006).

### **Résistance aux Pleuromutilines et macrolides**

Les membres de la sous-famille des protéines ABC-F de la cassette de liaison à l'ATP comme eat(A) sont les médiateurs de la résistance à un large éventail de classes d'antibiotiques cliniquement importantes qui ciblent le ribosome des pathogènes Gram-positifs y compris les pleuromutilines et les macrolides. Le mécanisme par lequel ces protéines agissent est l'efflux d'antibiotiques et la protection des ribosomes (Wilson, 2016).

### **Mutations ponctuelles**

La résistance bactérienne acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible. Elle résulte de l'emploi thérapeutique des antibiotiques et elle est due soit à une mutation

chromosomique, soit à l'acquisition d'un ou de plusieurs gènes qui rendent la bactérie insensible à l'antibiotique.

La recherche de mutations génétiques à l'aide de ResFinder a révélé l'existence de mutations génétiques dans le gène *pbp5* exprimant la résistance à l'ampicilline (tableau 15), selon la littérature, tous les entérocoques produisent au moins cinq PBP, l'analyse génomique de *E. faecium* et *E. faecalis* dans plusieurs études a révélé six gènes *pbp* putatifs, dont trois sont de classe A comme *ponA* et trois de classe B comme les *pbp5* (Arbeloa et al., 2004; Duez et al., 2004; Rice et al., 2009). Les mécanismes de résistance consistent en une surproduction de PBP (comme le *pbp4* chez *E. faecalis* ou le *pbp5* chez *E. faecium*) ou en des mutations qui entraînent des changements d'acides aminés dans leur site actif, les plus courants étant les modifications du *pbp5*. Les changements de *pbp5* sont surtout détectés dans les souches d'*E. faecium* et confèrent un niveau élevé de résistance à l'ampicilline (Cattoir and Leclercq, 2012).

**Tableau 15 :** Modifications des acides aminés dans la séquence *pbp5* de la souche de *E. faecium* B319.

La mutation V24A comme exemple est une substitution de type transition du nucléotide T par le nucléotide C, cette substitution se reflète également dans la chaîne polypeptidique qui a entraîné la substitution de l'acide aminé valine en position 24 par une alanine.

Mutation	Changement de nucléotide	Changement de l'acide aminé
<i>pbp5</i> p.V24A	GTA -> GCA	Val -> Ala
<i>pbp5</i> p.S27G	AGT -> GGT	Ser -> Gly
<i>pbp5</i> p.R34Q	CGG -> CAG	Arg -> Gln
<i>pbp5</i> p.G66E	GGA -> GAA	Gly -> Glu
<i>pbp5</i> p.E100Q	GAG -> CAG	Glu -> Gln
<i>pbp5</i> p.K144Q	AAA -> CAA	Lys -> Gln
<i>pbp5</i> p.T172A	ACA -> GCA	Thr -> Ala
<i>pbp5</i> p.L177I	TTA -> ATA	Leu -> Ile
<i>pbp5</i> p.A216S	GCA -> TCC	Ala -> Ser
<i>pbp5</i> p.T324A	ACA -> GCA	Thr -> Ala
<i>pbp5</i> p.N496K	AAT -> AAA	Asn -> Lys
<i>pbp5</i> p.A499T	GCA -> ACA	Ala -> Thr
<i>pbp5</i> p.E525D	GAG -> GAT	Glu -> Asp

