

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار-عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

En sciences

Option : Microbiologie

THEME

Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux antibiotiques
des souches du genre *Enterococcus* d'origine clinique

Directeur de thèse: Mme BOUTEFNOUCHET Nafissa Professeur, Université Badji- Mokhtar - Annaba

Présentée par : BOURAFI Nadjet

Membres de Jury:

Président	Mme CHETTIBI Houria	Professeur	Université d'Annaba
Examineurs	Mme GRARA Nadjoud	Professeur	Université de Guelma
	M MERAD Tarek	Maître de Conférences A	Université d'Annaba
	M MECHAI Abdelbasset	Maître de Conférences A	Université de Tébessa
	Mme MERADI Laarem	Maître de Conférences A	Université d'Oum El Bouaghi

N° DBCH...../2018

Année universitaire 2017 / 2018.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont d'abord au bon Dieu qui m'a aidé et m'a donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à mon encadreur madame le Professeur Nafissa BOUTEFNOUCHET de m'avoir confié ce sujet de thèse, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa disponibilité, son écoute attentive et pour sa rigueur scientifique au quotidien durant ces années.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Jean Marc ROLAIN et le Professeur Abdallah BENACHOUR, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et m'avoir permis d'y réaliser la partie pratique de ma thèse, pour leurs précieux conseils techniques et scientifiques et leurs grandes disponibilités.

Mes vifs remerciements et mon profond respect vont à madame le Professeur Houria CHETTIBI d'avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce travail.

Je tiens également à remercier vivement les membres examinateurs : Mme GRARA Nedjoud, M MERAD Tarek, M MECHAI Abdelbasset et Mme MERADI Lilia qui m'ont honoré en acceptant d'examiner et juger ce travail

J'adresse également mes remerciements à mes amis le Docteur Lotfi LOUCIF, Mme Narjess CHERAITI et Mme Esma Bendjama, pour leurs encouragements, leurs aides techniques et scientifiques et leur soutien.

Je remercie également toute personne ayant participé, de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Partie I: Revue bibliographique	
1. Taxonomie et description du genre <i>Enterococcus</i>	5
2. Ecologie du genre <i>Enterococcus</i>	6
3. Etude bactériologique du genre <i>Enterococcus</i>	6
4. Facteurs de pathogénicité	8
4-1. Facteurs liés à la membrane	8
4-2. Facteurs sécrétés	10
5. Implications cliniques des entérocoques	10
6. Typage moléculaire des entérocoques	12
7. Résistance des entérocoques aux antibiotiques	14
7-1. Mode d'action des antibiotiques	14
7-1-1. Mode d'action des β -lactamines	14
7-1-2. Mode d'action des aminoglycosides	15
7-1-3. Mode d'action des glycopeptides	15
7-1-4. Mode d'action des Macrolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS)	15
7-1-5. Mode d'action des quinolones	16
7-1-6. Mode d'action des tétracyclines	16
7-2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	16
7-2-1. Mécanismes de résistance aux β -lactamines	16
7-2-2. Mécanismes de résistance aux aminoglycosides	18
7-2-3. Mécanismes de résistance aux glycopeptides	20
7-2-4. Mécanismes de résistance aux macrolides, lincosamides, streptogramines B	23
7-2-5. Mécanismes de résistance aux quinolones	24
7-2-6. Mécanismes de résistance aux tétracyclines	25
8. Épidémiologie	25

Partie II : Matériel et méthodes

1. Cadre d'étude	33
2. Souches bactériennes étudiées.....	34
3. Identification du genre <i>Enterococcus</i>	34
3-1. Isolement sur milieux sélectifs.....	34
3-1-1. Culture sur bile esculine azide (BEA)	34
3-1-2. Culture dans le bouillon hypertonique (6,5% de NaCl)	35
4. Identification des espèces de genre <i>Enterococcus</i>	35
4-1. Identification par la galerie API 20 Strep	36
4-2. Identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF	36
5. Tests de sensibilité aux antibiotiques	39
5-1. Méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton.....	39
5-2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par E-test.....	40
6. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques.....	41
6-1. PCR standard.	42
6-1-1. Extraction de l'ADN bactérien	42
6-1-2. Amplification par PCR	43
6-2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	46
6-3. Séquençage	47
7. Génomage par MLST « <i>Multi-locus sequence typing</i> »	50
7-1. Génomage d' <i>E. faecalis</i>	51
7-2. Génomage d' <i>E. faecium</i>	52
8. Analyse clonale et identification des complexes clonaux	53
9. Analyses statistiques.....	53

Partie III: Résultats et discussion

Résultats

1. Données des souches d'entérocoques isolées	55
2. Identification des souches.....	58
2-1. Tests microbiologiques standards.....	58
2-2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	59
3- Répartition des souches selon la nature de prélèvement	62
4. Répartition des espèces selon la nature de prélèvement.....	62
5- Répartition des souches selon le type de patient	63
6. Répartition des infections à entérocoques en fonction de l'âge et du sexe de patient....	64

7. Répartition des souches selon les services hospitaliers.....	65
8. Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques.....	66
8-1. Profil de résistance aux antibiotiques	66
8-2. Profil de résistance en fonction des espèces	67
8-3. Répartition des profils de résistance en fonction des types de patients.....	69
9. Identification moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques	70
9-1. Profil moléculaire des gènes de résistance identifiés	70
9-2. Répartition des gènes de résistance en fonction des espèces.....	78
9-3. Répartition des gènes de résistance en fonction des types de patients.....	79
10. Profil de co-résistance moléculaire.....	80
11. Typage Moléculaire par MLST	82
11-1. Génotypage d' <i>E. faecalis</i>	82
11-2. Génotypage d' <i>E. faecium</i>	84
12. Distribution des gènes de résistance identifiés en fonction des lignées hospitalières à haut risque et le type de patient	86
13. Structure <i>clonale</i> et analyse phylogénétique.....	88
13-1. Structure <i>clonale</i> et analyse phylogénétique des souches d' <i>E. faecalis</i>	89
13-2. Structure <i>clonale</i> et analyse phylogénétique des souches d' <i>E. faecium</i>	90
14. Répartition des souches selon les complexes clonaux identifiés.....	92
15. Répartition des complexes clonaux épidémiques en fonction des types de patients....	93
16. Relation entre le CC2 et les gènes de résistance identifiés.....	93
Discussion	96
Partie IV: Conclusion et perspectives	114
Références bibliographiques	118
Résumé	128
Annexes	132

Liste des abréviations

- **API 20 Strep:** Analytical profile index 20 Streptocoques
- **ARG-ANNOT:** Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation
- **ARNr:** Acide ribonucléique ribosomique
- **ATP:** Adénosine triphosphate
- **BEA :** Bile esculine azide
- **BLAST N:** Basic Local Alignment tool Nucléotide
- **BLAST:** Basic Local Alignment tool
- **CA-SFM :** Comité d'antibiogramme- société française de microbiologie.
- **CC:** Complexe clonal.
- **CMB :** Concentration bactéricide minimale
- **CMI :** Concentration minimale inhibitrice
- **DA :** Dalton
- **D.O :** Densité optique
- **ddNTP :** Didésoxyribonucléotide.
- **dNTP :** Désoxyribonucléotide.
- **EDS :** Eau distillée stérile
- **EDTA :** Éthylène Diamine Tétra-Acétique.
- **ERV :** Entérocoques résistants à la vancomycine
- **GI :** Gastro-intestinales
- **HC :** hautement chargé
- **H₂O UP :** Eau Ultra-Pure
- **HNRA :** Haut niveau de résistance aux aminoglycosides
- **HPLC :** Chromatographie en phase liquide à haute performance
- **Kb:** Kilobases
- **M:** Marqueur
- **MALDI-TOF:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry
- **MH:** Mueller Hinton
- **MLST:** Multi-locus sequence type
- **MSP:** Mean spectra projection
- **NCBI:** Genome database of the National Center for Biotechnology Information
- **NST :** Nouveaux ST

- **Pb:** Paire de bases
- **PCR:** Polymerase chain reaction
- **PFGE:** Pulsed Field Electrophoresis Gel
- **pH:** Potentiel hydrogène
- **PLPs :** Protéines de liaison à la pénicilline
- **PSM:** Poste de Sécurité Microbiologique
- **qnr:** Quinolone resistance gene
- **Rpm :** Rotation par minute
- **ST :** Séquence type
- **SARM :** *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline
- **TBE:** Tris-Borat-EDTA
- **TFA:** Acide TriFluorocétique
- **TRIS :** Trishydroxyméthylaminométhane.
- **UI :** Unité Internationale et 1 UI = 0,3 micro-gramme
- **UV:** Ultra-violet

Liste des figures

Figure 01	Aspect macroscopique des colonies sur gélose cœur cerveau	58
Figure 02	Aspect macroscopique des colonies sur gélose bile-esculine-azide	59
Figure 03	MSP Dendrogramme des souches d' <i>Enterococcus</i> spp. identifiées par Maldi TOF-MS	61
Figure 04	Répartition des souches selon la nature de prélèvement	62
Figure 05	Répartition des souches selon le type de patient	63
Figure 06	Répartition des infections à entérocoques en fonction de l'âge	64
Figure 07	Répartition des infections à entérocoques en fonction du sexe	65
Figure 08	Répartition des souches selon les services hospitaliers	65
Figure 09	Profil de résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques	66
Figure 10	Répartition des profils de résistance en fonction des types de patients	69
Figure 11	Profil moléculaire des gènes de résistance identifiés	70
Figure 12	Gels d'agaroses des produits de PCR du gène blaZ	71
Figure 13	Gels d'agaroses des produits de PCR du gène HNRA	72
Figure 14	Gels d'agaroses des produits de PCR du gène tetM	74
Figure 15	Gels d'agaroses des produits de PCR du gène ermB	76
Figure 16	Gel d'agarose des produits de PCR du gène cat	77
Figure 17	Gel d'agarose des produits de PCR des gènes vanC	77
Figure 18	Répartition des gènes de résistance en fonction des types de patients	79
Figure 19	Détection d'une mutation dans le gène de ménage <i>gyd</i> d' <i>E. faecalis</i>	83
Figure 20	Détection d'une mutation dans le gène de ménage <i>purk</i> d' <i>E. faecium</i>	85
Figure 21	Structure <i>clonale</i> des souches d' <i>E. faecalis</i> par l'utilisation du logiciel eBURST	89
Figure 22	MSP Dendrogramme - Distribution des STs et des CCs identifiés en fonction des souches d'entérocoques identifiées	91
Figure 23	Répartition des isolats d' <i>E. faecalis</i> selon les complexes clonaux identifiés	92

Liste des tableaux

Tableau 01	Caractéristiques de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques	22
Tableau 02	Composition du mélange réactionnel pour la PCR standard	43
Tableau 03	Amorces utilisées pour les PCR standards	45
Tableau 04	Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye	48
Tableau 05	Liste des amorces utilisées pour MLST d' <i>E. faecalis</i>	51
Tableau 06	Liste des amorces utilisées pour MLST d' <i>E. faecium</i>	52
Tableau 07	Données des souches d'entérocoques	55
Tableau 08	Résultats d'identification des souches d'entérocoques par MALDI-TOF	60
Tableau 09	Répartition des espèces d'entérocoques selon la nature du prélèvement	63
Tableau 10	Profil de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>Enterococcus</i> en fonction des espèces et des types de patients	68
Tableau 11	Répartition des gènes de résistance en fonction des espèces d'entérocoques	78
Tableau 12	Profils de co-résistance moléculaire	81
Tableau 13	Comparaison des nouvelles ST d' <i>E. faecalis</i> avec la base de données MLST	82
Tableau 14	Distribution des gènes de résistance identifiés en fonction des lignées hospitalières à haut risque et le type de patient	87
Tableau 15	Répartition des complexes clonaux associés aux épidémies hospitalières en fonction des types de patients	93
Tableau 16	Relation entre le CC2 et les gènes de résistance identifiés	94

INTRODUCTION

Les bactéries du genre *Enterococcus* « ou entérocoques » font partie de la flore commensale de l'homme et de l'animal, elles sont présentes un peu partout dans l'organisme humain et principalement au niveau du tractus intestinal, rarement dans le vagin ou la cavité buccale, et sont très répandues dans l'environnement [Agudelo Higueta and Huycke, 2014].

Malgré leur mode de vie commensal, les entérocoques ont été reconnus comme des bactéries pathogènes opportunistes, mais dans certaines circonstances peuvent causer des infections humaines graves, voire mortelles, et sont devenus l'un des principaux agents pathogènes provoquant des infections nosocomiales et extrahospitalières [Arias and Murray, 2012; Agudelo Higueta and Huycke, 2014]. *Enterococcus faecalis* était l'espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine [Djahmi *et al.*, 2012; Sreeja *et al.*, 2012]. Toutefois, il existe actuellement un accroissement des cas cliniques causés par *Enterococcus faecium* comme a été signalé aux États-Unis et en Europe [Ochoa *et al.*, 2013; Willems *et al.*, 2012; Abat *et al.*, 2016b; Djahmi *et al.*, 2012]. L'augmentation de l'incidence des infections nosocomiales à *E. faecium* est essentiellement due à l'utilisation croissante de la vancomycine et des antimicrobiens à large spectre en milieu hospitalier [Abat *et al.*, 2016a]. D'autres espèces d'*Enterococcus* telles que: *E. raffinosus*, *E. duran*, *E. avium*, *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* sont qu'occasionnellement rencontrées en pathologie humaine infectieuse [Agudelo Higueta and Huycke, 2014].

Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à certains nombre d'antibiotiques, tels que les céphalosporines, la clindamycine et les faibles concentrations des aminoglycosides [Low *et al.*, 2001; Agudelo Higueta and Huycke, 2014]. Cependant, la résistance acquise aux pénicillines, chloramphénicol, érythromycine, tétracycline et aux aminoglycosides hautement chargés a été rapportée [Low *et al.*, 2001; Kristich *et al.*, 2014]. En outre, la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques a été largement décrite [Tripathi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Pourakbari *et al.*, 2012; Kristich *et al.*, 2014].

Les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), représentent un réel problème de santé publique dans les perspectives thérapeutiques, mais également dans la possibilité du

transfert des gènes de résistance à des bactéries plus pathogènes comme *Staphylococcus aureus* [Jia *et al.*, 2014].

La résistance intrinsèque à certains antibiotiques chez les entérocoques et le transfert génétique des gènes de résistance sont les principales causes de l'échec du traitement des infections entérococciques [Sreeja *et al.*, 2012].

La diffusion épidémique des souches multirésistantes constitue certainement une menace croissante notamment en milieu hospitalier, le typage moléculaire par MLST « Multi-locus sequence typing » est un outil performant utilisé pour contrôler la diffusion épidémique des souches multirésistantes [Ochoa *et al.*, 2013; Kuch *et al.*, 2012], particulièrement au niveau des établissements de santé où la dissémination des souches est facilitée par les mains du personnel soignant et l'utilisation des procédés iatrogènes [Chemaly *et al.*, 2014; Dahl *et al.*, 2016; Orsi and Ciorba, 2013].

Actuellement, plusieurs éléments conduisent à un regain d'intérêt pour les entérocoques: (i) l'augmentation croissante de leur isolement dans les infections urinaires, intra-abdominales, les infections des plaies chirurgicales, les bactériémies, les septicémies et les infections des tissus mous [Fisher and Phillips, 2009; Agudelo Higueta and Huycke, 2014], (ii) l'importance de leur place en pathologie nosocomiale [Fisher and Phillips, 2009], (iii) leur résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques ainsi que l'émergence et l'accumulation de différents nouveaux mécanismes de résistance aux agents antibactériens [Kristich *et al.*, 2014; Hollenbeck and Rice, 2012].

Dans ce contexte, les principaux objectifs visés par la présente étude consistaient à :

- ✓ l'identification au niveau de l'espèce des souches d'entérocoques isolées de divers prélèvements pathologiques à partir des patients hospitalisés et externes, au niveau de trois établissements de santé de l'Est Algérien (Annaba, Guelma et El-kala),
- ✓ l'évaluation phénotypique des niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'origine hospitalière et celles isolées des patients communautaires,

- ✓ l'identification génétique des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques, notamment: les bêta-lactamines, les aminoglycosides, la vancomycine, la tétracycline, l'érythromycine et le chloramphénicol,
- ✓ le typage moléculaire par MLST et l'étude de la structure génétique de la population,
- ✓ l'identification des complexes clonaux par l'utilisation du logiciel bioinformatique eBurst,
- ✓ l'analyse de la diversité génétique et les relations phylogénétiques,
- ✓ discrimination des lignées épidémiques à haut risque, associées aux infections nosocomiales et les épidémies hospitalières, notamment chez les deux espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine «*E. faecalis* et *E. faecium*».

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Taxonomie et description du genre *Enterococcus* :

Le terme « entérocoque » a été pour la première fois utilisé en 1899 par Thiercelin pour décrire l'observation d'un nouveau diplocoque à Gram-positif d'origine intestinale [Lebreton *et al.*, 2014; Agudelo Higuaita and Huycke, 2014]. Au cours de la même année, MacCallum et Hastings ont caractérisé un organisme similaire (aujourd'hui connu comme *Enterococcus faecalis*), dans un cas mortel d'endocardite, décrivant ainsi une première description détaillée de ses capacités pathogènes. Ces premières descriptions constituaient la base de l'attribution de ces bactéries aux pathogènes commensaux opportunistes [Lebreton *et al.*, 2014].

La présence chez les entérocoques d'un acide teichoïque de la paroi porteur de l'antigène D les rapproche plus particulièrement des streptocoques du groupe D, de même que leur présence dans l'intestin de l'homme et de certains animaux. Les streptocoques isolés du tractus intestinal ou streptocoques du groupe D étaient classiquement distingués en deux groupes selon leurs caractéristiques physiologiques : Les "streptocoques du groupe D" (*Streptococcus faecalis* et *Streptococcus faecium*, actuellement nommés *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, respectivement) capables de se multiplier dans des conditions hostiles, et les "streptocoques du groupe D non-entérocoques" incapables de se croître dans des conditions hostiles [Byappanahalli *et al.*, 2012; Fisher and Phillips, 2009; Manero and Blanch, 1999]. En 1903, Thiercelin et Jouhaud ont proposé le terme du « genre *Enterococcus* » [Manero and Blanch, 1999].

En 1984, les études génomiques: hybridations ADN - ADN et le séquençage du gène ARNr 16S montraient que les espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques et confirmant ainsi l'individualisation du genre *Enterococcus* [Lebreton *et al.*, 2014].

Le genre *Enterococcus* est placé dans la famille des *Enterococcaceae*, ordre des *Lactobacillales*, classe des *Bacilli*, phylum des *Firmicutes*, domaine ou empire des *Bacteria* ou des *Eubacteria*. Actuellement, 54 espèces au sein du genre *Enterococcus* ont été décrites [Guzman Prieto *et al.*, 2016], parmi lesquelles, *E. faecalis* (environ 60%) et *E. faecium* (~ 40%) sont les principales espèces isolées en pathologie infectieuse humaine [Guzman Prieto *et al.*, 2016].

Les autres espèces : *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. dispar*, *E. mundtii* et *E. raffinosus* ne causent qu'occasionnellement une infection chez l'homme [Fisher and Phillips, 2009; Byappanahalli *et al.*, 2012; Lebreton *et al.*, 2014].

2. Ecologie du genre *Enterococcus* :

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques, essentiellement dans l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud, le tractus intestinal de certains animaux à sang froid (reptiles et insectes); et peuvent peu fréquemment coloniser la peau, la cavité buccale et l'appareil génital de l'organisme humain [Lebreton *et al.*, 2014; Agudelo Higueta and Huycke, 2014; Castillo-Rojas *et al.*, 2013]. *E. faecalis* et *E. faecium* sont les plus détectés dans la matière fécale humaine [Lebreton *et al.*, 2014], généralement un nombre de 10^5 à 10^7 d'*E. faecalis* et de 10^4 à 10^5 d'*E. faecium* par gramme de fèces humaines a été décrit [Fisher and Phillips, 2009].

Les entérocoques sont également des bactéries de l'environnement, qui sont généralement rencontrés dans les eaux usées, l'eau de mer, l'eau douce, dans le sol et sur les plantes [Lebreton *et al.*, 2014; Castillo-Rojas *et al.*, 2013; Guzman Prieto *et al.*, 2016]. En outre, ces bactéries sont capables de survivre en milieu hospitalier sur différents types de surfaces (sols, murs, poignées, robinets, dispositifs médicaux) [Chemaly *et al.*, 2014].

La présence d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* dans les eaux de boisson est considérée comme un indice d'une contamination fécale qui peut être ancienne en raison de leur grande capacité de résistance [Lebreton *et al.*, 2014]. Ainsi, les entérocoques sont susceptibles de contaminer les aliments comme le lait et les produits laitiers via l'eau contaminée [Lebreton *et al.*, 2014].

3. Etude bactériologique du genre *Enterococcus* :

Les entérocoques sont des coques à Gram-positif, se présentent de manière isolée, en paires ou en courtes chaînettes, non sporulés, dépourvus de capsule avec présence variable chez l'espèce *E. faecalis*; certaines espèces sont mobiles, comme *E. casseliflavus* et *E. gallinarum*. La pigmentation est un trait variable, certaines espèces d'entérocoques sont pigmentées en jaunes, y compris *E. sulfureus*, *E. casseliflavus* et *E. mundtii* [Lebreton *et al.*, 2014; Castillo-Rojas *et al.*, 2013; Fisher and Phillips, 2009; Guzman Prieto *et al.*, 2016].

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont anaérobies facultatives, la culture est généralement favorisée par une incubation dans une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone. Ces bactéries ne sont pas exigeantes et elles peuvent croître sur les milieux ordinaires dans une large limite de température (culture entre 10 °C à 45 °C) et de PH (4 à 9,6), mais avec un optimum thermique de 35 °C et leur PH optimal de croissance est de 7.5 [Fisher and Phillips, 2009;Lebreton *et al.*, 2014;Guzman Prieto *et al.*, 2016]. Les espèces de ce genre sont généralement capables de résister à des conditions hostiles: culture en présence de 40 % de bile, culture en présence de 6,5 % de NaCl, résistance à un chauffage de 60 °C durant 30 minutes et elles sont capables de survivre dans des conditions extrêmes de température (5–65 °C) et de pH (4-10.0) [Lebreton *et al.*, 2014;Fisher and Phillips, 2009].

Les entérocoques sont des bactéries à catalase et oxydase négatives, elles sont capables d'hydrolyser l'esculine, et sont habituellement homofermentatives, produisant l'acide lactique comme produit final de fermentation du glucose sans production de gaz [Lebreton *et al.*, 2014;Shekh and Roy, 2012].

Les critères de différenciation d'*E. faecalis* et *E. faecium* des autres espèces d'*Enterococcus* sont : la production d'acide à partir du sorbose, du saccharose, du ribose et d'arabinose, la croissance en présence de 0 à 4% de tellurite, l'utilisation du pyruvate et la désamination de l'arginine [Day *et al.*, 2001].

Les entérocoques possèdent un certain nombre de composants liés à la surface cellulaire qui présentent des propriétés antigéniques tels, l'antigène du groupe D de Lancefield, l'antigène polysaccharidique de la capsule, les adhésines au collagène (Ace : adhesion of collagen from *E. faecium*) d'*E. faecalis*, l'EfaA (*E. faecalis* antigen A) est un antigène de surface majeur d'*E. faecalis* et *E. faecium*, l'Epa (Enterococcal polysaccharide antigen) et l'antigène polysaccharidique de la paroi cellulaire [Garsin *et al.*, 2014;Madsen *et al.*, 2017].

4. Facteurs de pathogénicité :

Les entérocoques sont capables de produire plusieurs facteurs membranaires et extracellulaires, qui contribuent à leur pathogénicité [Fisher and Phillips, 2009;Madsen *et al.*, 2017;Arias and Murray, 2012].

4-1. Facteurs liés à la membrane :

Le groupe de protéines de surface d'*E. faecalis* qui a été largement caractérisé constitue le groupe de protéines de substances d'agrégation (protéines AS), ces protéines sont codées par des plasmides qui souvent hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques [Arias and Murray, 2012;Madsen *et al.*, 2017]. Les protéines AS provoquent l'agglutination des cellules d'*E. faecalis* et participent au transfert de l'ADN plasmidique. Ces protéines contribuent aussi à la liaison d'*E. faecalis* à l'épithélium rénal, la formation de biofilm, l'internalisation dans les cellules intestinales, et elles affectent la pathogenèse de l'endocardite (vraisemblablement par la formation de grands agrégats bactériens sur la valve cardiaque) [Arias and Murray, 2012;Madsen *et al.*, 2017].

Les MSCRAMM entéroococciques (MSCRAMM: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules: composants de surface microbiens reconnaissant les molécules adhésives de la matrice) sont des éléments protéiques importants dans les premiers stades de l'infection car ils peuvent se lier à des composants de la matrice extracellulaire de l'hôte notamment le collagène [Arias and Murray, 2012].

Bien que de nombreuses adhésines putatives appartenant à la famille de MSCRAMM aient été décrites à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium*, les plus largement étudiées sont les adhésines de collagène : Ace (adhesion of collagen from *E. faecalis*) chez *E. faecalis* et Acn (adhesion of collagen from *E. faecium*) chez *E. faecium* [Madsen *et al.*, 2017;Arias and Murray, 2012]. Les deux sont des adhésines murales immobilisées à la surface du peptidoglycane via un motif de type LPXTG (Motif d'acides aminés: leucine, proline, X représente n'importe quel acide aminé, thréonine, glycine) [Hendrickx *et al.*, 2009;Arias and Murray, 2012].

Dans un modèle d'endocardite expérimentale, les anticorps spécifiques du domaine de liaison au collagène protègent les rats de l'endocardite, et dans un autre modèle d'endocardite, la mutation du gène Ace par délétion a considérablement atténué la pathogénicité de la bactérie par rapport à la souche sauvage [Arias and Murray, 2012; Fisher and Phillips, 2009].

D'autre part, à la différence des souches d'*E. faecium* associées aux hôpitaux, les souches associées à la communauté (isolats des selles animales ou humaines) ont souvent un pseudogène Acm qui est rarement exprimé ou adhéré au collagène. Donc, l'Acm peut accentuer la capacité des souches hospitalières d'*E. faecium* à provoquer une maladie [Arias and Murray, 2012].

L'EfaA (*E. faecalis* antigen A) est un antigène de surface majeur d'*E. faecalis*, il a été identifié dans des sérums des patients atteints d'endocardite à *E. faecalis*. Le dépistage de la prévalence du gène EfaA a révélé qu'il était omniprésent chez presque tous les isolats d'*E. faecalis* et a été identifié avec une prévalence également répandue chez *E. faecium* [Garsin *et al.*, 2014].

La capacité des entérocoques à produire de biofilm est fondamentale pour provoquer l'endocardite, les infections endodontiques et les infections des voies urinaires [Fisher and Phillips, 2009]. Chez les entérocoques, la présence des pili (qui sont aussi présents chez d'autres bactéries à Gram-positif) a un rôle important dans la colonisation des tissus de l'hôte et l'infection [Arias and Murray, 2012]. Les Ebp (endocarditis and biofilm-associated pili : pilus associé aux endocardites et à la formation de biofilm) sont omniprésents chez *E. faecalis* et sont importants pour la formation du biofilm, la pathogenèse d'endocardite et les infections du tractus urinaire [Arias and Murray, 2012; Madsen *et al.*, 2017].

Certaines souches d'*E. faecalis*, en particulier celles appartenant à des clones associés à l'hôpital possèdent l'antigène polysaccharidique capsulaire (cps) [Arias and Murray, 2012]. L'Epa (Enterococcal polysaccharide antigen), est un autre antigène polysaccharidique de la paroi cellulaire des entérocoques. Cet antigène a été identifié dans les sérums de la plupart des patients atteints d'infections graves à *E. faecalis* [Arias and Murray, 2012].

4-2. Facteurs sécrétés :

La cytolysine (Cyl), également appelée hémolysine, est une toxine produite par presque 30% des souches d'*E. faecalis* et est codée par des plasmides ou des îlots de pathogénicité [Madsen *et al.*, 2017; Arias and Murray, 2012; Fisher and Phillips, 2009]. L'hémolysine peut lyser les globules rouges des humains, des chevaux et des lapins, et peut aussi lyser les globules blancs humains [Arias and Murray, 2012]. Les souches d'*E. faecalis* exprimant le gène *cyl* sont plus virulentes dans divers modèles animaux que les souches dépourvues de ce facteur [Arias and Murray, 2012; Madsen *et al.*, 2017].

La protéase gélatinase (GelE) et la serine protéinase extracellulaire (SprE) sont deux facteurs sécrétés importants dans la pathogenèse entérococcique en fournissant des nutriments aux bactéries par dégradation de tissu de l'hôte [Fisher and Phillips, 2009; Arias and Murray, 2012]. GelE est capable d'hydrolyser la gélatine, la caséine et l'hémoglobine [Fisher and Phillips, 2009], cette protéine participe également à l'activation de l'autolysine, une enzyme dégradant le peptidoglycane [Arias and Murray, 2012]. Les mutants dépourvus de GelE montrent une diminution de la translocation à travers les cellules intestinales, l'atténuation de la pathogénicité dans les cas de péritonite, d'endocardite et d'endophtalmie [Arias and Murray, 2012].

5. Implications cliniques des entérocoques :

Les entérocoques sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales et communautaires [Werner G, 2013; Abat *et al.*, 2016a]. La première description d'une infection à entérocoque a été décrite en Allemagne, en 1899, dans un cas d'endocardite infectieuse [Garsin *et al.*, 2014; Lebreton *et al.*, 2014]; les entérocoques ont par la suite montré une série de diverses d'infections.

Les infections des voies urinaires sont la source la plus fréquente d'isolement d'entérocoques, ces infections sont principalement dues à *E. faecalis* et *E. faecium* [Bourafa *et al.*, 2015; Agudelo Higuaita and Huycke, 2014]. La colonisation à long terme des voies urinaires par les entérocoques peut s'aggraver et peut entraîner des infections invasives subséquentes, telles que la bactériémie ou l'endocardite [Bourafa *et al.*, 2015; Guzman Prieto *et al.*, 2016]. Les infections urinaires à entérocoques sont plus susceptibles d'être acquises dans les établissements hospitaliers ou lors des soins de longue

durée, et par conséquent sont plus susceptibles d'être résistants à de nombreux antibiotiques. Dans les unités de soins intensifs, les entérocoques provoquent près de 15% des infections des voies urinaires associées aux soins de santé, et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont devenus des agents pathogènes majeurs des voies urinaires associés aux soins de santé chez les patients en soins intensifs [Agudelo Higueta and Huycke, 2014].

La bactériémie et l'endocardite sont parmi les infections à entérocoques les plus fréquentes. Les entérocoques sont actuellement la deuxième cause de bactériémie associée aux soins de santé [Agudelo Higueta and Huycke, 2014; Kristich *et al.*, 2014]. La source d'une bactériémie est généralement le tractus génito-urinaire, même si une bactériémie provient souvent de sources intra-abdominales [Guzman Prieto *et al.*, 2016; Agudelo Higueta and Huycke, 2014] qui peut progresser vers une septicémie ou une endocardite [Guzman Prieto *et al.*, 2016]. Dans certaines études, la bactériémie à *E. faecium* est associée à un taux de mortalité plus élevé qu'à *E. faecalis*, et les patients atteints de maladies sous-jacentes peuvent avoir des taux de mortalité aussi élevés (75%); ce qui reflète vraisemblablement que les patients à risque de développer une bactériémie entérocoque sont les personnes âgées ou atteintes de maladies sous-jacentes, incluant le diabète, les maladies malignes et les maladies cardiaques [Agudelo Higueta and Huycke, 2014].

L'endocardite est l'une des infections entérocoques les plus graves, le traitement est pratiquement difficile en raison de la résistance intrinsèque des entérocoques à l'activité bactéricide de la plupart des antibiotiques [Agudelo Higueta and Huycke, 2014]. Les entérocoques provoquent 20% des cas d'endocardite infectieuse [Madsen *et al.*, 2017]. Ces infections des valvules cardiaques se produisent généralement chez des personnes âgées. Par ailleurs, une autre étude a rapporté qu'entre 15 et 39% d'endocardites entérocoques sont associées aux soins de santé. La préoccupation actuelle la plus problématique dans la prise en charge de l'endocardite entérocoque est la sélection d'une thérapie efficace pour les isolats multirésistants [Agudelo Higueta and Huycke, 2014].

Les autres infections les plus souvent causées par les entérocoques sont les infections des plaies chirurgicales, les abcès intra-abdominaux, les péritonites et les infections néonatales [Stucki *et al.*, 2014; Orsi and Ciorba, 2013; Fisher and Phillips, 2009]. D'autres

infections à entérocoques moins fréquentes ou rarement observées comprennent la méningite et la pneumonie [Agudelo Higuaita and Huycke, 2014].

6. Typage moléculaire des entérocoques :

Avec leur fréquence d'apparition accrue en tant qu'organisme pathogène nosocomial, la demande de typer les souches d'*E. faecalis* et *E. faecium* a été augmenté. Les techniques disponibles varient selon la facilité d'utilisation, les exigences qualité, la main-d'œuvre, le coût et le délai, la reproductibilité des résultats et le pouvoir discriminatoire [Werner G, 2013]. Parmi les techniques utilisées pour le typage des entérocoques :

Le sérotypage, est une méthode de typage classique, évaluant les différences des structures de surface des bactéries typables, infectant les hôtes modèles. Chez *E. faecalis*, 21 sérotypes distincts ont été identifiés, et ont été ensuite confirmés par l'analyse des locus de capsule [McBride *et al.*, 2007; Werner G, 2013].

Le ribotypage est une méthode de typage classique ciblant l'ADN ribosomique par des techniques d'hybridation ou d'amplification. Cependant, son pouvoir discriminatoire est plutôt limité et donc son application et son utilité pour typer les enterococci sont faibles [Werner G, 2013; Brisse *et al.*, 2002].

L'analyse par macrorestriction combinée à électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis), a été introduite au début des années 1990 pour le typage des souches bactériennes [Werner G, 2013]. Elle implique une procédure très longue, nécessite une normalisation standard de la technique, et exige un personnel qualifié et expérimenté, d'une part, pour le travail de laboratoire, et d'autre part, pour l'évaluation des données.

Malgré les exigences techniques qu'il impose en matière d'expérience et de normalisation, le typage par PFGE est toujours considéré comme très performant, reproductible et discriminatoire pour le typage des souches d'entérocoques, en particulier pour élucider les cas supposés d'être épidémiques [Weng *et al.*, 2013; Domig *et al.*, 2003].

En effet, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) est un outil pour séparer les grandes molécules d'ADN puisque tous les fragments d'ADN supérieurs à 20 kb présentent la même mobilité dans une électrophorèse conventionnelle à l'aide d'un champ électrique

statique (appelé également champ électrostatique, est un champ électrique qui ne varie pas avec le temps). Le PFGE combiné à une restriction contrôlée par des endonucléases à faible nombre de sites de coupures permet par alternance de la direction du champ électrique : la séparation des molécules d'ADN, la différenciation des souches ainsi que l'estimation de la taille d'ADN chromosomique. Le PFGE a été utilisé pour la différenciation des souches d'entérocoques et l'évaluation épidémiologique des infections entérococciques nosocomiales et le typage des entérocoques résistants aux glycopeptides [Domig *et al.*, 2003].

Le typage par Multi-Locus Sequence Typing (MLST), est apparu comme un outil important pour étudier l'épidémiologie et la structure de la population des souches bactériennes. L' MLST détermine la composition exacte des nucléotides et est capable d'identifier les mutations [Werner G, 2013]. La technique repose sur l'amplification et le séquençage de fragments internes de multiples gènes de ménage (généralement sept loci) présents à différents endroits sur le chromosome. L'MLST est similaire au concept du séquençage de l'ARNr 16S, dans la mesure où les deux techniques s'appuient sur le séquençage des loci génomiques pour lesquels la sélection de diversification est faible, mais l'MLST se distingue du séquençage de l'ARNr 16S dans sa capacité à résoudre les relations au niveau de sous-espèce [Weng *et al.*, 2013;Palmer *et al.*, 2014].

L'MLST a montré que certaines lignées d' *E. faecalis* et *E. faecium* sont constamment associées à la résistance aux antibiotiques et à la persistance à l'hôpital, cette information a aidé de sélectionner les souches pour des projets de séquençage génomique [Palmer *et al.*, 2014;Werner G, 2013]. Un outil logiciel appelé BURST (Based upon Related Sequence Types : basé sur des types de séquences connexes), plus tard, la lettre (e) a été ajoutée « eBURST »); ce logiciel a été spécialement développé pour l'analyse des données MLST, l'étude des relations phylogénétiques et la caractérisation des complexes clonaux (CC) [Weng *et al.*, 2013].

Tableau 01 : Caractéristiques de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques [Cattoir and Leclercq, 2013;

Fisher and Phillips, 2009; Bourafa et al., 2016;Quincampoix and Mainardi, 2001]

Résistance			Acquise						Naturelle
Niveau	Haut		Variable	Modéré		Bas			Bas
Type	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3/C4
CMI (mg/l)									
Vancomycine	64– > 1000	> 16	4–1024	64-168	8-32	<16	<16	<16	2–32
Teicoplanine	16–512	> 16	0,5–1	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5–1
Transférabilité	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Principales espèces bactériennes	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> Diverses espèces d'entérocoques	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. flavescens</i> <i>E. casseliflavus</i>
Expression	Inductible	?	Inductible	Constitutive	Inductible Constitutive	Inductible	Inductible	Constitutive	Inductible Constitutive
Support du gène de résistance	Plasmide (Chromosome)		Chromosome (Plasmide)		Chromosome		?	Chromosome	Chromosome
Terminaison des précurseurs	D-Ala-D-Lac					D-Ala-D-Ser			

8. Épidémiologie :

L'importance clinique du genre *Enterococcus* est directement liée à sa résistance aux antibiotiques, qui a énormément contribué aux risques de colonisation et d'infection [Kristich *et al.*, 2014], dont un grand nombre d'études sur l'épidémiologie des infections à entérocoques a été mené au cours des deux dernières décennies [Agudelo Higuaita and Huycke, 2014]. Les entérocoques multirésistants aux antibiotiques sont des pathogènes nosocomiaux importants et ayant développé une résistance à pratiquement tous les antimicrobiens actuellement utilisés dans la pratique clinique par l'utilisation de nombreuses stratégies génétiques diversifiées, ce qui a rendu le traitement des infections à entérocoques multirésistants un défi clinique énorme [Miller *et al.*, 2014].

En Europe, l'infection par *Enterococcus* a été jugée inoffensive pour l'homme pendant longtemps. Cependant, au cours de ces dernières années, les entérocoques ont été signalés comme la cause la plus fréquente d'infections des plaies, des voies urinaires et de bactériémie [Agudelo Higuaita and Huycke, 2014; Yadegarynia and Arab-Mazar, 2016]. En 2005, au Royaume-Uni, il y avait 7066 cas signalés de bactériémie à *Enterococcus*, 63% de ces cas étant dus à *E. faecalis* et 28% à *E. faecium* qui ont tous deux une résistance accrue aux antibiotiques [Fisher and Phillips, 2009].

Dans une étude sur des isolats d'entérocoques d'origine sanguine reçus des laboratoires de microbiologies cliniques dans 11 comtés danois de 2002 à 2006, une prévalence d'infection de 68% a été notée, dont l'augmentation a été principalement causée par les isolats d'*E. faecium* [Cattoir and Leclercq, 2013].

Aux États-Unis, environ 12% des infections hospitalières sont dues à des espèces d'*Enterococcus*. *E. faecalis* est l'espèce la plus fréquente associée à des infections cliniques alors que *E. faecium* présente une plus grande résistance aux antibiotiques [Fisher and Phillips, 2009]. D'autre part, les entérocoques sont les deuxièmes microorganismes isolés à partir des infections associées au cathéter du système sanguin, des voies urinaires, des infections de la peau et des tissus mous dans les hôpitaux des États-Unis [Arias and Murray, 2012].

Comme présenté ci-dessus, la plupart des infections à entérocoques sont dues à *E. faecalis*; cependant, récemment l'épidémiologie est en train de changer, et les isolats d'*E.*

faecium représentent actuellement un taux près de 40% [Guzman Prieto *et al.*, 2016; Kristich *et al.*, 2014; Agudelo Higuaita and Huycke, 2014]. L'augmentation des cas cliniques à *E. faecium* a été surtout signalée aux États-Unis et en Europe [Abat *et al.*, 2016b].