### Annotation des facteurs de virulences

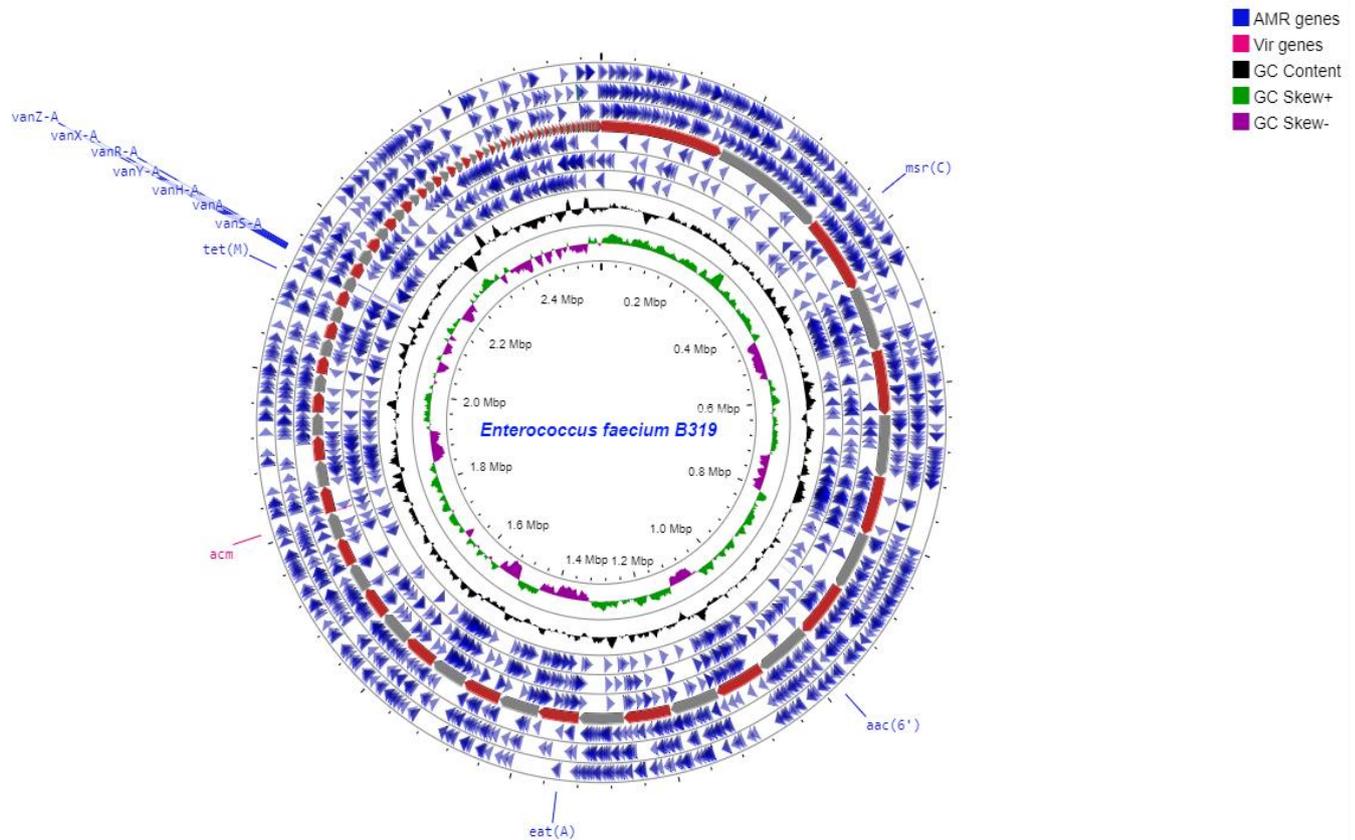
Les facteurs de virulence, ainsi que la résistance aux antibiotiques, ont été considérés comme des déterminants importants de la colonisation bactérienne, de l'établissement et de la persistance des entérocoques résistants en milieu hospitalier (Rathnayake, Hargreaves and Huygens, 2012). La présence de ces facteurs donne aux bactéries la possibilité de s'adapter aux écosystèmes et d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques. *E. faecium* est porteur de multiples facteurs de virulence, tels que l'adhésine liant au collagène (acm) (Werner et al., 2010) (tableau 16).

Il a été montré, que le gène acm intact peut coder pour une adhésine de collagène de type I et de type IV, qui s'est révélé important aussi dans la pathogenèse de l'endocardite (Nallapareddy, Weinstock and Murray, 2003; Arshadi et al., 2018).

**Tableau 16:** Liste des gènes de virulence présents dans *E. faecium* B319

Origine	Gène	Longueur	%Cov	%Id	Position
Contig 10	acm	1662 pb	86.1	99.46	81-1945

La figure ci-dessous représente la carte génomique circulaire de la souche B319 indiquant la position des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que la position du gène de virulence acm.



**Figure 20:** Carte génomique circulaire de la souche B319 indiquant la position des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence

### Annotation des prophages

Les bactériophages, virus qui infectent et se répliquent à l'intérieur des bactéries, ont été signalés comme ayant des effets à la fois bénéfiques et néfastes en ce qui concerne la gestion des maladies. Les bactériophages ont des impacts écologiques et évolutifs importants sur leurs hôtes bactériens. Ils ont été associés à l'utilisation thérapeutique pour tuer les pathogènes bactériens, mais peuvent conduire à la transmission de la résistance aux antibiotiques (Torres-Barceló, 2018), conséquence de l'excision ou de l'encapsidation imprécise du génome du phage qui permet l'incorporation de gènes de l'hôte par erreur. Ce mécanisme, appelé transduction, a été décrit en 1951 pour de nombreuses espèces bactériennes



région similaire aux bactériophages d'Enterococcus (PHAGE\_Enterolato\_NC\_001422) (Brede et al., 2011).

**Tableau 17:** Liste et position des prophages de *E. faecium* B319

Contig	Region Length	Completeness	Score	Total Proteins	Region Position	Most Common Phage
Contig2	42.6Kb	Intact	130	57	1497744-1540356	PHAGE_Lister_2389_NC_003291(14)
Contig8	6.8Kb	Intact	95	9	2513318-2520161	PHAGE_Enterolato_NC_001422(7)

### Annotation des éléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles bactériens (EGM), tels que les éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) et les plasmides conjugatifs, ont été mis en évidence comme étant d'importants vecteurs de diffusion de la pathogénèse et des déterminants de la résistance aux antimicrobiens. Les régions conjugatives des EGM auto transmissibles se composent généralement de quatre modules : origine du site de transfert (*oriT*), gène de la relaxase, gène codant pour la protéine de couplage de type IV (T4CP) et groupe de gènes pour le système de sécrétion bactérien de type IV (T4SS). La région *oriT*, généralement longue de dizaines voire de centaines de paires de bases, contient une région de coupure (*nic*) et des paires de répétitions inversées (IR) qui sont impliquées dans la localisation vers un site *nic* précis.

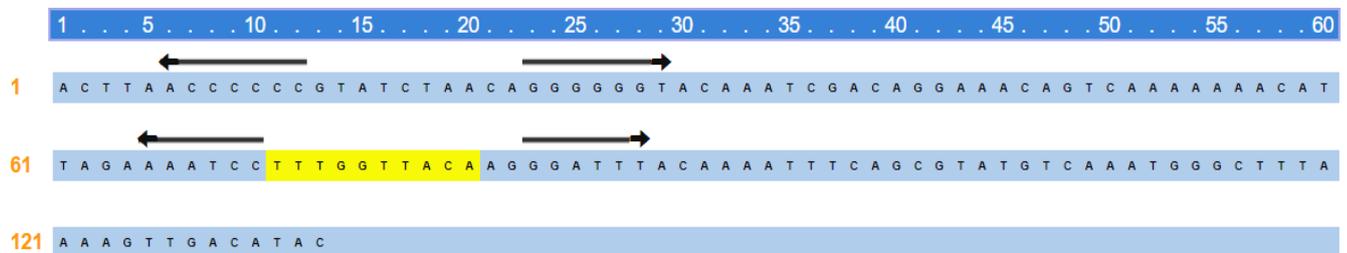
Les éléments portant un gène d'intégrase, un gène de relaxase et des groupes de gènes T4SS (Li et al., 2018) sont considérés comme des ICE, tandis que ceux sans T4SS mais avec intégrase et relaxase sont marqués comme des éléments mobiles intégratifs IME putatifs.

Ici, les résultats ont montré l'existence d'un EGM chez *E. faecium* B319, type ICE portant une séquence *oriT* avec d'une taille de 132 pb et une similarité de 100% avec la séquence *oriT* du transposon Tn916

(U09422.1) responsable de la transposition du gène de résistance tet(M) dans *Enterococcus faecalis* (Flannagan et al., 1994) (tableau 18), (figure 22), cet élément contient également une la protéine relaxase d'une longueur 401 avec 99,75% de similarité avec la relaxase du transposon conjugatif *Streptococcus pneumoniae* (CBW39386), T4CP de 461aa (Flannagan et al., 1994) et un groupe de 8 gènes T4SS.

**Tableau 18:** Composants de l'élément génétique mobile de *E. faecium* B319

<b>Location de oriT (nt)</b>	2071737-2126188
<b>Longueur de oriT (bp)</b>	54452
<b>IR (inverted repeat)</b>	6 bp: [2124206-2124211] [2124224-2124229] 7 bp: [2124147-2124153] [2124164-2124170]
<b>Région nick conservée</b>	2124212-2124221
<b>Emplacement de la Relaxase</b>	2122926-2124131
<b>T4CP</b>	2124309-2125694
<b>T4SS gene cluster</b>	2115029-2128592