Cette tendance de l'épidémiologie des infections entérococciques a des conséquences cliniques importantes, car la résistance aux antibiotiques tels que l'ampicilline, les aminoglycosides et la vancomycine (qui étaient les antibiotiques de base pour le traitement des infections à entérocoques) est souvent exprimée par les isolats d'*E. faecium* d'origine hospitalière [Guzman Prieto *et al.*, 2016; Kristich *et al.*, 2014]. Par opposition, la résistance à l'ampicilline est rarement observée chez *E. faecalis*, et la résistance à la vancomycine est beaucoup moins fréquente chez cette espèce [Guzman Prieto *et al.*, 2016; Kristich *et al.*, 2014]. En outre, la société des maladies infectieuses en Amérique (infectious Disease Society of America-IDSa) a inclus *E. faecium* parmi les agents pathogènes ESKAPE (*E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*) pour lesquels de nouvelles thérapies sont nécessaires de toute urgence [Arias and Murray, 2012; Kristich *et al.*, 2014].

Au fait, dans les hôpitaux des États-Unis, la majorité des isolats d'*E. faecium* sont résistants à l'ampicilline. De plus, les CMI de l'ampicilline des isolats nosocomiaux d'*E. faecium* qui sont actuellement isolés dans les hôpitaux des États-Unis sont beaucoup plus élevés que ceux isolés depuis 20 ans, cette observation a des conséquences cliniques importantes [Kristich *et al.*, 2014].

En Suisse, selon le rapport de surveillance national « ANRESIS-Centre suisse pour le contrôle de l'Antibiorésistance », le taux d'*E. faecalis* résistants à la pénicilline de 2011 à 2013, s'élève à environ 5%. En Genève, un taux d'environ 9% a été déclaré en 2013 au niveau des hôpitaux universitaires. Ce taux de résistance est en progression au cours de ces dernières années vu du nombre important d'infections causées par ces bactéries en milieu hospitalier (p.ex., aux hôpitaux universitaires de Genève en 2013 : 1088 cultures d'échantillons cliniques ou dépistages étaient positifs à *E. faecalis* et 344 à *E. faecium*), ce qui pose un problème considérable de santé hospitalière [Stucki *et al.*, 2014].

D'autre part, des études épidémiologiques ont fourni des preuves que les entérocoques hautement résistants à la gentamicine étaient une source majeure d'infections nosocomiales [Cattoir and Leclercq, 2013]. Cette résistance, supprime la synergie bactéricide entre les inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire et la plupart des aminoglycosides, qui est essentielle pour le traitement d'infections sévères à entérocoques telles que l'endocardite [Cattoir and Leclercq, 2013; Kristich *et al.*, 2014]. Cependant, le HNRA a été diffusé depuis plusieurs décennies [Kristich *et al.*, 2014]. La prévalence des HNRA peut varier de 40 à 68% chez les isolats d'*Enterococcus* selon la localisation géographique, et diffère entre *E. faecalis* et *E. faecium* [Faron *et al.*, 2016], le HNRA est estimé aujourd'hui de 30 à 50% chez les isolats d'entérocoques isolés des infections sanguines et il n'est pas rare chez les isolats de l'endocardite entérococcique [Orsi and Ciorba, 2013].

D'autre part, l'introduction du chloramphénicol, l'érythromycine et la tétracycline a été rapidement suivie par l'émergence d'une résistance, atteignant parfois une prévalence qui empêchait leurs utilisations empiriques [Kristich *et al.*, 2014].

Les ERV ont été largement rapportés [Kristich *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015], ces bactéries sont maintenant reconnus comme des agents pathogènes nosocomiaux importants dans le monde entier et la majorité des rapports publiés à ce jour sont ceux des États-Unis et des pays européens [Yang *et al.*, 2015].

La résistance à la vancomycine, bien qu'elle reste relativement rare chez *E. faecalis* (9%), elle est largement répandue chez *E. faecium* (77%), les 14% d'isolats restants représentent des espèces moins fréquemment impliquées dans des infections graves, y compris *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* et *E. raffinosus* [Arias and Murray, 2012; Kristich *et al.*, 2014; Guzman Prieto *et al.*, 2016; Faron *et al.*, 2016].

Aux États-Unis, depuis la première apparition des ERV en 1988 jusqu'à la fin de la première décennie de ce siècle, le taux de résistance à la vancomycine a dépassé 80% chez *E. faecium* [Miller *et al.*, 2014]. Une étude récente a montré que la prévalence de la résistance à la vancomycine chez 7424 isolats cliniques d'entérocoques isolés du sang au cours des 10 dernières années aux États-Unis, était de 27,8%. Par ailleurs, au Canada, la prévalence des ERV était très faibles <10% [Cattoir and Leclercq, 2013; Orsi and Ciorba, 2013].

En Amérique latine, une étude prospective multicentrique dans quatre pays, a révélé que la majorité (~ 78%) des infections à entérocoques sont encore causées par *E. faecalis* sensible à l'ampicilline et à la vancomycine, bien que les (~ 22%) restantes soient causées par des lignées génétiques d'*E. faecium* multirésistantes aux antibiotiques qui sont similaires à celles observées aux États-Unis [Arias and Murray, 2012].

En Europe, les données de surveillance montrent une grande variabilité entre les différents pays avec ERV, allant de <2% (Finlande, Hollande, France) à > 20% (Irlande, Grèce, Portugal). L'Italie est un pays à faible taux (4,2%) [Orsi and Ciorba, 2013].

Il est intéressant de noter que, l'épidémiologie des ERV aux États-Unis et en Europe, semble être très différente, les réservoirs américains des ERV sont présents principalement dans les établissements de santé et sont fréquents dans les épidémies hospitalières [Orsi and Ciorba, 2013], la diffusion des ERV aux Etats-Unis est due à l'utilisation large des céphalosporines et de la vancomycine dans les hôpitaux [Stucki *et al.*, 2014]. Au contraire, en Europe, le réservoir principal des ERV était initialement représenté par la population saine dans la communauté, 2% - 10% des porteurs [Orsi and Ciorba, 2013]. La source était probablement causée par l'utilisation de l'avoparcine, un glycopeptide de la vancomycine adopté dans l'industrie agricole au cours des années 1980 en tant que promoteur de croissance chez les animaux, expliquant le réservoir communautaire [Orsi and Ciorba, 2013]. En effet, l'émergence des ERV en Europe a conduit à l'interdiction de ce composé en 1996. Bien qu'une diminution de la prévalence des ERV en Europe a été initialement observée après l'interdiction de l'avoparcine, la surveillance a révélé une augmentation des infections nosocomiales à entérocoques résistants à l'ampicilline et /ou la vancomycine au cours de la dernière décennie [Arias and Murray, 2012; Orsi and Ciorba, 2013]. D'après cette observation, la dissémination des ERV en Europe peut être expliquée par la mauvaise utilisation continue d'antibiotiques à large spectre qui a sélectionné les ERV [Stucki *et al.*, 2014].

En Australie, les niveaux des ERV chez les patients hospitalisés sont également élevés, une étude de la résistance chez des isolats d'*Enterococcus* causant des maladies chez des patients hospitalisés et externes, au niveau de 17 établissements, a montré que la prévalence de la résistance à la vancomycine chez *E. faecium* avait plus que doublé, passant de 7,2% en 2005 à 15,4% en 2007 [Griffin *et al.*, 2012; Christiansen *et al.*, 2007].

La prévalence des ERV au Queensland passant de 0,1% en 2006 à 3,3% en 2011. Parmi les isolats cliniques analysés dans cette étude, la majorité ont été obtenus à partir d'échantillons d'urine [Griffin *et al.*, 2012]. Et selon le rapport de Guzman *et al.*, en Australie, en 2016, 37% des isolats d'*E. faecium* isolés de bactériémies présentaient une résistance à la vancomycine [Guzman Prieto *et al.*, 2016].

Fait intéressant, la résistance à la vancomycine chez les isolats d'*E. faecium* australiens est presque exclusivement causée par des déterminants de type vanB, tandis que vanA est le principal déterminant de la résistance à la vancomycine en Europe et aux États-Unis [Coombs *et al.*, 2014;Guzman Prieto *et al.*, 2016].

En Afrique, peu de rapport sur l'épidémiologie de la résistance à la vancomycine ont été décrits. Cependant, au sud-africains les deux premiers cas des ERV ont été signalés en 1997 [Mahabeer *et al.*, 2016]. Par la suite, les ERV ont été trouvés en tant que colonisateurs chez environ 11% des patients dans les unités des soins intensifs des hôpitaux de Johannesburg [von *et al.*, 2000;Mahabeer *et al.*, 2016], et récemment [Mahabeer *et al.*, 2016], dans un hôpital tertiaire de Durban la première épidémie à ERV a été signalée dans une unité d'hématologie.

Dans les hôpitaux algériens, à ce jour, deux cas cliniques des ERV ont été signalés à Alger (*E. faecalis* en 2008 et *E. faecium* en 2013) [Aggoune *et al.*, 2008;Hamidi *et al.*, 2013], ce qui reflète que la vancomycine reste un antibiotique efficace pour le traitement des infections entérococciques multirésistants dans ce pays [Djahmi *et al.*, 2012]. D'autre part, jusqu'à l'heure, des cas épidémiques à entérocoque n'ont pas été signalé, néanmoins l'isolement des lignées épidémiques a été rapporté [Djahmi *et al.*, 2012;Bourafa *et al.*, 2016].

En Tunisie, l'émergence des souches clinique d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine a été également rapportée [Abbassi *et al.*, 2007]. Par ailleurs, la fréquence des porteurs fécaux des ERV (21%) a été signalée pour la première fois en Afrique dans une communauté marocaine chez des personnes non hospitalisées, dont le gène vanA était le seul gène détecté [Hannaoui *et al.*, 2016].

En Asie, la prévalence de la résistance à la vancomycine n'est pas si élevée, et le nombre d'infections par *E. faecium* résistant à la vancomycine est encore faible, cela reflète

l'apparition relativement récente de la résistance à cet antibiotique dans ce continent bien que des épidémies aient été documentées [Cattoir and Leclercq, 2013; Arias and Murray, 2012].

Il est important de noter, que les taux d'infections à ERV sont plus élevés chez les patients gravement malades admis dans les unités de soins intensifs, dont les options de traitement sont limitées. En effet, plusieurs études ont montré que les infections causées par les ERV sont plus graves et associées à un taux de mortalité plus élevé plus un fardeau économique comparées à celles causées par les entérocoques sensibles à la vancomycine [Orsi and Ciorba, 2013]. Ce qui est inquiétant que les isolats d'*E. faecium* sont de plus en plus identifiés dans les infections nosocomiales [Miller *et al.*, 2014].

Cette observation est d'une importance clinique primordiale, car les infections à *E. faecium* sont de loin les plus difficiles à traiter [Arias and Murray, 2012]. L'évaluation des entérocoques, en particulier *E. faecium*, en tant qu'agent multirésistant important des infections nosocomiales a été définitivement établie lorsqu'ils ont acquis une résistance à la vancomycine [Guzman Prieto *et al.*, 2016].

La transmission des ERV peut se produire par contact direct avec des patients colonisés ou infectés, ou par les mains du personnel soignant, l'équipement ou les surfaces environnementales [Orsi and Ciorba, 2013]. D'autre part, l'infection par les ERV est associée à une hospitalisation prolongée, une exposition fréquente à des agents antimicrobiens (en particulier l'utilisation de la vancomycine), une diminution de l'immunité, une insuffisance rénale ou la présence d'un cathéter urinaire indépendant [Tripathi *et al.*, 2016; Orsi and Ciorba, 2013].

Récemment [Miller *et al.*, 2014], les entérocoques ont conféré des gènes de résistance à la vancomycine à des microorganismes plus pathogènes tels que les SARM, un événement considéré comme une grave menace pour la santé publique.

En réponse au problème croissant de la résistance à la vancomycine chez les entérocoques, les industries pharmaceutiques ont développé un certain nombre d'agents antibactériens plus récents qui ont une activité contre les ERV. Cependant, aucun de ces agents anti-Gram-positif nouvellement autorisés (quinupristine-dalfopristine, linezolide, daptomycine, tigécycline) n'a été totalement exempt de résistance, et par conséquent, la

résistance généralisée des entérocoques a un impact médical important dans le traitement des infections à entérocoques [Kristich *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014].

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes :

1. Cadre d'étude :

Ce travail de recherche a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie-Département de Biochimie-Université Badji Mokhtar- Annaba- Algérie, au niveau de l'Unité de Recherche- Risque Microbien- Université de Caen, France et au niveau de l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) de la faculté de Médecine, Aix-Marseille-Université, France

L'étude a été réalisée sur une collection de 86 souches d'entérocoques non-dupliquées isolées de différents prélèvements pathologiques au niveau de trois établissements de santé de l'Est Algérien (Annaba, Guelma et El-Kala) à partir des patients hospitalisés et communautaires.

Les objectifs visés par notre étude englobent les points suivants :

- ✓ L'identification des souches d'entérocoques au niveau de l'espèce par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)
- ✓ L'étude phénotypique de la sensibilité de ces souches aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé et par E-test
- ✓ L'évaluation des niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'origine hospitalière et ceux exprimés par les souches d'origine communautaire
- ✓ La caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques par l'utilisation des amorces spécifiques
- ✓ Le typage moléculaire des souches d'*E.faecalis* et *E.faecium* par MLST et étude de la diversité génétique des isolats
- ✓ L'identification des complexes clonaux par l'utilisation du logiciel bioinformatique (eBurst) et analyse des relations phylogénétiques

- ✓ Discrimination des lignées associées aux infections hospitalières « ou lignées épidémiques »

2. Souches bactériennes étudiées :

Quatre-vingt-six souches non répétitives d'entérocoques isolées de divers prélèvements pathologiques : urine (38.4%), pus (21.2%), sang (18.8%), prélèvements vaginaux (21.2%) et un échantillon de sperme (1.2%), ont été recueillies dans des tubes de conservation à partir de différents établissements de santé de l'Est algérien (Annaba, Guelma *et al*-kala) durant une période allant de Décembre 2010 jusqu'au Mars 2013. Ces isolats cliniques incluent des souches isolées à partir des patients hospitalisés (72.9%) et des patients externes (27%).

3. Identification du genre *Enterococcus* :

Après purification des isolats sur gélose cœur cerveau, l'identification des souches isolées a été effectuée par l'utilisation des méthodes microbiologiques standards, incluant les examens microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram, test catalase, ainsi que l'isolement sur milieux sélectifs (culture sur gélose bile esculine azide (BEA) et dans le bouillon hyper-salé à 6,5% de NaCl (Annexe I).

3-1. Isolement sur milieux sélectifs :

3-1-1. Culture sur la gélose bile esculine azide (BEA) :

- Principe :

- La gélose BEA est un milieu sélectif utilisé pour sélectionner les entérocoques et les streptocoques du groupe D [Domig KJ *et al.*, 2003].
- L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries à Gram-négatif.
- La bile de bœuf empêche la croissance des streptocoques (sauf les streptocoques du groupe D).
- Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine (via l'enzyme esculine hydrolase). Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

- **Technique :**

Ensemencer les souches par stries à la surface du milieu, puis incuber pendant 24 h à 37 °C.

- **Lecture :**

Le développement des colonies s'accompagne d'un noircissement du milieu dû à l'hydrolyse de l'esculine.

3-1-2. Culture dans le bouillon hypertonique (6,5 % de NaCl) :

- **Principe :**

La capacité des entérocoques à se développer en présence de sel (6.5% de NaCl) est l'une des caractéristiques distinctives du genre *Enterococcus*, le bouillon hypertonique avec 6.5 % de NaCl sert à différencier les entérocoques (croissance) des streptocoques du groupe D (pas de croissance).

- **Technique :**

Ensemencer les souches bactériennes à étudier dans le bouillon hypertonique (6.5% de NaCl) et incuber à 37 °C pendant 24 h.

- **Lecture :**

La présence d'un trouble indique la croissance des entérocoques [Byappanahalli *et al.*, 2012; Abamecha *et al.*, 2015].

4. Identification des espèces du genre *Enterococcus* :

L'identification des souches d'entérocoques au niveau de l'espèce a été réalisée par le système miniaturisé API 20 Strep (Bio-Mérieux, France)[Abamecha *et al.*, 2015], puis confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MicroflexTM, BrukerDaltonic, Bremen, Allemagne) avec le contrôle flex et le logiciel Biotyper Version 3.0 (Bruker Daltonics) [Seng *et al.*, 2009].

4-1. Identification par la galerie API 20 Strep :

L'API 20 Strep (Analytical profile index 20 Streptocoques) est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic d'espèce pour la plupart des streptocoques, certains entérocoques et certains germes apparentés (Annexe II).

4-2. Identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF :

4-2-1. Principe :

Si les techniques conventionnelles d'identification des différents microorganismes se basent sur leurs aspects morphologiques et leurs profils biochimiques, la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet d'identifier les microorganismes par l'analyse directe de leurs protéines.

Le MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight) avec le contrôle flex et le logiciel Biotyper V 3.0 [Seng *et al.*, 2009].

Les différentes étapes appliquées pour l'identification des souches bactériennes par MALDI-TOF sont les suivantes:

4-2-2. Nettoyage de la cible (plaque en stainless steel avec 96 puits ou spots) :

Le nettoyage de la cible consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude et l'éthanol (70%) plusieurs fois, en frottant avec du papier de précision (type Kim Wipes) afin de ne pas la rayer, ensuite on place la cible dans l'éthanol pendant 15 min, après l'élimination de l'éthanol, on frotte la cible avec 500 µl de TFA (acide trifluoroacétique) à 80% et enfin on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC et on la laisse sécher à l'air libre.

4-2-3. Préparation de la matrice :

La matrice est constituée de molécules cristallisées ont pour rôle de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser

incidents. Les composants de la matrice doivent être assez petits afin d'avoir une bonne volatilité et se vaporiser sous l'action du rayon laser.

La matrice est préparée sous un PSM (poste de sécurité microbiologique) dans un tube à Eppendorf avec port des gants :

- déposer 10 mg d'acide alpha-cyano-4 hydrocinnamique (HCCA) plus 500 µl d'acetonitril HPLC, 250 µl de TFA à 10% (acide trifluorocétique) et 250 µl d'eau HPLC,
- vortexer vigoureusement,
- soniquer pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons,
- centrifuger 5 minutes à 13000 rpm,
- transférer le surnageant dans un tube Eppendorf propre, la matrice est prête à être utilisée, et elle doit être conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

4-2-4. Dépôt des échantillons sur la cible Maldi :

- remplir le plan de la cible MALDI en indiquant la référence des échantillons déposés. Sous un PSM et sur la cible de Maldi-tof, en effectuant au minimum deux essais pour chaque échantillon (chaque échantillon occupe au moins deux spots de la plaque Maldi)
- déposer un volume de 1.5 µL de témoin positif (T+ : *E. coli*, fournie par le responsable de spectrométrie de masse) et recouvrir le dépôt avec 1.5 µL de matrice.
- déposer un volume de 1.5 µL de témoin négatif (T-) (1.5 µL de matrice seule) sur le spot de la ligne suivante de la même colonne.
- étaler une très petite quantité d'une colonie bactérienne pure et jeune de 24 heures en fine couche sur les lignes suivantes à l'aide d'une pointe de cône (de pipette) stérile de 10 µL.
- une fois que tous les dépôts des souches à identifier sont effectués (en deux exemplaires minimum), déposer 1.5 µL de matrice sur chaque spot.
- laisser sécher la cible sous PSM puis la ranger dans sa boîte plastique

4-2-5. Lancement du MALDI-TOF :

« Désorption-Ionisation » :

Après l'insertion de la cible dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control et lancer le spectromètre de masse (Microflex). Le Maldi-tof cible les protéines totales (notamment les protéines ribosomales). Un laser UV (de 337 nm de longueur d'onde) d'azote (N₂) est pulsé directement en direction de la cible. La matrice ayant une grande réactivité pour l'absorption de l'énergie du laser et la lumière UV, protégeant ainsi les molécules protéiniques de la dégradation. L'énergie du laser produit deux phénomènes: la matrice se vaporise libérant les peptides (désorption), ensuite, elle transfère ses protons à l'analyte qui l'ionise [Kuehl *et al.*, 2011; Seng *et al.*, 2009; Angeletti, 2017; Cariello, 2012].