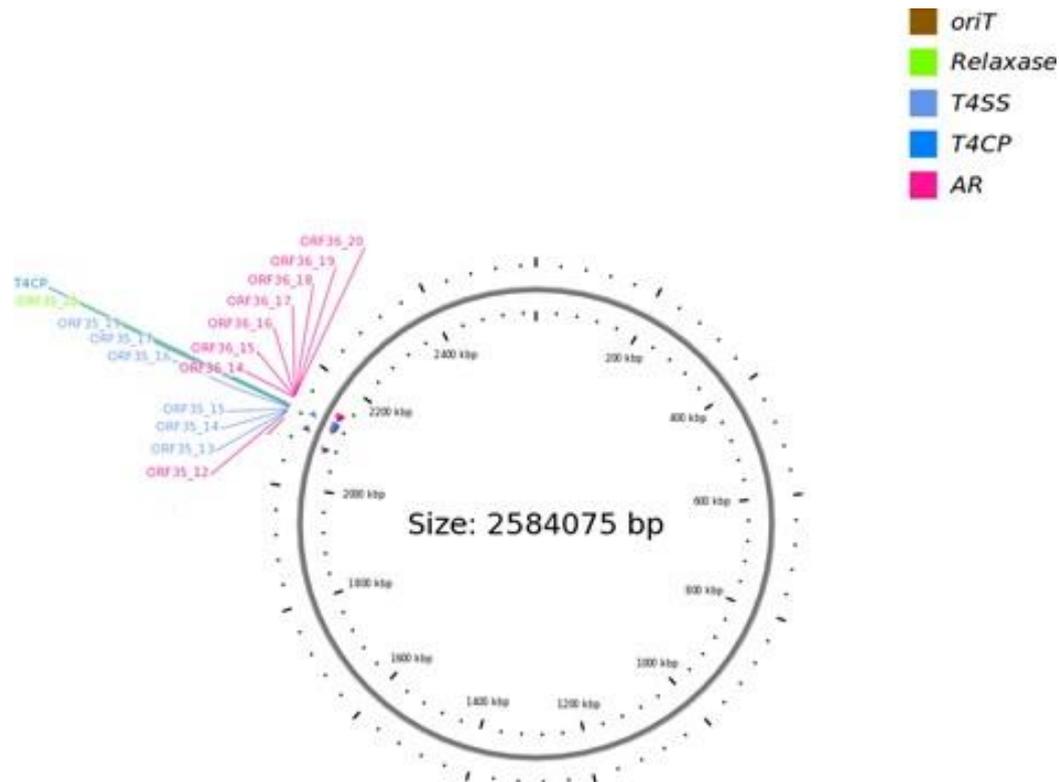


**Note:**

IR (Inverted repeat) ← → Conserved nick region

**Figure 22:** Visualisation de la structure prédite d'oriT

Cet élément génétique est un élément intégratif et conjugatif complet qui peut être responsable de l'acquisition non seulement du gène tet(M) du transposon tn916 mais aussi des sept autres gènes codant pour la résistance à la vancomycine (Figure 23).



**Figure 23:** Visualisation de la localisation de l'élément génétique mobile dans le génome de *E. faecium* B319 et des ORF des gènes de résistance

Ces résultats montrent que la souche B319 d'*E. faecium* a une grande capacité à acquérir des éléments génétiques mobiles provenant d'autres espèces et qu'elle peut effectivement servir de réservoir de gènes de résistance transmissibles à d'autres bactéries pathogènes par l'intermédiaire des EGM, comme l'ont montré plusieurs travaux. (Garnier et al. (2000), Périchon & Courvalin, (2009), Walters et al. (2015) et Semedo-Lemsaddek et al. (2018).

# **V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

---

## Conclusion

Le genre *Enterococcus* est l'un des groupes les plus diversifiés et les plus importants du point de vue écologique, et les membres de ce genre sont distribués de manière ubiquitaire dans la nature. De nombreuses études menées au cours de la dernière décennie ont validé l'innocuité des entérocoques dans les aliments et comme probiotiques. La diversité et la plasticité génomique d'*E. faecium* sont responsables de sa nature à la fois pathogène et probiotique.

Dans ce travail, nous avons étudié l'aspect morphologique, physiologique et biochimique de la souche B319, ce qui nous a permis de la classer comme entérocoque. Les résultats de l'antibiogramme ont montré une résistance accrue de cette souche à la plupart des antibiotiques tels que la céfoxitine, le ceftazidime, le céfépime, l'amoxicilline et l'acide clavulanique, l'oxacilline, la céfazoline, la gentamycine, l'amikacine, l'érythromycine et la fosfomycine, ainsi qu'une résistance intermédiaire à la lévofloxacine et Linizolide. En revanche, une sensibilité a été détectée au chloramphénicol. L'analyse génomique de la souche B319 a montré que son génome est composé de 93 contigs formant une taille de 2,5 Mb ; l'annotation du génome a révélé qu'il est composé de 2461 CDS, 43 ARNt et 3 ARNr, un ensemble de 96 pseudogènes et 250 protéines hypothétiques. Parmi ces gènes, 11 gènes de résistance aux antibiotiques (*aac(6')-II*, *eat(A)*, *tet(M)*, *msr(C)*, *vanZ-A*, *vanY-A*, *vanX-A*, *vanA*, *vanH-A*, *vanS-A*, et *vanR-A*) et un gène de virulence (*acm*), 2 prophages tempérés, et 1 élément génétique mobile. La recherche de mutations génétiques a montré un ensemble de 13 mutations ponctuelles identifiées dans le gène *pbp 5* conférant une résistance à l'ampicilline.

La souche B319 peut être qualifiée de VRE (Vancomycin Resistant Enterococci) notamment après l'acquisition de gènes de résistance conférant une résistance à la classe des glycopeptides (vancomycine et

teicoplanine). Ces gènes de résistance sont localisés sur des séquences d'ADN transposables, qui est Tn916, ce qui leur permet d'être éventuellement transférés à d'autres bactéries Gram positif, notamment les staphylocoques. La pathogénicité de ce VRE semble être faible mais il présente un risque élevé de servir de grand réservoir de gènes transmissibles à d'autres bactéries partageant le même écosystème.

# **VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## Références

AARN (2018) 'Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques', *18ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2017)*.

Aguilar Galvez, A.C., Dubois Dauphin, R., Destain, J., Campos, D. and Thonart, P. (2012) 'Les entérocoques: avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique)', *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. 16, no. 1.

Allem, R., Boutemine, A. and Khenouchi, N.C.E.H. (2020) *Etude de la sensibilité aux antibiotique des bacilles à Gram négatif non fermentante*.