« Spectrométrie à temps de vol (TOF) »

L'analyseur à temps de vol détecte le trajet de chaque molécule ionisée, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données sous forme de spectres qui seront comparés à une base de données [Kuehl *et al.*, 2011; Seng *et al.*, 2009; Angeletti, 2017; Cariello, 2012].

4-2-6. Lecture et identification

Le Maldi-TOF permet d'identifier une empreinte moléculaire unique d'un microorganisme, représenté par un spectre peptidique obtenu par Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation. Chaque spectre renferme plusieurs pics, et chaque pic correspond à un type de molécule (la plupart des pics dérivent de protéines ribosomales). En général, les pics dérivés par chaque souche sont stables, même lorsque les souches sont cultivées sur différents milieux ou sont analysées à différents âges de culture [Angeletti, 2017].

L'identification des souches s'effectue par la combinaison de deux logiciels, le Flex analysis (Bruker Daltonics) qui sélectionne les spectres corrects d'un poids moléculaire supérieur ou égale à 1000 DA, et le Biotyper Bruker V 3.0 télécharge et projette le spectre principale MSP (Main Spectra) pour chaque isolat, et par comparaison des spectres obtenus à la base des données (qui comporte 2881 spectres des espèces connues utilisées

comme référence), le logiciel Biotyper Bruker permet ainsi d'identifier les microorganismes jusqu'au niveau d'espèce. L'identification d'une bactérie au niveau d'espèce est considérée fiable si le score atteint une valeur supérieure ou égale à 1.9. Un score de 1.7 à 1.9 indique l'identification du genre, et un score inférieur à 1.7 n'indique aucune identification [Angeletti, 2017; Seng *et al.*, 2009; Cariello, 2012]. MSP dendrogramme a été construit à partir des spectres d'identification obtenus pour chaque souche, en utilisant le logiciel Biotyper Maldi-TOF, V 3.0.

5. Tests de sensibilité aux antibiotiques :

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des isolats d'entérocoques identifiés a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Muller-Hinton (MH) par l'utilisation des disques imprégnés d'antibiotiques selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les antibiotiques utilisés sont: l'amoxicilline (10µg), pénicilline (10µg), ampicilline (10µg), aminoglycosides hautement chargés (HC) « gentamicine (500µg) et kanamycine (1000µg) », tétracycline (30UI), tigécycline (15µg), érythromycine (15UI), chloramphénicol (30µg), vancomycine (30µg), linézolide (30µg), ciprofloxacine (5µg), nitrofurane (300µg) et triméthoprim / sulfaméthoxazole (1.25 / 23.75µg). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées pour la vancomycine et la tigécycline en utilisant la méthode E-test conformément aux directives du CA-SFM.

5-1. Méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton :

- **Principe :**

La méthode consiste à déposer à la surface de la gélose MH préalablementensemencée avec une culture pure et jeune de la souche à étudier, des disques de papier buvard imprégnés des différents antibiotiques testés. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque en créant un gradient de concentration décroissant. Après incubation, les disques peuvent s'entourer de zones d'inhibitions circulaires correspondant à une absence de culture. Les diamètres des zones d'inhibitions mesurés vont être comparés aux valeurs critiques standardisées.

- **Mode de réalisation :**

- À partir d'une culture jeune et pure des souches isolées, prélever à l'aide d'une anse de platine 2 à 3 colonies identiques.
- Décharger l'anse dans 09 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc farland ($\sim 10^8$ UFC/ml) ou à une D.O de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm
- Ensemencer l'inoculum par écouvillonnage sur la totalité de la surface gélosée du milieu MH, en tournant la boîte deux fois à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum (l'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum).
- Déposer à l'aide d'une pince stérile ou un distributeur des disques, les différents antibiotiques sur la surface gélosée.
- Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre.
- incuber à 37° pendant 18 à 24h

- **Lecture et interprétation :**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions en millimètres,
- Comparer ces diamètres aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture,
- Classer la souche dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire, résistante.

5-2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par E-test :

E-test est une technique quantitative permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques vis-à-vis des microorganismes. Lorsqu'une bandelette E.test est appliquée sur une boîte de gélose MH préalablement ensemencée, l'antibiotique est immédiatement diffusé de la bandelette et se dépose sur la surface de la

gélose. Un gradient continu de l'antibiotique se crée juste en dessous de la bandelette. Après 18 à 24 heures d'incubation, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme. La lecture de la CMI est effectuée au point d'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette. La valeur de CMI est exprimée en µg/ml.

6. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques :

Dans cette étude, nous avons utilisé des amorces spécifiques pour l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) six gènes de résistance aux antibiotiques, dont nous avons ciblé :

- Le gène blaZ codant pour la production de β -lactamase qui inactive les β -lactamines, notamment la pénicilline et l'ampicilline
- Le gène aac (6') - aph (2') codant pour l'enzyme bifonctionnelle (6' - aminoglycoside acetyltransferase- 2" aminoglycoside phosphotransférase), qui confère une résistance aux aminoglycosides (gentamicine, amikacine, tobramycine, kanamycine, nétilmicine)
- Le gène tetM de résistance à la tétracycline, codant pour la protéine de protection ou de liaison au ribosome
- Le gène ermB (érythromycine résistant méthylase) de résistance à l'érythromycine, codant pour l'enzyme ARNr 23S méthylase qui modifie par méthylation la cible « l'ARNr 23S »
- Le gène cat (chloramphénicol acetyltransférase) de résistance au chloramphénicol
- Les gènes vanC de résistance intrinsèque à la vancomycine.

La détection moléculaire des gènes de résistance mentionnés ci-dessus a été effectuée par PCR standard pour tous les isolats d'entérocoques (résistants et sensibles aux antibiotiques), sauf les gènes (vanC) ont été recherchés seulement chez les souches d'entérocoques intrinsèquement résistantes à la vancomycine, et les variants de ces gènes ont été désignés par séquençage.

6-1. PCR standard :

6-1-1. Extraction de l'ADN bactérien :

L'extraction de l'ADN de toutes les souches d'*Enterococcus* spp. a été effectuée en utilisant les kits d'extraction d'ADN EZ1 de Qiagen (Courtaboeuf, France) avec l'utilisation de l'automate EZ1 Advanced XL bio-robot selon les recommandations du fabricant.

Protocole d'extraction:

- Préparer une suspension bactérienne en ajoutant quelques colonies (2 à 3 colonies) d'une culture de 18 à 24 heures dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml contenant 180 µl de tampon G2 (ou d'eau distillée stérile) et 20 µl de Protéase QIAGEN (ou la protéinase K).
- Bien vortexer afin d'homogénéiser la suspension
- Mettre les tubes dans un bain sec à 70°C pendant 10 minutes
- Placer les tubes d'échantillons, les tubes d'élutions, les tips ainsi que la carte EZ1 DNA Bacteria dans l'automate, en suivant les instructions affichées à l'écran de l'EZ1 Advanced XL bio-robot.
- Choisir le volume d'élution 200 µl (50 µl ou 100 µl peuvent aussi être choisis)
- Lancer la purification
- Un maximum de 14 échantillons est réalisé à chaque fois (un run), et en fonction du volume d'élution, chaque run prend de 15 à 20 minutes.
- Récupérer les tubes d'élution contenant l'ADN pure et les conserver à -20°C.

6-1-2. Amplification par PCR :

- **Principe de la technique :**

La réaction de polymérisation en chaîne ou la PCR « polymerase chain reaction »), est une technique de réplique ciblée in vitro, consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN de longueur définie et permet d'obtenir une quantité importante d'une séquence précise d'ADN en utilisant un couple d'amorce spécifique (sens, anti sens).

Les gènes de résistance ciblés ont été amplifiés dans un thermocycleur de type BioRad.

- **Protocole de la PCR standard :**

Préparer le mélange réactionnel pour la PCR juste avant l'emploi. Ce mélange contient les composants suivants (tableau N° 02) :

Tableau 02: Composition du mélange réactionnel pour la PCR standard.

Composants	Quantité
Quantitect Probe PCR Master Mix Qiagen	12.5µl
H ₂ O UP	6.5 µl
Amorce sens	0.5 µl
Amorce antisens	0.5 µl
Volume total	20 µl

UP : ultra pure

Le Quantitect Probe PCR Master Mix Qiagen comporte les éléments suivants: des désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), une ADN polymérase thermorésistante (la Taq polymérase) et du magnésium (Mg++) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase.

Le volume du mélange réactionnel doit correspondre au nombre d'échantillons d'ADN à tester, plus un volume pour le témoin positif (ADN d'une souche portant le gène recherché) et un volume pour le témoin négatif (H₂O stérile à la place de l'ADN).

Mettre 20 µl du mélange réactionnel dans chaque puits de la plaque de PCR et puis ajouter 5 µl de l'ADN, introduire ainsi la plaque de PCR au thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems). En suivant les instructions du mode d'emploi de l'appareil, lancer le programme de la PCR qui dure environ 2 heures. Il comporte les étapes suivantes:

La dénaturation initiale, consiste à dénaturer l'ADN double brin par chauffage, généralement pendant 10 à 15 min à 95°C pour séparer les deux brins qui le compose. Cette étape est suivie par un cycle répété en grand nombre de fois pour obtenir une amplification importante de la séquence d'ADN cible, en moyenne, une PCR comporte

entre 20 et 40 cycles, à la fin du premier cycle le nombre de brins obtenu est le double du nombre de brins initialement présents, un cycle comporte les phases suivantes:

Une phase de dénaturation de 30 à 60 secondes à 94°C, une phase d'hybridation des amorces aux extrémités de la séquence d'ADN à amplifier (50 secondes, et une température de 50 à 65 °C en fonction de la longueur et la composition en désoxyribonucléotides des amorces). Une élongation des brins d'ADN grâce à la Taq polymérase à partir des deux amorces (72 °C : température optimale pour l'action de la Taq polymerase, temps variable selon la taille du fragment à amplifier). Et finalement, une étape de terminaison de 5 à 7 minutes à 72°C permet de finir l'amplification des brins inachevés.

La liste des amorces utilisées pour l'amplification des six gènes de résistance ciblés est illustrée dans le tableau N° 03.

6-2. Electrophorèse sur gel d'agarose:

Afin de vérifier la présence des gènes cibles, les produits de PCR obtenus sont examinés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel d'agarose est une matrice qui permet de séparer les fragments d'ADN amplifiés selon leur taille, sous l'effet d'un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction du poids moléculaire des fragments à séparer. Dans notre étude nous avons utilisé un gel de 1.5% d'agarose.

✓ Préparation du gel d'agarose :

- Dans un flacon en verre stérile, mélanger 6 g de poudre d'agarose avec 400 ml du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5 X
- Sous la haute chimique et avec port de gants, ajouter 15µl d'une solution de Sybersafe ou de Bromure d'Ethidium BET diluée (intercalant nucléotidique qui permettra la visualisation de l'ADN)
- Faire fondre le mélange dans un micro-onde, retirer le flacon et agiter le contenu pour bien mélanger. Répétez jusqu'à la dissolution complète de l'agarose
- Laisser refroidir (à environ 60°C)
- Verser l'agarose fondu dans le support du gel après avoir mis les peignes pour la formation des puits nécessaires pour le dépôt des produits PCR
- Laisser polymériser pendant 15 à 20 minutes à température ambiante
- Retirer les peignes après solidification du gel
- Mettre le gel dans la cuve à électrophorèse et couvrir la surface du gel avec le tampon TBE (le gel d'agarose doit être totalement immergé).

✓ Dépôt de l'ADN dans les puits et migration :

- Déposer le marqueur de taille (1000 pb)
- Mélanger 4 µl de produit PCR avec une goutte de bleu de charge et déposer ce mélange dans le puits du gel. Le bleu de charge permet de suivre dans quelle point notre échantillon d'ADN a migré.
- Déposer le témoin positif et le témoin négatif.
- Fermer la cuve à électrophorèse avec le couvercle, et mettre l'appareil en marche sous tension de 135 Volt pendant une durée de migration de 20 minutes.

- **Révélation des bandes d'ADN :**

- Après la migration électrophorétique, retirer le gel à partir de la cuve et égoutter l'excès du tampon
- Placer le gel dans l'appareil d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.
- Le gel est éclairé sous ultraviolet, la présence de la bande correspond au segment d'ADN amplifié
- La taille du fragment a été comparée avec le marqueur de taille et avec le témoin positif.
- Prendre une photo du gel

6-3. Séquençage :

6-3-1. Principe de séquençage :

La technique de séquençage a été effectuée selon la méthode de Sanger modifiée. Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de fragment d'ADN cible à l'aide d'une amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer, l'élongation de l'amorce nécessite la présence dans le milieu réactionnel les éléments suivants : l'ADN polymérase thermostable, les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ainsi qu'en faible concentration de l'un des quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). La différence entre ces ddNTP et les dNTP réside au niveau de leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des ddNTP est changée par une extrémité 3'H. Cette modification inhibe la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP intégré dans la chaîne du brin néo-synthétisé et le nucléotide suivant, l'élongation de la chaîne est alors interrompue. La détection des fragments néo-synthétisés se fait en incorporant un traceur radioactif de fluorescence spécifique pour chaque ddNTP, ce qui constitue le principe du séquençage par le BigDye. La taille de ces fragments est déterminée à l'aide d'un séquenceur qui les sépare en fonction de leur taille comme une électrophorèse classique, une suite de bases fluorescentes est alors obtenue correspond à l'ADN séquencé.

6-3-2. Protocole de séquençage :

Le séquençage passe par les étapes suivantes :

✓ Purification du produit de la PCR standard :

Le but de la purification est d'éliminer les résidus de la réaction PCR (amorces, dNTP, ...) afin d'obtenir des fragments d'ADN amplifiés propres. Le protocole de la purification est le suivant :

- Ajouter 175 µl d'eau distillée stérile au produit de PCR à purifier
- Mettre le mélange dans une plaque à filtre (plaque blanche Machery Nagel)
- Déposer la plaque sur une pompe d'aspiration pendant 15 minutes
- Ajouter 50 µl d'eau distillée stérile et agiter la plaque sur un agitateur pendant 20 minutes.
- Conserver les produits de PCR à une température de -4°C .

✓ PCR BigDye :

La PCR BigDye consiste à amplifier le brin sens et anti-sens séparément pour pouvoir les séquencer par la suite. Deux mélanges réactionnels séparés ont été préparés (un pour le brin sens et l'autre pour le brin anti-sens)

Le mélange réactionnel de la PCR BigDye pour chaque préparation sens ou anti-sens est composé des éléments suivants :

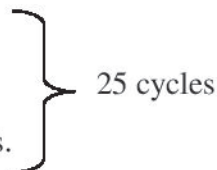
Tableau 04: Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye.

Composants	Quantité PCR BigDye
Tampon	3µl
Mix bigday	2 µl
Amorce	1 µl
H2O	10 µl
Volume total	16 µl

Un volume de 16 µl du mélange réactionnel est mis dans chaque puits de la plaque de PCR-bigDye, ajouter 4 µl du produit PCR purifié, puis introduire la plaque dans le thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems).

L'amplification pour la PCR BigDye est programmée en 25 cycles. Le programme de la PCR BigDye est comme suit :

Dénaturation initiale à 96°C pendant 5 minutes,

- dénaturation à 95°C pendant 10 secondes,
 - hybridation à 50°C pendant 5 secondes,
 - élongation de l'ADN à 60°C pendant 3 minutes.
- 

✓ **Purification des produits PCR BigDye sur plaque séphadex:**

Après la PCR-bigDye, retirer la plaque et procéder à la purification des produits de PCR BigDye selon le protocole suivant :

- Remplir les puits de la plaque de purification (plaque spécifique à filtre) par la poudre de séphadex.
- Ajouter 300µl d'eau distillée stérile (EDS), et laisser reposer pendant 2 à 3 heures.
- Afin d'éliminer l'excès de l'EDS, déposer la plaque de séphadex sur une plaque de séquençage vide (contenant des puits) et procéder à la centrifugation pendant 06 min à 12000 rpm et à une température de 4°C.
- Après avoir mis la plaque à filtre (ou la plaque à séphadex) au dessus d'une autre plaque de séquençage propre, déposer le produit de la PCR BigDye et recentrifuger la plaque dans les mêmes conditions.
- Récupérer le produit de centrifugation destiné à être séquencé dans la plaque de séquençage.

✓ **Séquençage et analyse des séquences :**

Placer la plaque de produit PCR BigDye purifié dans le séquenceur Automate ABI 3130, remplir le plan et démarrer le séquenceur. A la fin du séquençage on obtient des séquences nucléotidiques présentées sous forme d'un chromatogramme (Pic de couleur vert pour la base nucléotidique A, rouge pour T, bleu pour C et noir pour G). Le logiciel Codon Code Aligner a été utilisé pour la correction des séquences. Ces séquences sont ensuite examinées par comparaison par rapport à la base de données « GenBank » de l'NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et de l'ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene - ANNOTation) (<http://en.mediterranee-infection.com/article.php?laref=283%26titre=arg-annot>), en utilisant BlastN qui compare les bases azotées de l'ADN, et du BlastP qui compare les acides aminés de la protéine traduite. Les résultats sont ainsi exprimés en pourcentage d'homologie ou de similarité.

7. Génotypage par MLST « Multi-locus sequence typing » :

✓ **Principe :**

La méthode de MLST (Multilocus Sequence Typing) est une technique standardisée et universelle de biologie moléculaire. Elle permet le typage génétique par le séquençage des séquences nucléotidiques de plusieurs locus (ou allèles, généralement sept allèles) codant des gènes de ménage (gènes domestiques d'évolution lente, en anglais : housekeeping genes) qui sont importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont caractéristiques à chaque espèce et sont généralement stables dans le temps, dont le taux de mutation est faible. La méthode de MLST permet de différencier les souches au sein de la même espèce, par la distinction des différences, soit au niveau des variants des allèles (par recombinaison homologue), soit dans les séquences nucléotidiques des allèles (suite à une ou des mutations qui conduisent à l'apparition des nouveaux allèles), la combinaison des sept locus désigne le profil allélique pour chaque isolat ou le type de séquence (en anglais, ST : sequence type) [Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Werner, 2013; Feil and Spratt, 2001].

Au cours de notre étude, l'MLST a été effectué pour tous les isolats d'*E. faecalis* et *E. faecium*.

7-1. Génotypage d'*E. faecalis* :

- **Amorces et conditions de PCR pour MLST d'*E. faecalis***

Les amorces utilisées pour l'amplification des sept gènes de ménage d'*E. faecalis* sont mentionnées dans le tableau N° 05.

Tableau 05 : Liste des amorces utilisées pour MLST d'*E. faecalis*

[Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006]

Gènes	Séquences	Taille de l'amplicon
glucose-6-phosphate dehydrogenase		
<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase		
<i>gyd-1</i>	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	395
<i>gyd-2</i>	CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
phosphate ATP binding cassette transporter		
<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTCGC	583
<i>pstS-2</i>	ATTACATCACGTTCTACTTGC	
glucokinase		
<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
shikimate-5-dehydrogenase		
<i>aroE-1</i>	TGGAAACTTTACGGAGACAGC	459
<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	
xanthine phosphoribosyltransferase		
<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
acetyl-CoA acetyltransferase		
<i>yiqL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
<i>yiqL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

Les conditions de PCR pour toutes les réactions d'amplification sont les suivantes: dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 minutes; 30 cycles de (94°C pendant 30 secondes, 52°C pour 30 secondes, et 72°C pour 1 minutes); et extension à 72°C pendant 7 minutes [Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006]. Les mêmes amorces utilisées pour l'amplification sont utilisées pour le séquençage en suivant les mêmes étapes de séquençage mentionnées dans la **section 6-3**.

7-2. Génotypage d'*E. faecium* :

- **Amorces et conditions de PCR pour MLST d'*E. faecium* :**

Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de ménage de l'espèce *E. faecium* sont mentionnées dans le tableau N° 06.