Andrewes, F. (1906) 'A study of the streptococci pathogenic for man', *The Lancet*, vol. 168, no. 4334, pp. 775-783.

Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J.E., Josseume, N., Dubost, L., Brouard, J.P. and Arthur, M. (2004) 'Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated  $\beta$ -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*', *Journal of bacteriology*, vol. 186, no. 5, pp. 1221-1228.

Arias, C.A. and Murray, B.E. (2012) 'The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 4, pp. 266-278.

Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y. and Wishart, D.S. (2016) 'PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool', *Nucleic acids research*, vol. 44, no. W1, pp. W16-W21.

Arshadi, M., Mahmoudi, M., Motahar, M.S., Soltani, S. and Pourmand, M.R. (2018) 'Virulence determinants and antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from different sources in southwest Iran', *Iranian journal of public health*, vol. 47, no. 2, p. 264.

Arthur, M. and Courvalin, P. (1993) 'Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 37, no. 8, pp. 1563-1571.

Arthur, M.I.C.H.E.L., Molinas, C., Depardieu, F. and Courvalin, P. (1993) 'Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147', *Journal of bacteriology*, vol. 175, no. 1, pp. 117-127.

Assel, B., Dhib, S. and Zouaoui, B. (2021) 'La résistance bactérienne aux antibiotiques: État et causes possibles de la contamination'.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. and Ouzrout, R. (2005) 'Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales" arabia et kabyle', *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, pp. 30-37.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. and Pevzner, P.A. (2012) 'SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing', *Journal of Computational Biology*, vol. 19, no. 5, pp. 455-477.

Benabbou, T.A., Karam, H.Z. and Karam, N.E. (2019) 'Effect oral administration ampicillin on the ecological balance of rat enterococcal gut microbiota', *Current microbiology*, vol. 76, no. 3, pp. 329-337.

Bentorcha, F., De Cespédès, G. and Horaud, T. (1991) 'Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 35, no. 5, pp. 808-812.

Bohoua, G.L. (2008) 'Effect of palm wine yeasts and yogurt probiotics on the growth performance of broilers', *Livestock Research for Rural Development*, vol. 20, no. 3, pp. 7-8.

Brede, D.A., Snipen, L.G., Ussery, D.W., Nederbragt, A.J. and Nes, I.F. (2011) 'Complete Genome Sequence of the Commensal *Enterococcus faecalis* 62, Isolated from a Healthy Norwegian Infant', *J. Bacteriol*, vol. 193, no. 9, pp. 2377-2378.

Cattoir, V. and Leclercq, R. (2012) 'Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? ', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, no. 4, pp. 731-742.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Zarzecka, U., Zakrzewski, A. and Gajewska, J. (2019) 'Enterococci from ready-to-eat food—horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes and genotypic characterization by PCR melting profile', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 99, no. 3, pp. 1172-1179.

Chelkia, H. and Gueriani, A. (2019) *antibiotiques : impact du pH et de la salinité*, Mémoire de Master en Microbiologie appliquée.

Chenouf, A., Khirani, A., Yabrir, B., Hakem, A., Lahrech, B.M., Houali, K. and Chenouf, N. (2014) 'Risque dû à la consommation des boissons rafraichissantes sans alcool édulcorées', *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, vol. 10, no. 4, pp. 70-77.

Chopra, I. and Roberts, M. (2001) 'Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol*', *Mol. Biol. Rev*, vol. 65, no. 2, pp. 232-260.

Clewell, D.B., Flannagan, S.E. and Jaworski, D.D. (1995) 'Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916–Tn1545 family of conjugative transposons', *Trends in microbiology*, vol. 3, no. 6, pp. 229-236.

CLSI (2012) 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing', Clinical and Laboratory Standards Institute. 26th Edition, M100S, Wayne, USA.

Costa, Y., Galimand, M., Leclercq, R., Duval, J. and Courvalin, P. (1993) 'Characterization of the chromosomal aac (6)-Ii gene specific for *Enterococcus faecium*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 37, no. 9, pp. 1896-1903.

Courvalin, P. (2006) 'Vancomycin resistance in gram-positive cocci', *Clinical infectious diseases*, vol. 42, no. (Supplement\_1), pp. S25-S34.

Devriese, L.A., Pot, B., Van-Damme, L., Kersters, K. and Haesebrouck, F. (1995) 'Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin', *Int. J. Food*, vol. 26, no. 2, pp. 187-197.

Di Cesare, A., Pasquaroli, S., Vignaroli, C., Paroncini, P., Luna, G.M., Manso, E. and Biavasco, F. (2014) 'The marine environment as a reservoir of enterococci carrying resistance and virulence genes strongly associated with clinical strains. ', *Environmental microbiology reports*, vol. 6, no. 2, pp. 184-190.

Djimli, W., Bouachir, M. and Benaziza, F. (2019) 'Etude Physico-chimique Et Microbiologique Du Produit Laitier Traditionnel « Zebda »', *Mémoire de Master, Biochimie et Microbiologie*, pp. Université Mohamed Seddik Ben Yahia-Jijel.