Tableau 06: Liste des amorces utilisées pour MLST d'*E. faecium*

[Homan *et al.*, 2002]

Gènes	Séquences	Taille de l'amplicon (bp)
adenylate kinase		
adk-1	TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG	437
adk-2	GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT	
ATP synthase, alpha subunit		
atpA1	CGG TTC ATA CGGAAT GGC ACA	556
atpA-2	AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG	
D-alanine: D-alanine ligase		
ddl-1	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT	309
ddl-2	AAA AAGAAA TCG CAC CG	
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		
gdh-1	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT	530
gdh-2	CAT TTC GTT GTC ATA CCAAGC	
glucose-6-phosphate dehydrogenase		
gyd-1	CAA ACTGCT TAG CTC CAA GG C	395
gyd-2	CAT TTC GTT GTC ATA CCAAGC	
phosphoribosylaminoimidazol carboxylase ATPase subunit		

purK-1	GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT	492
purK-2	TAC ATA AAT CCC CCT GTT TC/T	
phosphate ATP-binding cassette transporter		
pstS-1	TTGAGCCAA GTCGAAGCTGGAG	583
pstS-2	CGTGATCACGTTCTACTTCC	

Les conditions de PCR comprennent une dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 min, 35 cycles de (94°C à 30 secondes, 50 °C à 30 secondes et 72°C à 30 secondes), puis 72°C à 5 minutes [Homan *et al.*, 2002]. Les mêmes amorces utilisées pour l'amplification sont utilisées pour le séquençage en suivant les mêmes étapes de séquençage mentionnées dans la **section 6-3**.

8. Analyse clonale et identification des complexes clonaux :

L'analyse phylogénétique des isolats d'*E. faecalis* et *E. faecium* a été réalisée par l'utilisation du logiciel bioinformatique eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net>). Ce logiciel permet de discriminer la parenté phylogénétique des séquences types obtenus par MLST et de définir les complexes clonaux (CCs, groupes dans lesquels chaque isolat partage au moins cinq allèles identiques avec au moins un autre isolat, le CC est formé par au moins trois types de séquences, initiés à partir d'un génotype fondateur).

9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques de la présente étude ont été effectuées en utilisant le logiciel Epi Info version 7, selon les recommandations du CDC (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Les différences sont considérées statistiquement significatives pour une valeur de $p < 0,05$.

RESULTATS

Résultats

1. Données des souches d'entérocoques isolées :

Au total 86 souches d'entérocoques ont été isolées de différents prélèvements pathologiques. Le tableau N° 07 présente les données de ces souches, à savoir : l'origine de prélèvement, le sexe et l'âge du patient, ainsi que l'établissement de santé.

Tableau 07 : Données des souches d'entérocoques

Numéro de souches	Prélèvement	Sexe	Age	Hôpital/service
01	sang	Homme	79 ans	A/réanimation
02	sang	Femme	68 ans	A/réanimation
03	sang	Femme	59 ans	A/chirurgie générale
4	urine	Homme	77 ans	G/infectieux
5	sang	Homme	81 ans	A/réanimation
6	urine	Homme	81 ans	A/réanimation
7	sang	Homme	76 ans	A/réanimation
8	sang	Homme	71 ans	A/réanimation
9	Pus	Homme	34 ans	G/ externe
10	urine	Femme	40 ans	G/infectieux
11	sang	Homme	67 ans	A/réanimation
12	sang	Homme	78 ans	A/réanimation
13	sang	Homme	03 ans	A/pédiatries
14	sang	Homme	78 ans	A/réanimation
15	sang	Homme	69 ans	A/réanimation
16	sang	Homme	71 ans	A/réanimation
17	sang	Homme	03 ans	A/réanimation
20	urine	Femme	65 ans	G/externe
21	urine	Homme	47 ans	G/externe
22	urine	Femme	76 ans	G/externe
23	urine	Femme	22 ans	G/externe
24	urine	Homme	76 ans	G/ infectieux

25	urine	Femme	63 ans	A/urologie
26	urine	Femme	79 ans	A/réanimation
27	sang	Homme	69 ans	A/réanimation
28	urine	Homme	71ans	A/réanimation
29	urine	Femme	53 ans	K/infectieux
30	urine	Homme	80 ans	K/infectieux
31	urine	Femme	62 ans	K/infectieux
32	urine	Homme	45 ans	G/ infectieux
33	urine	Femme	40 ans	A/réanimation
34	urine	Homme	50 ans	A/ externe
35	urine	Femme	63 ans	A/urologie
36	urine	Homme	59 ans	A/urologie
37	urine	Homme	17 ans	A/ réanimation
38	urine	Femme	25 ans	A/ réanimation
39	urine	Femme	27 ans	A/ externe
40	urine	Femme	41 ans	A/réanimation
41	urine	Homme	67 ans	A/urologie
42	urine	Femme	78 ans	A/réanimation
50	Pus	Femme	68 ans	A/chirurgie générale
51	urine	Femme	23 ans	A/ externe
52	Pus	Femme	51 ans	A/chirurgie générale
53	Pus	Homme	36 ans	K/pédiatrie
54	Pus	Homme	80 ans	A/réanimation
55	Pus	Homme	61 ans	A/ORL
56	Pus	Homme	77 ans	K/chirurgie générale
57	Pus	Homme	09 ans	K/traumatologie
58	sang	Femme	04 ans	A/réanimation
59	urine	Femme	30 ans	A/ externe
60	Pus	Femme	54 ans	A/chirurgie générale
61	Pus	Homme	79 ans	A/infectieux
62	Pus	Femme	47 ans	A/réanimation
63	Pus	Homme	79 ans	A/ réanimation

64	Pus	Homme	67 ans	A/ externe
65	sang	Homme	64 ans	A/réanimation
66	Pus	Femme	65 ans	A/réanimation
67	Pus	Homme	73 ans	A/réanimation
70	P. vaginal	Femme	28 ans	K/ externe
71	P. vaginal	Femme	22 ans	K/ externe
72	P. vaginal	Femme	40 ans	A/urologie
73	P. vaginal	Femme	66 ans	A/urologie
74	P. vaginal	Femme	F/64 ans	A/urologie
75	Pus	Femme	68 ans	G/externe
76	P. vaginal	Femme	24 ans	A/urologie
77	P. vaginal	Femme	43 ans	A/urologie
78	P. vaginal	Femme	24 ans	A/urologie
79	P. vaginal	Femme	30 ans	K/ externe
80	P. vaginal	Femme	53 ans	A/ urologie
81	Pus	Homme	81 ans	A/réanimation
82	P. vaginal	Femme	53 ans	K/infectieux
83	P. vaginal	Femme	49 ans	K/infectieux
84	P. vaginal	Femme	56 ans	A/urologie
85	P. vaginal	Femme	64 ans	A/urologie
86	P. vaginal	Femme	59 ans	A/urologie
87	P. vaginal	Femme	42 ans	A/externe
89	P. vaginal	Femme	25 ans	A/externe
90	Pus	Homme	59 ans	A/chirurgie générale
91	sperme	Homme	42 ans	A/ externe
92	P. vaginal	Femme	24 ans	G/externe
93	urine	Femme	30 ans	G/externe
94	urine	Homme	73 ans	G/externe
95	urine	Homme	67 ans	G/externe
96	urine	Homme	79 ans	G/Externe
97	urine	Femme	26 ans	G/externe
98	urine	Femme	36 ans	G/externe

Abréviations : A : Annaba, G : Guelma, K : El-kala, H : homme, F : femme, P. vaginal : prélèvement vaginal, ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

2. Identification des souches :

2-1. Tests microbiologiques standards :

L'aspect macroscopique des colonies sur gélose cœur cerveau est illustré dans la figure N° 01.



Figure 01 : Aspect macroscopique des colonies sur gélose cœur cerveau

Après 24 heures d'incubation à 37 °C sur gélose cœur cerveau, les souches ont donné des colonies de 1 mm de diamètre, elles sont lisses, régulières, brillantes, crémeuses et semi bombées.

L'examen microscopique après coloration de Gram a montré la présence des coques à Gram-positif, groupés en diplocoques, en courtes chaînettes ou isolés. L'absence de catalase a été notée chez tous les isolats.

Sur le milieu sélectif BEA les bactéries se présentent sous forme de petites colonies translucides entourées d'un halo noir (figure N° 02). La croissance de tous les isolats dans le bouillon hypertonique à 6.5% de NaCl a confirmé la présence du genre *Enterococcus*.

L'identification par le système miniaturisé API 20 Strep a permis d'identifier 95.34% (82/86) des souches (*E. faecalis* (n = 64), *E. faecium* (n =18)).

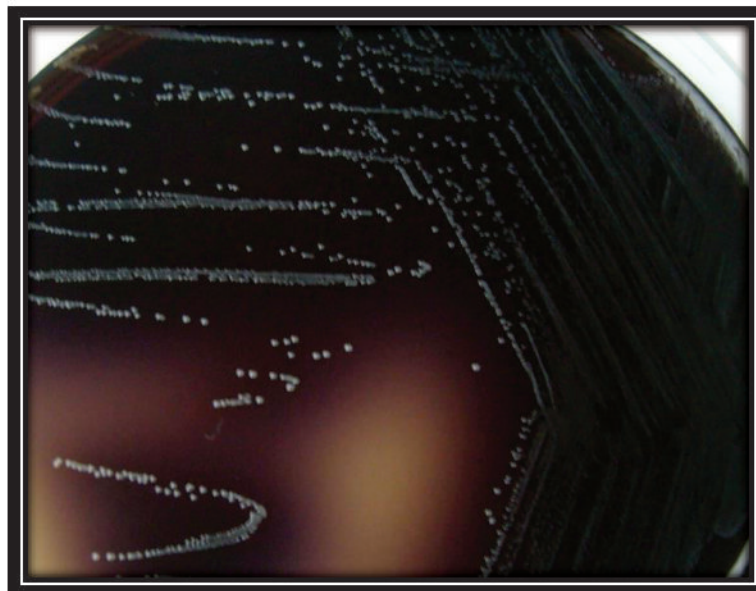


Figure 02 : Aspect macroscopique des colonies sur gélose bile-esculine-azide

2-2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis d'identifier la totalité des souches au niveau de l'espèce (64 (74.4%) *E. faecalis*, 18 (20.9%) *E. faecium*, 2 (2.3%) *E. gallinarum*, 1 (1.1%) *E. casseliflavus* et 1 (1.1%) d'*E. hirae*), la valeur moyenne du score d'identification est de 2.29.

Le tableau N° 08 montre les résultats d'identification des souches d'entérocoques par MALDI-TOF, dont nous avons choisi un exemple de chaque espèce identifiée. La figure N° 03 montre l'MSP dendrogramme des souches d'entérocoques identifiées.

Tableau 08 : Résultats d'identification des souches d'entérocoques par MALDI-TOF

Nombre de souches	Espèces identifiées	Valeur du score
64	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.412
18	<i>Enterococcus faecium</i>	2.473
2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2.011
1	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2.081
1	<i>Enterococcus hirae</i>	2.075

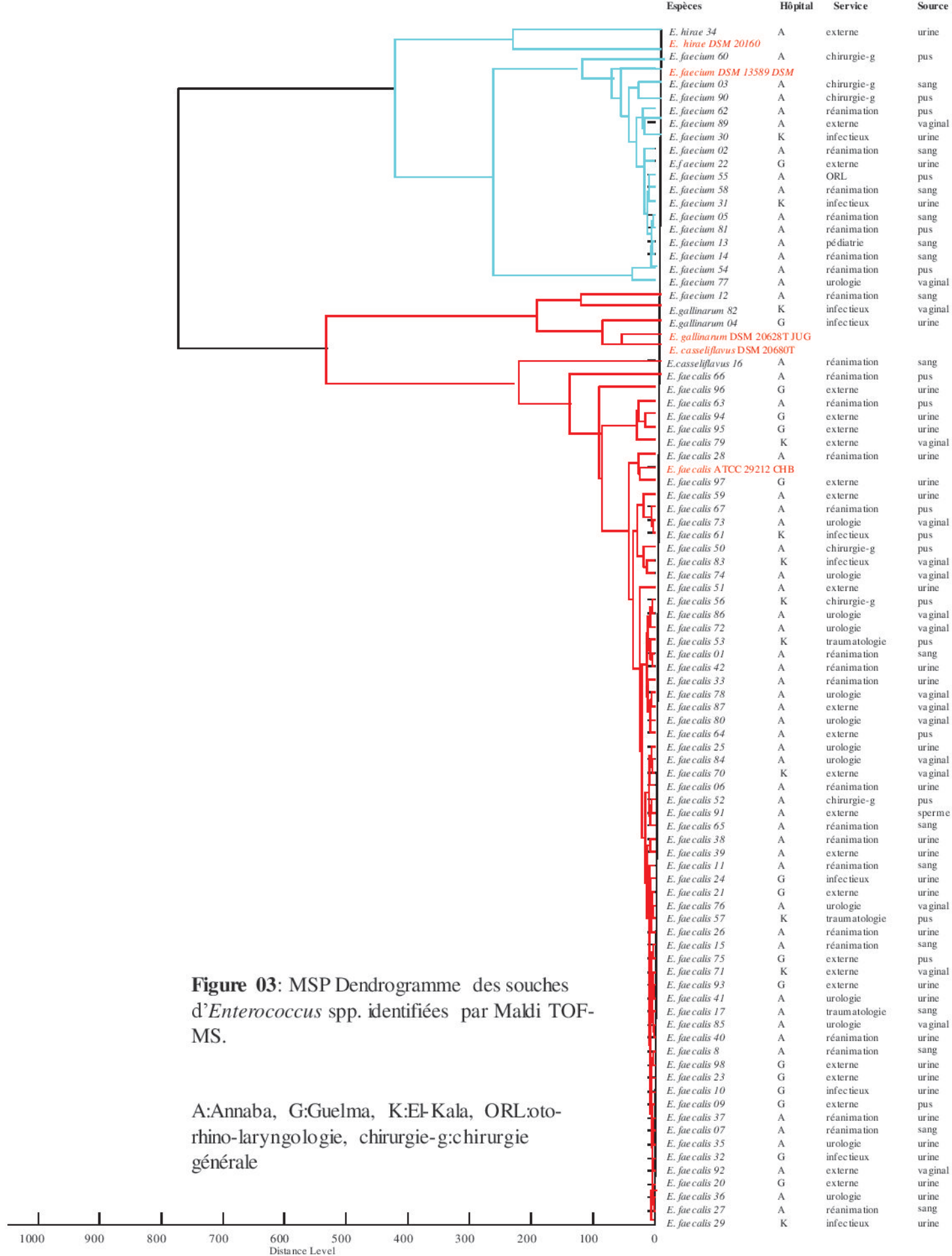


Figure 03: MSP Dendrogramme des souches d'*Enterococcus* spp. identifiées par Maldi TOF-MS.

A:Annaba, G:Guelma, K:El-Kala, ORL:oto-rhino-laryngologie, chirurgie-g:chirurgie générale

3- Répartition des souches selon la nature de prélèvement:

Sur les 86 souches d'entérocoques collectées, 33 (38,4%) souches ont été isolées des prélèvements urinaires, 18 (21,2%) du pus, 18 (21,2%) des prélèvements vaginaux, 16 (18,8%) du sang et 1 (1,2%) souche du sperme (figure N° 04).

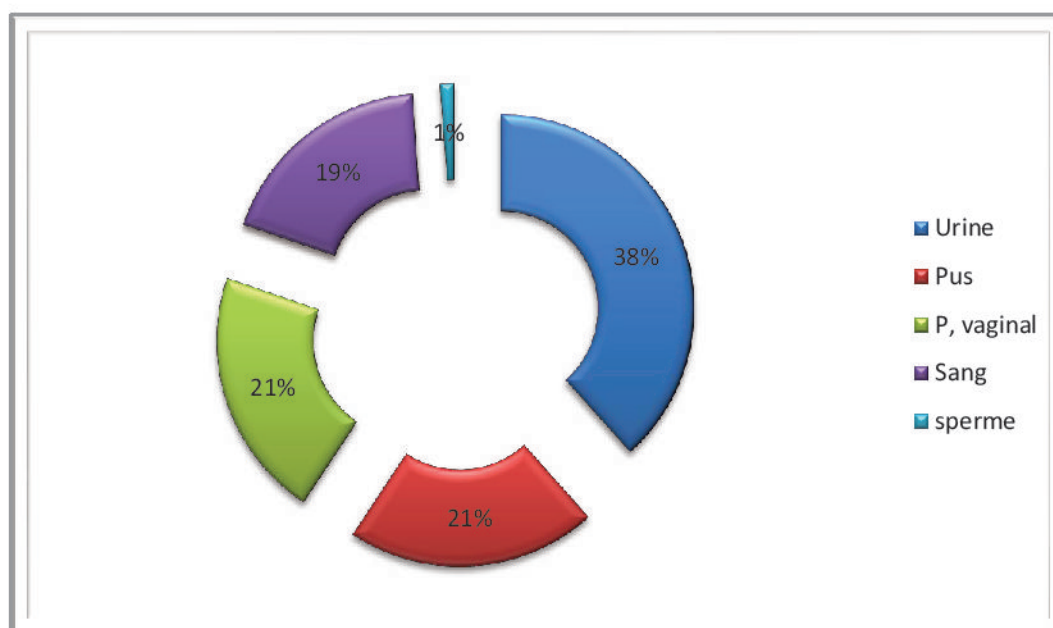


Figure 04: Répartition des souches selon la nature de prélèvement

4. Répartition des espèces selon la nature de prélèvement :

La répartition des espèces d'entérocoques selon la nature de prélèvement (tableau N° 09) nous a permis de noter que l'espèce *E. faecalis* est la plus isolée notamment dans les prélèvements urinaires, puis les prélèvements vaginaux. Pour les prélèvements de pus, nous avons remarqué qu'un tiers des souches isolées appartient également à l'espèce *E. faecalis*, tandis que un taux presque pareil a été enregistré chez les deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium* pour les prélèvements sanguins.

Tableau 09 : Répartition des espèces d'entérocoques selon la nature du prélèvement

Echantillons	Nombre de souches N(%)					
cliniques	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Total
Urine	28(84.8)	3(9)	1(3)	1(3)	0	33(38.4)
P. vaginal	15(83.3)	2(11.1)	1(5.5)	0	0	18(20.9)
Pus	12(66.6)	6(33.3)	0	0	0	18(20.9)
Sang	8(50)	7(43.7)	0	0	1(6.2)	16(18.6)
Sperme	1(100)	0	0	0	0	1(1.16)
Total	64(74.4)	18(20.9)	2(2.3)	1(1.1)	1(1.1)	86

5- Répartition des souches selon le type de patient :

Les isolats d'entérocoques collectés incluent des souches isolées des patients hospitalisés et des patients externes. La distribution de ces souches en fonction du type de patient est illustrée dans la figure N° 05.

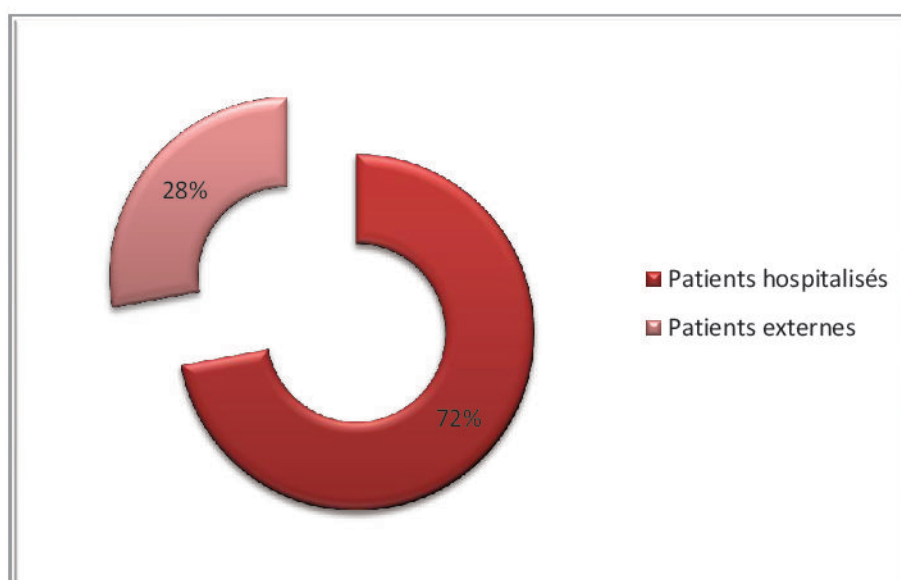


Figure 05: Répartition des souches selon le type de patient

6. Répartition des infections à entérocoques en fonction de l'âge et du sexe de patient :

- **En fonction de l'âge :**

Dans notre étude la tranche d'âge la plus touchée par les infections à entérocoques est celle supérieure à 55 ans avec un pourcentage de 54.6%. L'âge des patients inclus dans cette étude est entre 03 ans et 81 ans (Figure N° 06).