Djimli, W., Bouachir, M. and Benaziza, F. (2019) 'Etude physico-chimique et microbiologique du produit laitier traditionnel «Zebda»', *Doctoral dissertation, Université de Jijel*.

Duez, C., Hallut, S., Rhazi, N., Hubert, S., Amoroso, A., Bouillenne, F. and Coyette, J. (2004) 'The ponA gene of *Enterococcus faecalis* JH2-2 codes for a low-affinity class A penicillin-binding protein', *Journal of bacteriology*, vol. 186, no. 13, pp. 4412-4416.

Faron, M.L., Ledebøer, N.A. and Buchan, B.W. (2016) 'Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting', *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, no. 10, pp. 2436-2447.

Flannagan, S.E., Zitzow, L.A., Su, Y.A. and Clewell, D.B. (1994) 'Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis*', *Plasmid*, vol. 32, no. 3, pp. 350-354.

Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. and Gálvez, A. (2011) 'Enterococci as probiotics and their implications in food safety', *International journal of food microbiology*, vol. 151, no. 2, Mar, pp. 125-140.

Galardini, M., Biondi, E.G., Bazzicalupo, M. and Mengoni, A. (2011) 'CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes', *Source code for biology and medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 1-5.

Garnier, F., Taourit, S., Glaser, P., Courvalin, P. and Galimand, M. (2000) 'Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp', *Microbiology*, vol. 146, no. 6, pp. 1481-1489.

Geldart, K. and Kaznessis, Y.N. (2017) 'Characterization of class IIa bacteriocin resistance in *Enterococcus faecium*.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 16, no. 4.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. and Tesler, G. (2013) 'QUAST: quality assessment tool for genome assemblies', *Bioinformatics*, vol. 19, no. 8, pp. 1072-1075.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. and Hammami, R. (1971) 'The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update', *Frontiers in microbiology*, vol. 1791, Sep, p. 9.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. and Hammami, R. (2018) 'The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an

update', *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 1791, Available: <https://www.who.int/fr/news/item/> [27 Feb 2018].

Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F. and Bouhadi, D. (2009) 'Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube', *Rev. microbiol. ind. san et environ*, pp. 37-55.

Hashim, H.F.B. (2016) 'Identification of genes involved in acid tolerance, antimicrobial resistance and virulence of *Enterococcus faecium*', *University College London*.

Holzapfel, W., Arini, A., Aeschbacher, M., Coppolecchia, R. and Pot, B.2018( .) 'Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics', *Beneficial microbes*, vol. 9, no. 3, pp. 375-388.

Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E. and Karam, N.E. (2009) 'actic acid bacteria from" Sheep's Dhan", a traditional butter: Isolation, identification and major technological traits', *Grasas y aceites*, vol. 60, no. 2, pp. 177-183.

Isnard, C. (2017) 'Enterococcus spp.: entre pathogènes opportunistes et probiotiques', *Thèse de doctorat*, p. Normandie.

Kalogridou-Vassiliadou, D., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and al, e. (1994) 'Microbiological and physicochemical characteristics of'Anthotyro', a Greek traditional whey cheese', *Food microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 15-19.

Kandler, O.&.W.N. (1986) 'Genus Lactobacillus In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors', *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Kovács, L.G., Balatti, P.A., Krishnan, H.B. and Pueppke, S.G. (1995) 'Transcriptional organization and expression of noIXWBTUV, a locus that

regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257', *Molecular microbiology*, vol. 17, no. 5, pp. 923-933.

Kramer, A., Schwebke, I. and Kampf, G. (2006) 'How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces', *A systematic review*, vol. 6, no. 1, pp. 1-18.

Kristich, C.J., Rice, L.B. and Arias, C.A. (2014) 'Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. In Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection', *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*.

Leendertse, M.e.a. (2009) 'Neutrophils are essential for rapid clearance of *Enterococcus faecium* in mice', *Infection and immunity*, pp. 485-491.

Liu, M., Li, X., Xie, Y., Bi, D., Sun, J., Li, J. and Ou, H.Y. (2019) 'ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements', *Nucleic acids research*, vol. 47, no. D1, pp. D660-D665.

Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z. and Ou, H.Y. (2018) 'oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements', *Nucleic acids research*, vol. 46, no. W1, pp. W229-W234.

Madigan, M. and Martinko, J. (2007) *Biologie des micro-organismes*, 11<sup>th</sup> edition.

Marciňáková, M., Simonová, M. and Lauková, A. (2004) 'Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage', *Acta Veterinaria Brno*, vol. 73, no. 4, pp. 513-519.

Miller, W.R., Munita, J.M. and Arias, C.A. (2014) 'Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci', *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 12, no. 10, pp. 1221-1236.

Mišić, M., Čukić, J., Vidanović, D., Šekler, M., Matic, S., Vukašinović, M. and Baskić, D. (2017) 'Prevalence of genotypes that determine resistance of staphylococci to macrolides and lincosamides in Serbia', *Frontiers in public health*, vol. 5, p. 200.

Moussouni, M. (2020) 'Facteurs bactériens impliqués dans la survie intramacrophagique de *Pseudomonas aeruginosa* et recherche d'inhibiteurs spécifiques: du modèle expérimental cellulaire au modèle vertébré *Danio rerio*. Diss', *Doctoral dissertation, Université Montpellier*.

Nallapareddy, S.R., Weinstock, G.M. and Murray, B.E. (2003) 'Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family', *Molecular microbiology*, vol. 47, no. 6, pp. 1733-1747.

Natarajan, P. and Parani., M. (2015) 'First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes', *J Genet Genomics*, vol. 42, no. 1, pp. 43-46.

Okrani, S. and Hamdani, S. (2017) *Evaluation de la consommation des antibiotiques au service de Réanimation Médicale du CHU de Tizi-Ouzou..*

Paulsen, I.T., Banerjee, L., Myers, G.S.A., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D. and Fraser, C.M. (2003) 'Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*', *Science*, vol. 299, no. 5615, pp. 2071-2074.

Pepper, K., Horaud, T., Le Bouguéneq, C. and Cespédès, G. (1987) 'Location of antibiotic resistance markers in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* with similar antibiotypes', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 32, no. 9, pp. 1394-1402.

Perera, L.N., Mafiz, A.I., Amarasekara, N.R., Chang, E., Rao, V.B.K. and Zhang, Y. (2020) 'Antimicrobial-resistant *E. coli* and *Enterococcus* spp.

Recovered from urban community gardens', *Food Control*, vol. 108, p. 106857.

Périchon, B. and Courvalin, P. (2009) 'VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 53, no. 11, pp. 4580-4587.

Rania, B.E.N.S.E.G.H.I.R. and Wided, K.D.Y.A. (2020) *Fréquence et résistance aux antibiotiques des bactéries responsables d'infections urinaires*, Doctoral dissertation.

Rathnayake, I.U., Hargreaves, M. and Huygens, F. (2012) 'Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates', *Systematic and applied microbiology*, vol. 35, no. 5, pp. 326-333.

Rice, L.B., Laktičova, V., Carias, L.L., Rudin, S., Hutton, R. and Marshall, S.H. (2009) 'Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model', *The Journal of infectious diseases*, vol. 199, no. 3, pp. 342-349.

Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S. and Wootton, J.C. (1990) 'Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family', *Molecular microbiology*, vol. 4, no. 7, pp. 1207-121.

Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D.E. and Kihal, M. (2002) 'Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides', *J. Alg. Reg. Arides*, vol. 1, pp. 01-11.

Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. (1984) 'Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to m comb. nov', *International Journal of Systematic and E*, vol. 34, no. 1, Nov, pp. 31-34.

Semedo-Lemsaddek, T., Pedroso, N.M., Freire, D., Nunes, T., Tavares, L., Verdade, L.M. and Oliveira, M. (2018) 'Otter fecal enterococci as general indicators of antimicrobial resistance dissemination in aquatic environments', *Ecological Indicators*, vol. 85, pp. 1113-1120.

Shiadeh, S.M.J., Pormohammad, A., Hashemi, A. and Lak, P. (2019) 'Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis', *Infection and Drug Resistance*, vol. 12, p. 2713.

Stothard, P. and Wishart, D.S. (2005) 'Circular genome visualization and exploration using CGView', *Bioinformatics*, vol. 21, no. 4, pp. 537-539.

Sweet, R.L. and S., R. (2009) 'Infectious diseases of the female genital tract. ', *Lippincott Williams & Wilkins*.

Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L. and Ostell, J. (2016) 'NCBI prokaryotic genome annotation pipeline', *Nucleic acids research*, vol. 44, no. 14, pp. 6614-6624.

Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B. and Dicks, L.M.T. (2008) 'Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria', *Journal of Applied Microbiology*, vol. 104, no. 2, pp. 465-477.

Torres-Barceló, C. (2018) 'The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria', *Emerging microbes & infections*, vol. 7, no. 1, pp. 1-12.

Van Tyne, D. and Gilmore, M.S. (2014) 'Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance', *Annual review of microbiology*, vol. 68, no. 56, Mar, p. 37.

Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S. and Earl, A.M. (2014) 'Pilon: an integrated tool for

comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement', *PloS one*, vol. 9, no. 11, p. e112963.

Walters, M.S., Eggers, P., Albrecht, V., Travis, T., Lonsway, D., Hovan, G., Taylor, D., Rasheed, K., Limbago, B. and Kallen, A. (2015)'Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, vol. 64, no. 37, p. 1056.

Werner, G., Fleige, C., Ewert, B., Laverde-Gomez, J.A., Klare, I. and Witte, W. (2010) 'High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17)', *International journal of antimicrobial agents*, vol. 35, no. 2, pp. 119-125.

Wheeler, A.L., Hartel, P.G., Godfrey, D.G., Hill, J.L. and Segars, W.I. . 2002() 'Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking', *Journal of environmental quality*, vol. 31, no. 4, pp. 1286-1293.