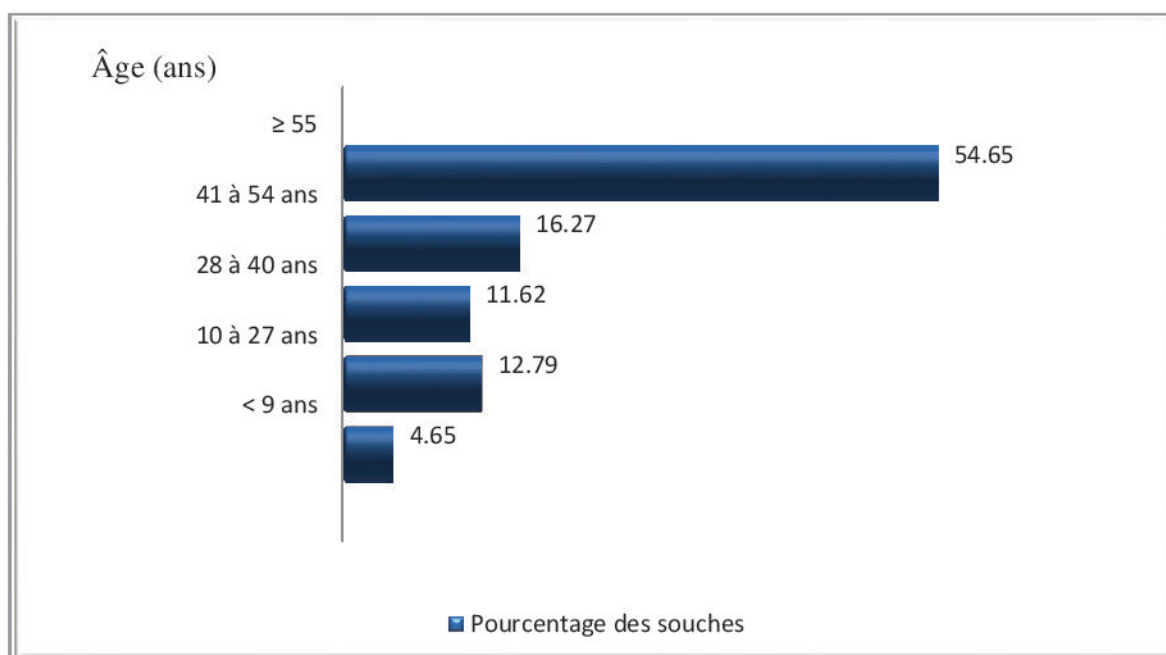


Figure 06 : Répartition des infections à entérocoques en fonction de l'âge

- **En fonction du sexe :**

La répartition des souches en fonction du sexe ne montre pas une grande différence entre les deux sexes féminin (53%) et masculin (47%), le sexe ratio égale 0.86 (figure N° 07)

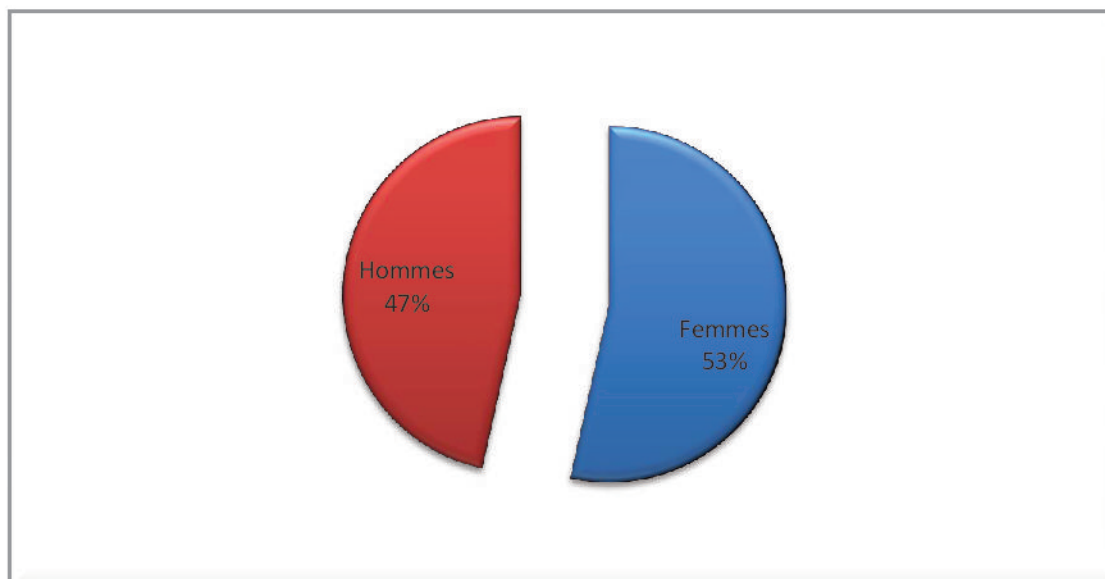


Figure 07 : Répartition des infections à entérocoques en fonction du sexe

7. Répartition des souches selon les services hospitaliers :

La répartition des souches d'entérocoques en fonction des services (figure N° 08) montre que le service de réanimation vient en premier rang, suivi par les services d'urologie, infectieux, chirurgie générale, pédiatrie, et puis les deux services ORL et traumatologie qui ont montré les pourcentages les plus faibles.

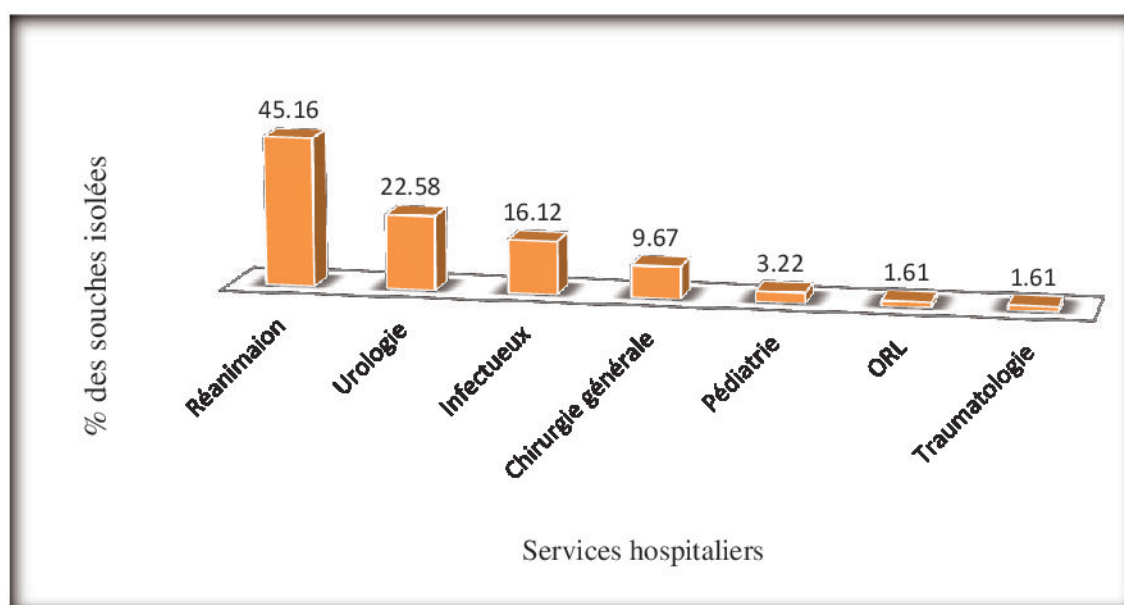


Figure 08: Répartition des souches selon les services hospitaliers

8. Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques :

8-1. Profil de résistance aux antibiotiques :

Le profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques étudiées est présenté dans la figure N° 09.

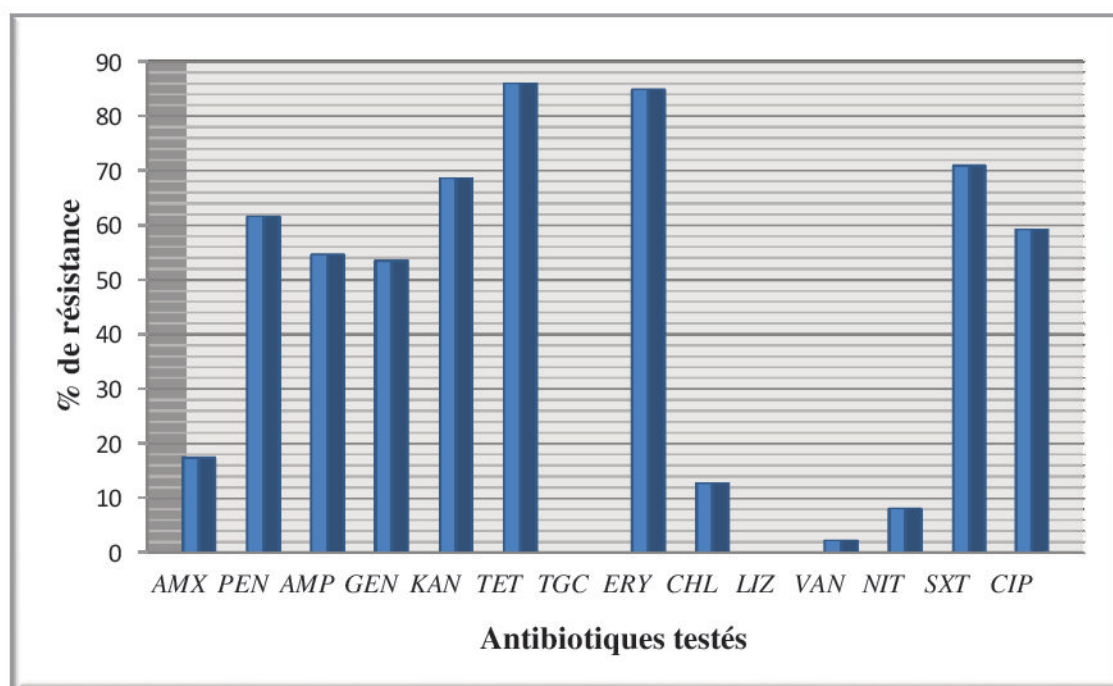


Figure 09 : Profil de résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques

Le profil de résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques montre que parmi les β -lactamines testés, l'amoxicilline était le plus actif, l'ampicilline et la pénicilline ont montré une activité modérée, avec une supériorité de l'ampicilline.

Pour les aminoglycosides, nous remarquons que la gentamicine était plus efficace sur notre collection que la kanamcine.

Concernant la famille des tétracyclines, nous observons que la tigécycline était active sur la totalité des souches, par contre, 86 % des souches étaient résistantes à la tétracycline.

L'inactivité de l'érythromycine a été assez marquée, dont plus de 84% des souches étaient résistantes à cet antibiotique. En revanche, le linézolide et la vancomycine ont démontré une activité prépondérante avec des pourcentages de sensibilité de 100 % et

97.7 %, respectivement. Les autres antibiotiques qui ont démontré une activité élevée sur les entérocoques sont: le chloramphénicol et le nitrofurane. La ciprofloxacine et le triméthoprim-sulfaméthoxazole ont montré une efficacité modérée.

8-2. Profil de résistance en fonction des espèces :

L'analyse des profils de résistance obtenus en fonction des espèces d'entérocoques identifiées a montré que les souches d'*E. faecium* étaient plus résistantes aux β -lactamines (amoxicilline, penicilline et ampicilline), aux aminoglycosides HC (gentamicine et kanamycine), au triméthoprim/sulfaméthoxazole et au ciprofloxacine par rapport aux souches d'*E. faecalis* (tableau N° 10). En plus, la résistance au nitrofurane n'a été détectée que parmi les souches d'*E. faecium*.

La résistance à l'érythromycine a été détectée chez toutes les espèces d'*Enterococcus* étudiées avec des pourcentages élevés. La tétracycline a été trouvée également inactive chez la plupart des souches d'*E. faecalis* (87.5) et *E. faecium* (88.9), ainsi que chez les deux souches d'*E. gallinarum*. En revanche, le chloramphénicol était inactif que sur neuf souches d'*E. faecalis* et deux souches d'*E. faecium*. La résistance à la vancomycine a été notée que chez les deux souches d'*E. gallinarum*. D'autre part, nous avons trouvé que toutes les espèces d'entérocoques étaient sensibles au linezolide et au tigécycline.

Les CMI de la tigécycline étaient inférieures à 0,25 mg/L pour la totalité des souches étudiées. Concernant les CMI de la vancomycine, nous avons trouvé que sur les 86 isolats, 84 (97,6%) étaient sensibles, avec des CMI <2 mg / L. Une seule souche (d'*E. casseliflavus*) avait une CMI de vancomycine de 4 mg / L; et les deux isolats d'*E. gallinarum* (S4 et S82) étaient résistants à la vancomycine avec des CMI de 6 mg / L et 8 mg / L, respectivement.

L'analyse statistique effectuée pour comparer statistiquement les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. faecalis* par rapport à ceux d'*E. faecium* a montré que l'espèce *E. faecium* est statistiquement plus résistante que l'espèce *E. faecalis* (valeur de $P < 0,05$) et ceci a été noté pour la majorité des antibiotiques testés (tableau N° 10).

Table 10: Profils de résistance aux antibiotiques des souches d'*Enterococcus* distribués en fonction des espèces et des types de patients

Espèces d'entérocoques	Profils de résistance													
	N(%)													
	AMX	PEN	AMP	GEN	KAN	TET	TGC	ERY	CHL	LIZ	VAN	NIT	SXT	CIP
<i>E.faecalis</i> (64)	0	39(60.9)	35(54.7)	31(48.4)	40(62.5)	56(87.5)	0	54(84.4)	9(14)	0	0	0	41(64)	34(53.1)
<i>E.faecium</i> (18)	15(83.3)	14(77.7)	12(66.6)	14(77.8)	16(88.9)	16(88.9)	0	15(83.3)	2(11.1)	0	0	7(38.9)	18(100)	16(88.9)
<i>E.gallinarum</i> (2)	0	0	0	0	2(100)	2(100)	0	2(100)	0	0	2(100)	0	1(50)	1(50)
<i>E.casseliflavus</i> (1)	0	0	0	1(100)	1(100)	0	0	1(100)	0	0	0	0	0	0
<i>E.hirae</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	1(100)	0	0	0	0	1(100)	0
Totale incidence	15(17.4)	53(61.6)	47(54.6)	46(53.5)	59(68.6)	74(86)	0	73(84.9)	11(12.8)	0	2(2.3)	7(8.3)	61(70.9)	51(59.3)
Valeur de $p^{(a)}$	$<10^{-7}$	0.18	0.36	0.02	0.03	0.5	Nd	>0.99	>0.99	Nd	Nd	10^{-5}	0.002	0.005
Patients hospitalisés (62)	15(24.2)	43(69.3)	39(62.9)	41(66.1)	50(80.6)	58(93.5)	0	57(91.9)	8(12.9)	0	2(3.2)	6(9.7)	49(79)	42(67.4)
Patients externes (24)	0	10(41.6)	8(33.3)	5(20.8)	9(37.5)	16(66.6)	0	16(66.6)	3(12.5)	0	0	1(4.16)	12(50)	9(37.5)
Valeur de $p^{(b)}$	0,008	0,01	0,01	0,0001	0,0001	0,006	Nd	0,01	>0.99	Nd	>0.99	0.7	0,007	0,01

AMX: Amoxicilline, PEN: Penicilline, AMP: ampicilline, GEN:Gentamicine, KAN: Kanamycine, TET: Tetracycline, TGC:Tigécycline, ERT: Erythromycine, CHL: Chloramphenicol, LNZ: Linézolide, VAN: Vancomycine, NIT:Nitrofurane, SXT: Trimethoprim/sulfamethoxazole, CIP: Ciprofloxacine

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Epi Info v.7 selon les recommandations de CDC, en comparant : ^(a) les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. faecalis* par rapport à ceux d'*E. faecium*, et ^(b) les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'Entérocoques isolées des patients hospitalisés à ceux isolés des patients communautaires.

8-3. Répartition des profils de résistance en fonction des types de patients :

Les profils de résistance obtenus sont classés selon les types de patients dans la figure N° 10.

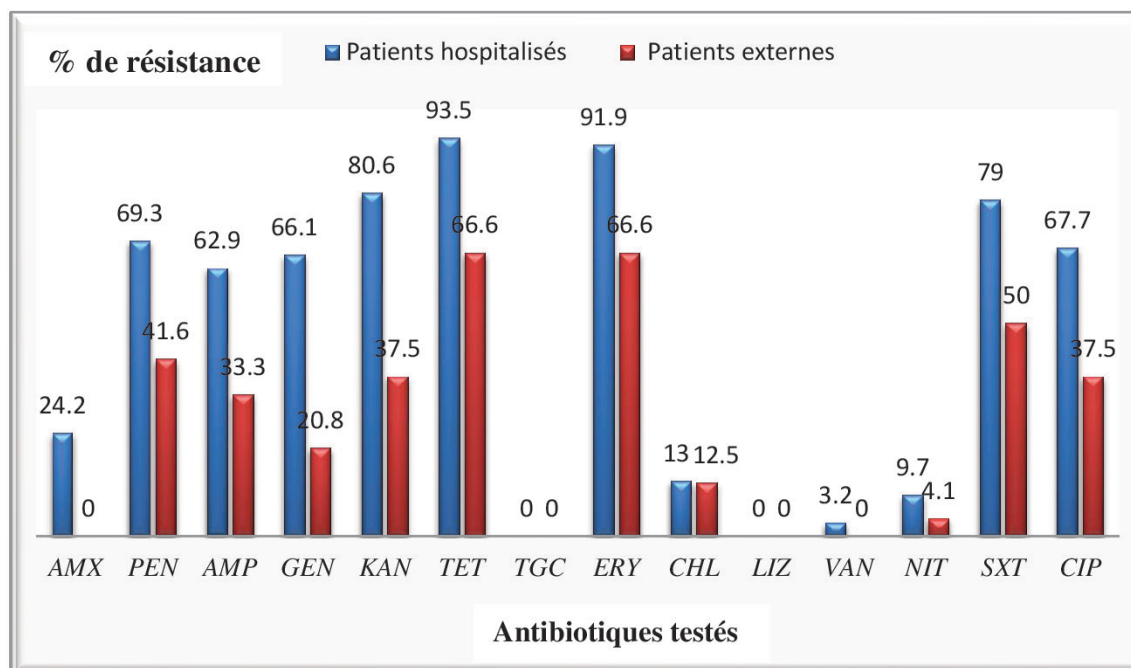


Figure 10 : Répartition des profils de résistance en fonction des types de patients

La comparaison des niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques d'origine hospitalière à ceux des souches isolées des patients externes nous a montré que les niveaux de résistance des souches isolées des patients hospitalisés étaient plus élevés que ceux détectés chez les souches d'origine communautaire. D'autre part, nous avons observé que la résistance à l'amoxicilline a été détectée seulement chez les souches d'origine hospitalière.

L'analyse statistique des résultats de l'antibiogramme par rapport aux types de patients a montré que les souches d'origine hospitalière étaient statistiquement ($P < 0.5$) plus résistantes que celles isolées du milieu extrahospitalier, et ceci a été noté pour la plupart des antibiotiques testés (tableau N° 10).

9. Identification moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques :

9-1. Profil moléculaire des gènes de résistance identifiés :

La caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques a révélé que tous les gènes de résistance examinés sont présents au sein de notre collection avec des pourcentages différents (figure N° 11).

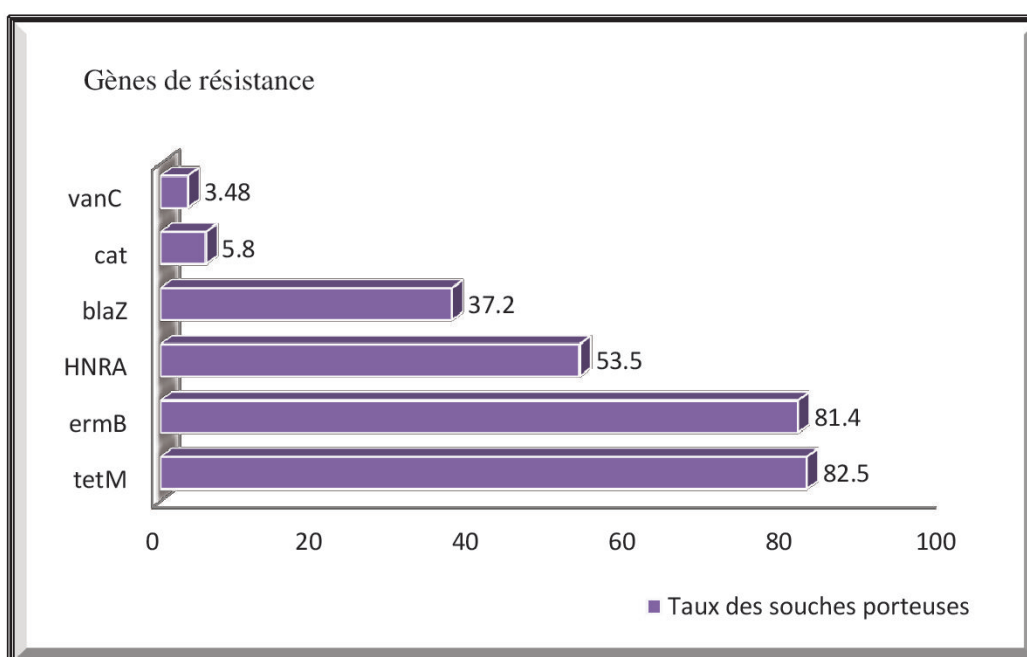


Figure 11 : Profil moléculaire des gènes de résistance identifiés

Au cours de notre étude, l'abréviation HNRA a été utilisée pour désigner le haut niveau de résistance aux aminoglycosides, codé par le gène *aac* (6') - *aph* (2').

Les gènes *tetM* et *ermB* sont les plus détectés avec des pourcentages de 82.5% et 81.4%, respectivement, suivis par les gènes HNRA et *blaZ*, le gène *cat* codant pour la résistance au chloramphénicol a été trouvé chez 5.8% des souches. Les gènes de la résistance intrinsèque à la vancomycine (*vanC*) ont été détectés chez 3.4% des souches.

11. Typage Moléculaire par MLST :

11-1. Génotypage d'*E. faecalis* :

Le typage moléculaire par MLST des 64 isolats d'*E. faecalis* a permis d'identifier 50 différents types de séquences (STs), comprenant l'ST6 (9.37%), qui est le fondateur à haut risque des lignées hospitalières épidémiques, et 38 nouveaux ST (NSTs) qui ne sont jamais été décrits dans la littérature (Annexe III).

Sur les 50 ST obtenus, 8 (16%) étaient représentés par au moins deux à six souches, et les 84 % restants étaient représentés par des isolats isolés.

Pour explorer davantage les nouveaux STs de nos isolats d'*E. faecalis*, nous l'avons comparé à ceux de la base de données MLST d'*E. faecalis*. Nous avons noté que parmi les 38 NSTs identifiés, 37 étaient dus à un ou des changements homologues au niveau des allèles (tableau N° 13), dont la variation génétique la plus détectée est au niveau de l'allèle *aroE* : 31 (84%).

Tableau 13: Comparaison des nouveaux STs d'*E. faecalis* avec la base de données MLST

NSTs (37 strains) n/ (%)	Variation génétique
31 (84%)	<i>aroE</i>
11(28%)	<i>xpt</i>
5(13.5%)	<i>gki</i>
4(11%)	<i>pst</i>
2(5.5%)	<i>gyd</i>
2(5.5%)	<i>yikl</i>
1(2.5%)	<i>gdh</i>

NST : nouveau type de séquence

Concernant le 38 ème NST représenté par la souche numéro 59, a été identifié suite à la découverte d'une mutation dans le gène de ménage *gyd* au niveau du nucléotide numéro 40 (C à la place de T) (figure N° 19); dont le fragment nucléotidique séquencé a été blasté à l'NCBI et a montré qu'il est très proche génétiquement à l'allèle *gyd*-1 avec un pourcentage

de similitude de 99%. Un numéro 29 a été attribué à ce nouvel allèle identifié (gyd-29); ce numéro 29 a été donné par la direction MLST d'*Enterococcus* après vérification du fichier de trace de la séquence nucléotidique mutée, et par conséquence le nouvel allèle gyd-29 était à l'origine de la création d'un nouveau ST : 576. Les NSTs d'*E. faecalis* et leurs allèles identifiés sont présentés dans la partie annexe (III).



Figure 19 : Détection d'une mutation dans le gène de ménage gyd d'*E. faecalis*

11-2. Génotypage d'*E. faecium* :

En ce qui concerne les 18 isolats d'*E. faecium*, sept ST ont été identifiés, y compris les trois lignées à haut risque « ST17 (44,4%), ST18 (5,6%) et ST78 (16,7%) », qui sont les fondateurs représentatifs du CC17, associé aux infections nosocomiales et les épidémies hospitalières.

Les quatre ST restants incluant l'ST262 (5,6%), et trois nouveaux STs identifiés pour la première fois dans cette étude chez l'espèce *E. faecium* [ST909 (16,7%), ST907 (5,6%) et ST908 (5,6%)].

Le nouveau ST 909 a été identifié chez trois souches d'*E. faecium* (S12, S13, S62) suite à une mutation ponctuelle dans le gène de ménage *purK* au niveau du nucléotide numéro 34 (figure N° 20), dont la comparaison du fragment nucléotidique séquencé avec la database du gène *purK* à l'NCBI a montré que notre séquence est très identique génétiquement (99%) avec l'allèle *purK* 1. Le nouvel allèle identifié est nommé *purK* 75. Les deux autres NSTs détectés (ST907 et ST908) ont été identifiés suite à l'observation des différences dans les variants des allèles (changements homologues dans les gènes de ménage). Les NSTs d'*E. faecium* et leurs allèles identifiés sont présentés dans la partie annexe III.



Les NSTs et allèles identifiés dans notre étude ont été soumis à la base de données MLST d'*E. faecalis* (<http://Efaecalis.mlst.net/>) et *E. faecium* (<http://efaecium.mlst.net/>).

Les résultats montrent que toutes les souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* représentées par les lignées hospitalières à haut risque, possèdent de deux à trois gènes de résistances.

D'autre part, nous avons constaté que deux souches d'*E. faecium* et une souche d'*E. faecalis*, représentées par les lignées hospitalières à haut risque, sont d'origine communautaires.

13. Structure clonale et analyse phylogénétique :

13-1. Structure clonale et analyse phylogénétique des souches d'*E. faecalis* :

L'analyse phylogénétique des différents types de séquences identifiés chez l'espèce *E. faecalis* par l'utilisation du logiciel eBURST V3 a montré la présence de 11 groupes (figure N° 21) comprenant 52 souches, et 12 isolats sont classés comme singletons ou séparés.

Au sein des groupes nous avons identifié neuf complexes clonaux (CC): un nouveau complexe clonal CC256 (6,3%), le CC2 (32,8%) attribué aux lignées associées aux infections hospitalières, plus sept groupes qui ont été attribués aux complexes clonaux connus suivants: CC 8 (1,6%); CC10 (3,1%); CC16 (4,7%); CC19 (1,6%); CC21 (14,1%); CC25 (4,7%); et CC30 (1,6%).

Les deux autres groupes ne sont attribués à aucun complexe clonal.

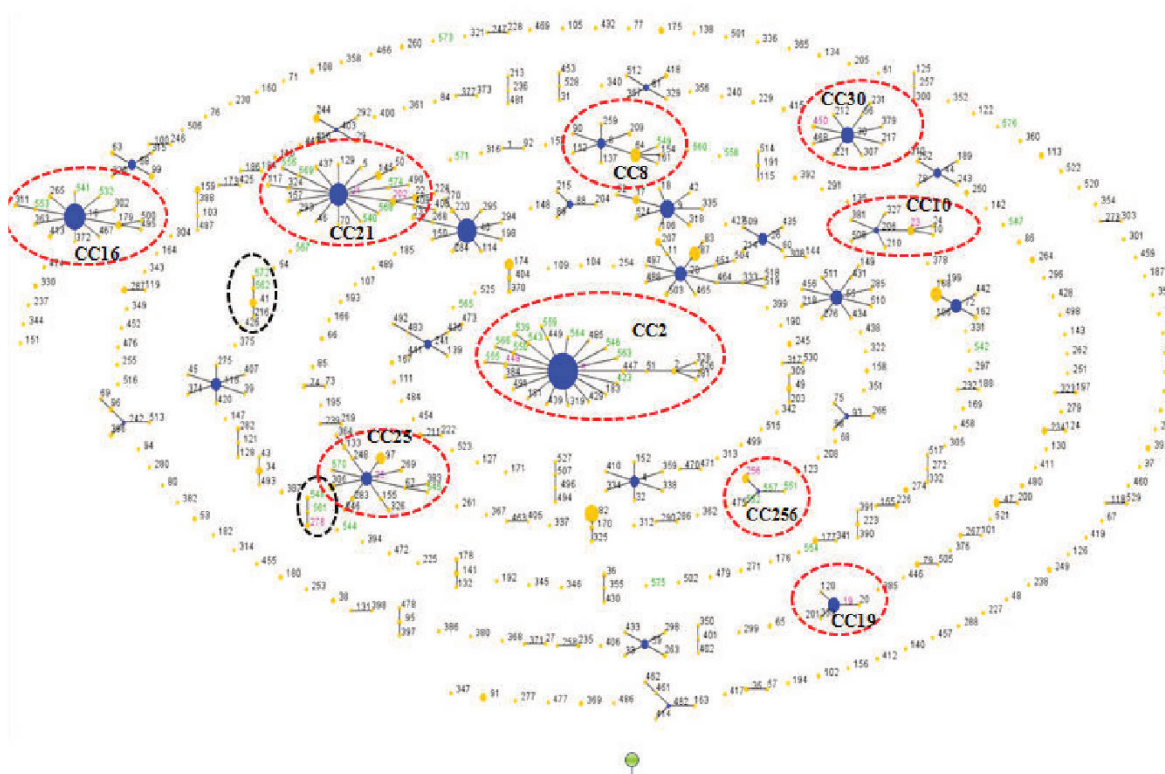


Figure 21 : Structure clonale des souches d'*E. faecalis* par l'utilisation du logiciel eBURST

Les données de MLST ont été analysées avec le logiciel eBURST en comparant les STs d'*E. faecalis* identifiés avec les STs de la base de données MLST. Les cercles bleus représentent les ancêtres présumés des complexes clonaux (CC), l' ST6, qui est l'ancêtre du CC2 était l' ST le plus fréquent en comparaison avec les autres STs; les cercles jaunes représentent d'autres types de séquences (ST). La taille du cercle est proportionnelle au nombre des STs; les numéros colorés en noir représentent les STs de la base de données; les numéros verts représentent les NSTs trouvés dans cette étude. Les numéros roses représentent les STs communs (des STs de la base de données et des STs caractérisés dans cette étude); les CCs identifiés dans cette étude sont indiqués par des cercles de contour rouge pointillé; les cercles de contour noir pointillé indiquent les groupes qui ne sont attribués à aucun CC.

13-2. Structure clonale et analyse phylogénétique des souches d'*E. faecium* :

Concernant l'espèce *E. faecium*, nous avons trouvé que 16 souches sur 18 (88.9%) sont attribuées au complexe clonal CC17, associé aux infections acquises à l'hôpital. D'autre part, l'analyse phylogénétique a révélé l'existence des trois lignées (ST17, 18 et 78), qui sont les fondateurs représentatifs de CC17. Les STs 262 et 909 sont attribués au CC17, et les deux STs (907 et 908) ne sont attribués à aucun complexe clonal, et sont considérés comme singletons ou séparés.

La figure N° 22 montre la distribution des STs identifiés, ainsi que les CCs déterminés en fonction des souches d'entérocoques étudiées.

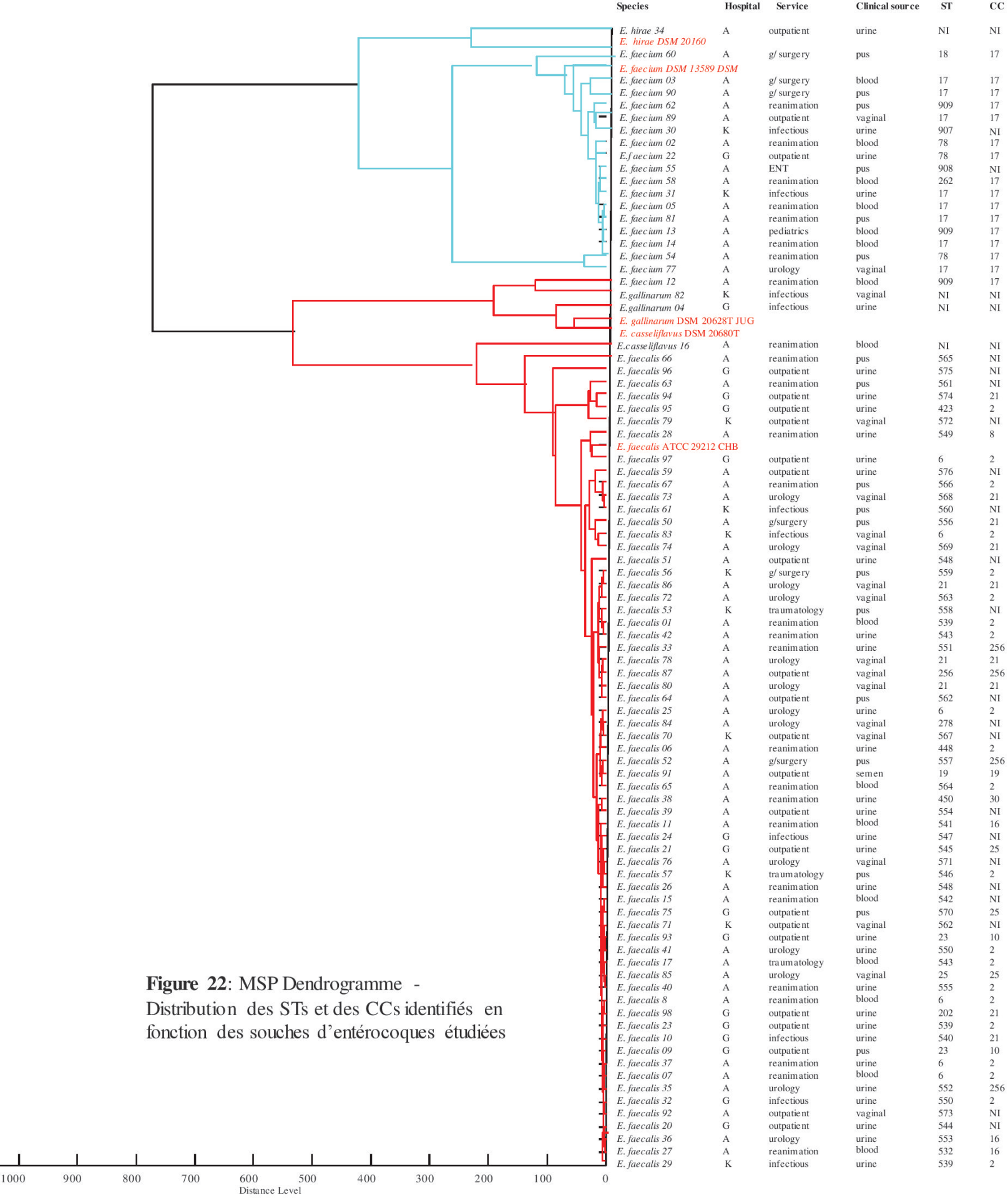


Figure 22: MSP Dendrogramme -
Distribution des STs et des CCs identifiés en
fonction des souches d'entérocoques étudiées

3- Répartition des souches selon la nature de prélèvement:

Sur les 86 souches d'entérocoques collectées, 33 (38,4%) souches ont été isolées des prélèvements urinaires, 18 (21,2%) du pus, 18 (21,2%) des prélèvements vaginaux, 16 (18,8%) du sang et 1 (1,2%) souche du sperme (figure N° 04).

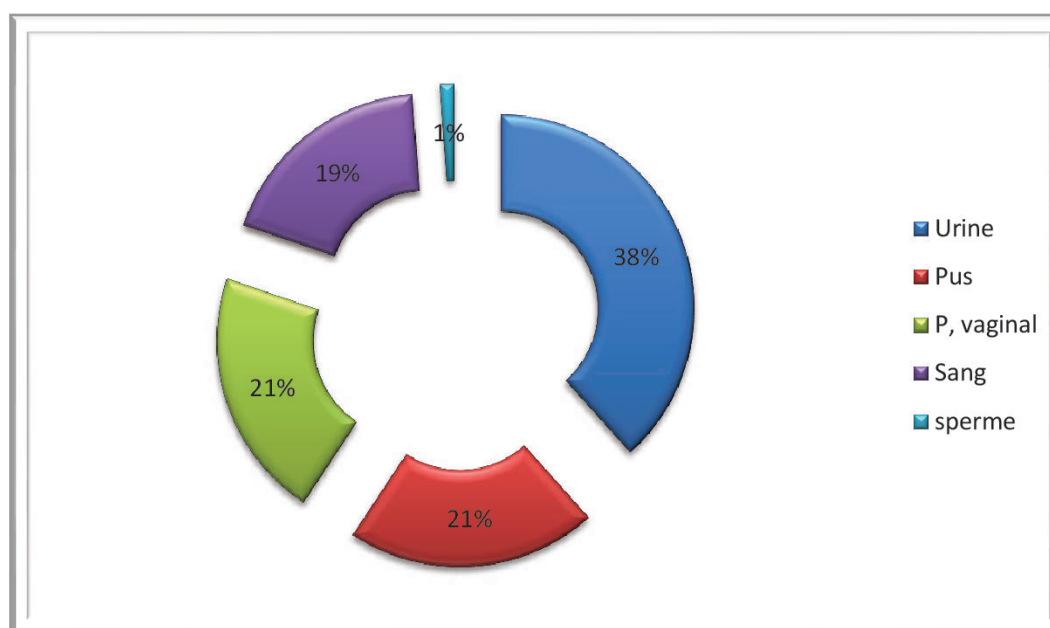


Figure 04: Répartition des souches selon la nature de prélèvement

4. Répartition des espèces selon la nature de prélèvement :

La répartition des espèces d'entérocoques selon la nature de prélèvement (tableau N° 09) nous a permis de noter que l'espèce *E. faecalis* est la plus isolée notamment dans les prélèvements urinaires, puis les prélèvements vaginaux. Pour les prélèvements de pus, nous avons remarqué qu'un tiers des souches isolées appartient également à l'espèce *E. faecalis*, tandis que un taux presque pareil a été enregistré chez les deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium* pour les prélèvements sanguins.

Tableau 09 : Répartition des espèces d'entérocoques selon la nature du prélèvement

Echantillons	Nombre de souches N(%)					
cliniques	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Total
Urine	28(84.8)	3(9)	1(3)	1(3)	0	33(38.4)
P. vaginal	15(83.3)	2(11.1)	1(5.5)	0	0	18(20.9)
Pus	12(66.6)	6(33.3)	0	0	0	18(20.9)
Sang	8(50)	7(43.7)	0	0	1(6.2)	16(18.6)
Sperme	1(100)	0	0	0	0	1(1.16)
Total	64(74.4)	18(20.9)	2(2.3)	1(1.1)	1(1.1)	86

5- Répartition des souches selon le type de patient :

Les isolats d'entérocoques collectés incluent des souches isolées des patients hospitalisés et des patients externes. La distribution de ces souches en fonction du type de patient est illustrée dans la figure N° 05.

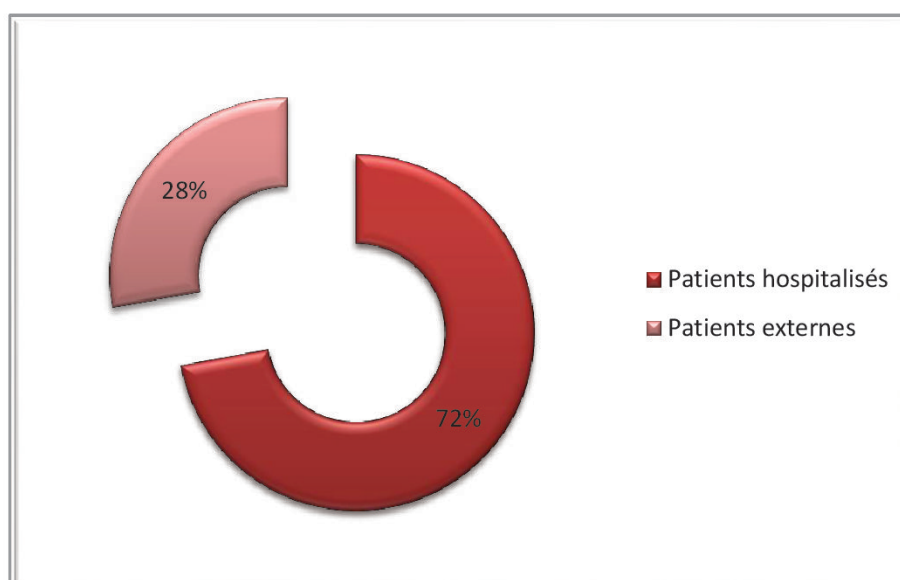


Figure 05: Répartition des souches selon le type de patient

6. Répartition des infections à entérocoques en fonction de l'âge et du sexe de patient :

- **En fonction de l'âge :**

Dans notre étude la tranche d'âge la plus touchée par les infections à entérocoques est celle supérieure à 55 ans avec un pourcentage de 54.6%. L'âge des patients inclus dans cette étude est entre 03 ans et 81 ans (Figure N° 06).