Willems, R.J. and Schaik., W.V. (2009) 'Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen.', *Future microbiology 4.9 (2009): 1125-1135.*, vol. 4, no. 9, pp. 1125-1135.

Wilson, D.N. (2016) 'The ABC of ribosome-related antibiotic resistance', *MBio*, vol. 7, no. 3, pp. e00598-16.

Yousfi, S. (2020) 'Enquete sur les enterocoques (*E.Faecium* et *E.Faecalis*) et l'etude de leur resistance aux antibiotique dans la region de Tezi Ouzou', *Thèse de doctorat, Spécialité : Epidémiologie appliquée à la santé animale*, p. Université de Blida1.

Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X. and Sun, Z. (2017) 'Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*', *Microbiological research*, vol. 196, pp. 95-105.

Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J. and Wishart, D.S. (2011) 'PHAST: A Fast Phage Search Tool', *Nucleic Acids Research*, vol. 39, no. 1, 2, pp. W347-W352.

Zimmer, M., Sattelberger, E., Inman, R.B., Calendar, R. and Loessner, M.J. (2003) 'Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed+ 1 translational frameshifting in structural protein synthesis', *Molecular microbiology*, vol. 50, no. 1, pp. 303-317.

Zinder, N.D. and Lederberg, J. (1952) 'Genetic exchange in *Salmonella*', *Journal of bacteriology*, vol. 64, no. 5, p. 679.

# **Annexe**

ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture (pour 1L d'eau distillé) et produits chimiques

**Milieux de culture**

Milieux MRS(Gélose de Man, Rogosa, Sharpe)

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau purifiée

Peptone	10,00	Acétate de sodium	5,00
Extrait de viande	10,00	Sulfate de magnésium	0,10
Extrait de levure	5,00	Sulfate de manganèse	0,05
Glucose	20,00	Phosphate disodique	2,00
Polysorbate 80	1,00	Agar	15,00
Citrate d'ammonium	2,00		

**PREPARATION**

Pour le milieu déshydraté :

1. Mettre en suspension 70 grammes dans 1 litre d'eau purifiée. Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute.
2. Répartir en tubes ou flacons.
3. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Pour le milieu en flacons

1. Liquéfier le milieu à 100°C au bain-marie.
2. Bien mélanger, laisser refroidir à 45-47°C.
3. Répartir immédiatement en boîtes de Petri et laisser solidifier sur une surface froide.

Bouillon MRS

Peptone.....	10 g
Extrait de viande .....	10 g
Extrait de levure .....	5 g
Glucose .....	20 g
Tween 80.....	1 mL
Phosphate dipotassique .....	2 g
Acétate de sodium .....	5 g
Citrate triammonique .....	0,2 g
Sulfate de magnésium .....	0,05 g
Saccharose.....	5 g
Eau distillée qsp .....	1000 mL

Composition du lait de Sherman 1% :

Composants	Valeurs
de lait écrémé stérile en tubes.	9ml
de bleu de méthylène à 1 % stérilisé 20 minutes à 120 °C.	1 ml

## ANNEXE 2 : Coloration de Gram

Réalisation d'un frottis :

- ✓ Un prélèvement d'une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame.
- ✓ Un étalement de la suspension bactérienne avec l'anse de platine sur la lame de façon à obtenir un étalement mince de 1 à 2cm.
- ✓ Un séchage et une fixation en portant la lame au dessus de la flamme du bec bunsen (la lame est tenue par avec la pince en bois).

La coloration de Gram se réalise en suivant les étapes ci-dessous.

- Déposer 1 à 2 gouttes de violet de gentiane sur le frottis préparé, laisser agir 30s à 1mn.
- Appliquer le Lugol qui est un fixateur, laisser agir 20s.
- Décolorer rapidement en versant l'alcool éthylique goutte à goutte sur la lame inclinée.
- Rincer avec l'eau distillée.
- Recolorer en appliquant la fuschine, laissé agir 30 à 1mn.
- Rincer et sécher en utilisant le papier absorbant.
- Observer au microscope à l'objectif à immersion (GX 100) (déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis coloré).

ANNEXE 3: Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés et interprétés selon les indications du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CACFM 2012)

Antibiotiques	Charge du disque	Diamètre critiques (mm)	
		S	R
Cefoxitine	30	$\geq 18$	$< 12$
Ceftazidime	30	$\geq 19$	$< 19$
Cefepime	30	$\geq 19$	$< 19$
Amoxiciline	30		
Clavulanic acid	30		
Oxacilline	1	$\geq 20$	$< 20$
Céfazoline	30	$\geq 18$	$< 12$
Gentamicine	10	$\geq 18$	$< 16$
Amikacine	30	$\geq 17$	$< 15$
Erythromycine	15	$\geq 26$	$< 24$
Chloramphénicol	30	$\geq 23$	$< 23$
Levofloxacin	5	$\geq 20$	$< 17$
Fosfomycine	50	$\geq 14$	$< 14$
Linizolide	30	$\geq 24$	$< 24$