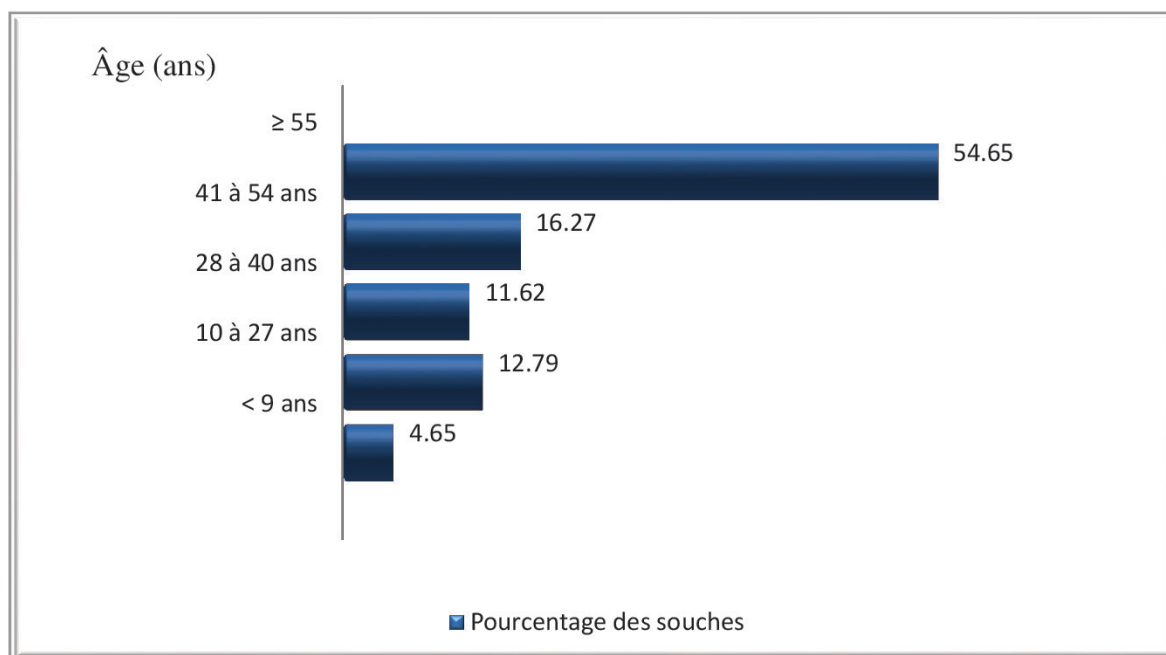


Figure 06 : Répartition des infections à entérocoques en fonction de l'âge

- **En fonction du sexe :**

La répartition des souches en fonction du sexe ne montre pas une grande différence entre les deux sexes féminin (53%) et masculin (47%), le sexe ratio égale 0.86 (figure N° 07)

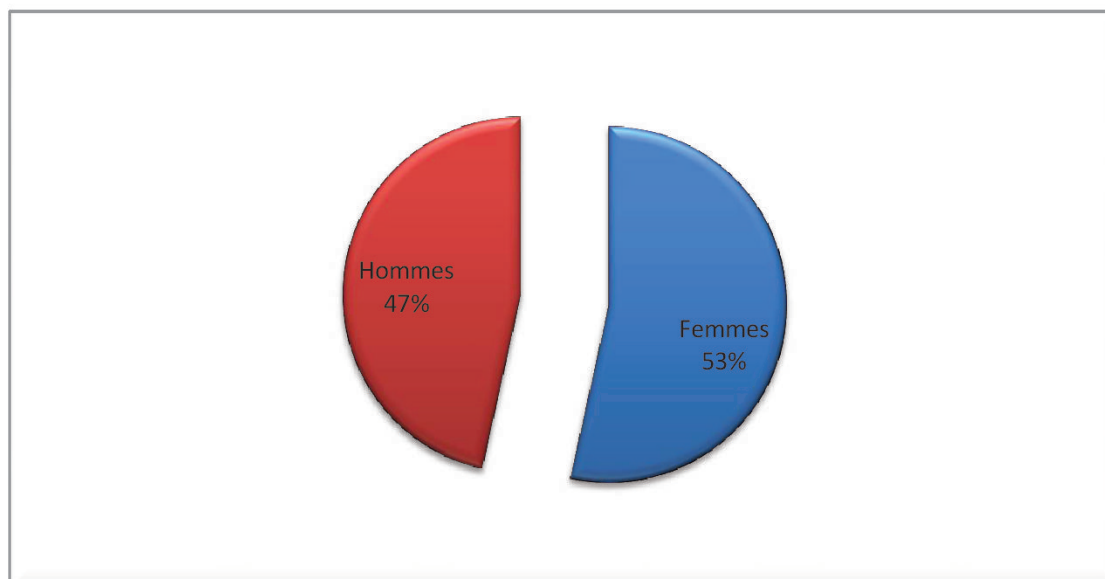


Figure 07 : Répartition des infections à entérocoques en fonction du sexe

7. Répartition des souches selon les services hospitaliers :

La répartition des souches d'entérocoques en fonction des services (figure N° 08) montre que le service de réanimation vient en premier rang, suivi par les services d'urologie, infectieux, chirurgie générale, pédiatrie, et puis les deux services ORL et traumatologie qui ont montré les pourcentages les plus faibles.

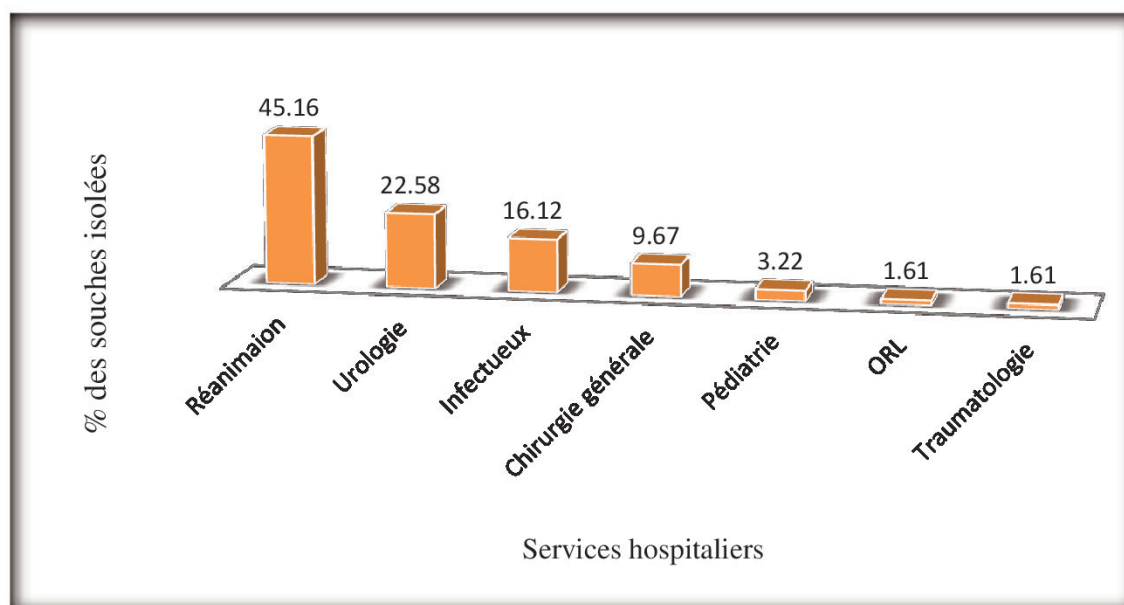


Figure 08: Répartition des souches selon les services hospitaliers

8. Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques :

8-1. Profil de résistance aux antibiotiques :

Le profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques étudiées est présenté dans la figure N° 09.

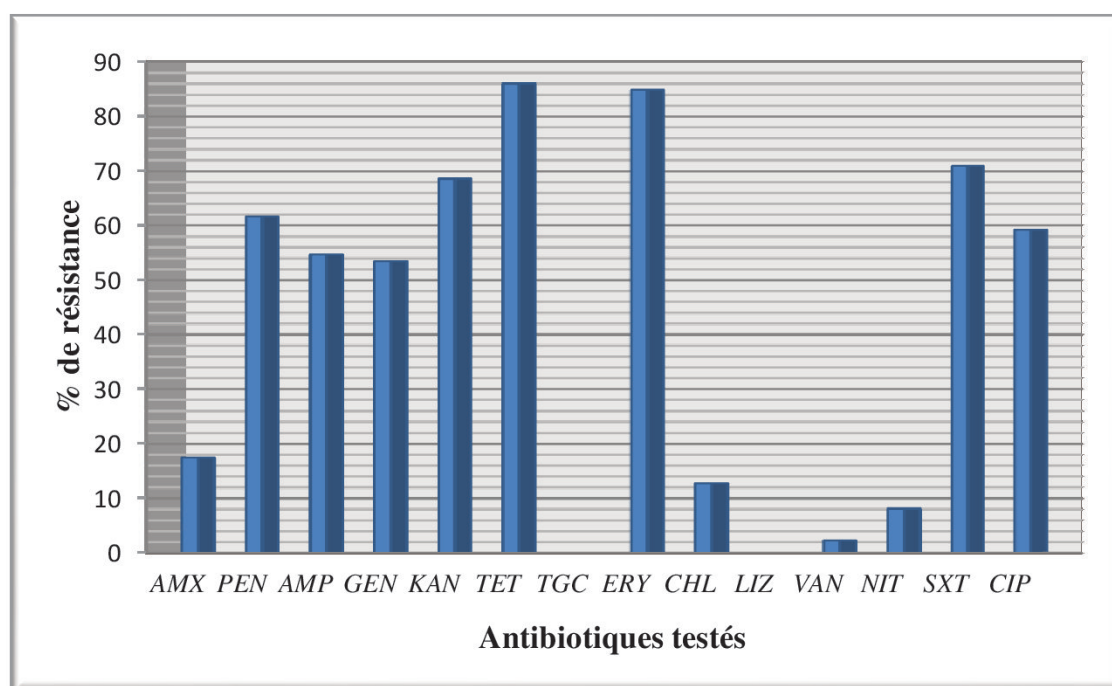


Figure 09 : Profil de résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques

Le profil de résistance des souches d'entérocoques aux antibiotiques montre que parmi les β -lactamines testés, l'amoxicilline était le plus actif, l'ampicilline et la pénicilline ont montré une activité modérée, avec une supériorité de l'ampicilline.

Pour les aminoglycosides, nous remarquons que la gentamicine était plus efficace sur notre collection que la kanamcine.

Concernant la famille des tétracyclines, nous observons que la tigécycline était active sur la totalité des souches, par contre, 86 % des souches étaient résistantes à la tétracycline.

L'inactivité de l'érythromycine a été assez marquée, dont plus de 84% des souches étaient résistantes à cet antibiotique. En revanche, le linézolide et la vancomycine ont démontré une activité prépondérante avec des pourcentages de sensibilité de 100 % et

97.7 %, respectivement. Les autres antibiotiques qui ont démontré une activité élevée sur les entérocoques sont: le chloramphénicol et le nitrofurane. La ciprofloxacine et le triméthoprim-sulfaméthoxazole ont montré une efficacité modérée.

8-2. Profil de résistance en fonction des espèces :

L'analyse des profils de résistance obtenus en fonction des espèces d'entérocoques identifiées a montré que les souches d'*E. faecium* étaient plus résistantes aux β -lactamines (amoxicilline, pénicilline et ampicilline), aux aminoglycosides HC (gentamicine et kanamycine), au triméthoprim/sulfaméthoxazole et au ciprofloxacine par rapport aux souches d'*E. faecalis* (tableau N° 10). En plus, la résistance au nitrofurane n'a été détectée que parmi les souches d'*E. faecium*.

La résistance à l'érythromycine a été détectée chez toutes les espèces d'*Enterococcus* étudiées avec des pourcentages élevés. La tétracycline a été trouvée également inactive chez la plupart des souches d'*E. faecalis* (87.5) et *E. faecium* (88.9), ainsi que chez les deux souches d'*E. gallinarum*. En revanche, le chloramphénicol était inactif que sur neuf souches d'*E. faecalis* et deux souches d'*E. faecium*. La résistance à la vancomycine a été notée que chez les deux souches d'*E. gallinarum*. D'autre part, nous avons trouvé que toutes les espèces d'entérocoques étaient sensibles au linezolide et au tigécycline.

Les CMI de la tigécycline étaient inférieures à 0,25 mg/L pour la totalité des souches étudiées. Concernant les CMI de la vancomycine, nous avons trouvé que sur les 86 isolats, 84 (97,6%) étaient sensibles, avec des CMI <2 mg / L. Une seule souche (d'*E. casseliflavus*) avait une CMI de vancomycine de 4 mg / L; et les deux isolats d'*E. gallinarum* (S4 et S82) étaient résistants à la vancomycine avec des CMI de 6 mg / L et 8 mg / L, respectivement.

L'analyse statistique effectuée pour comparer statistiquement les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. faecalis* par rapport à ceux d'*E. faecium* a montré que l'espèce *E. faecium* est statistiquement plus résistante que l'espèce *E. faecalis* (valeur de $P < 0,05$) et ceci a été noté pour la majorité des antibiotiques testés (tableau N° 10).

14. Répartition des souches selon les complexes clonaux identifiés

La répartition des isolats d'*E. faecalis* selon les complexes clonaux identifiés (figure N° 23) montre que le plus grand nombre des STs identifiés dans cette étude (21/64, 32,8%) est représenté par le CC2. Le CC21 a été détecté chez 14% des souches, tandis que tous les autres complexes clonaux identifiés (CC256, CC16, CC25, CC10, CC30, CC8 et le CC19) sont attribués à 23% des souches d'*E. faecalis*. D'autre part, nous avons trouvé que 30% des souches ne sont assignées à aucun complexe clonal.

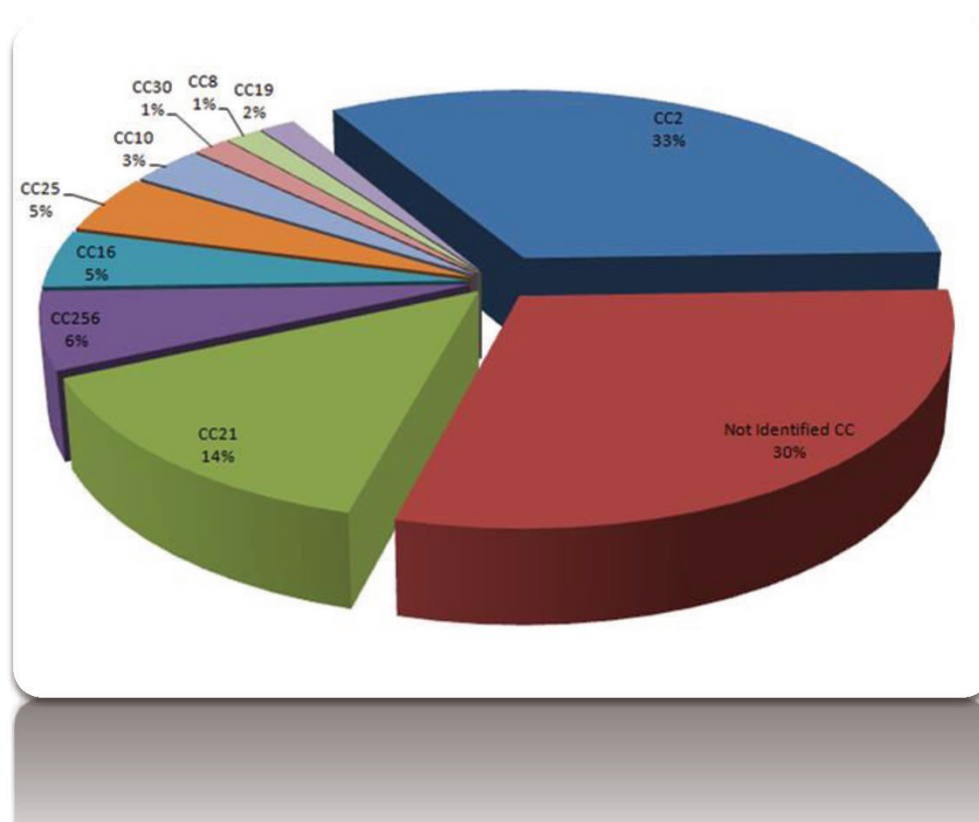


Figure 23: Répartition des isolats d'*E. faecalis* selon les complexes clonaux identifiés

Concernant l'espèce d'*E. faecium*, comme mentionné dans la section (12-2), nous avons identifié qu'un seul complexe clonal CC17 chez 16 souches; les 2 souches restantes ne sont assignées à aucun complexe clonal.

15. Répartition des complexes clonaux épidémiques en fonction des types de patients :

La répartition des complexes clonaux adaptés à l'hôpital et responsables des épidémies hospitalières (CC2 pour *E. faecalis* et CC17 pour *E. faecium*) en fonction des types de patients a révélé la présence de trois souches d'*E. faecalis* (d'origine urinaire) et deux souches d'*E. faecium* (une isolée de prélèvement vaginal et l'autre d'origine urinaire), isolées des patients communautaires, sont représentées par le CC2 et CC17, respectivement (tableau N° 15).

Tableau 15 : Répartition des complexes clonaux associés aux épidémies hospitalières en fonction des types de patients

Espèce d'entérocoques	Origine des souches	Complexes clonaux épidémiques	
		CC2	CC17
<i>E. faecalis</i>	Hospitalière	61	-
	Externe	3	-
<i>E. faecium</i>	Hospitalière	-	16
	Externe	-	2

DISCUSSION

Les entérocoques sont des bactéries pathogènes opportunistes caractérisés par leur résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques, et sont capables d'acquérir de nouveaux gènes de résistance aux antibactériens [Byappanahalli *et al.*, 2012; Poulsen *et al.*, 2012b; Castillo-Rojas *et al.*, 2013; Chibebe *et al.*, 2013]. De ce fait, ces bactéries sont devenues des agents pathogènes importants responsables d'infections nosocomiales et aussi communautaires [Abat *et al.*, 2016a; Werner G, 2013; Tan *et al.*, 2010]. Les entérocoques sont responsables de diverses maladies infectieuses, telles que l'endocardite, la bactériémie, la méningite, les infections des plaies, les infections urinaires et les infections intra-abdominales [Tan *et al.*, 2010; Dahl *et al.*, 2016; Bourafa *et al.*, 2015; Poulsen *et al.*, 2012b; Madsen *et al.*, 2017].

Les objectifs visés par notre étude consistaient à identifier des souches d'entérocoques isolées à partir des patients hospitalisés et communautaires au niveau de trois établissements de santé de l'Est Algérien (Annaba, Guelma et El-kala), d'évaluer leurs niveaux de résistance aux antibiotiques, d'identifier génétiquement les mécanismes de résistance aux antibiotiques, d'étudier la structure génétique de la population et l'épidémiologie moléculaire afin de discriminer les lignées épidémiques ainsi que les relations phylogénétiques.

Les tests microbiologiques standards réalisés sur notre collection de 86 souches d'entérocoques ont montré que tous les isolats sont des cocci à Gram-positif, catalase négative; ils ont tous hydrolysé l'esculine en présence de 40% de sels biliaries et ont pu se développer dans le milieu hypertonique contenant 6,5% de NaCl. Sur la base de ces tests, nous pouvons suspecter l'appartenance de ces isolats au genre *Enterococcus* [Byappanahalli *et al.*, 2012; Fisher and Phillips, 2009; Abamecha *et al.*, 2015].

L'identification biochimique par l'utilisation de la galerie miniaturisée API20 Strep a permis d'identifier 97.7% des souches: *E. faecalis* (n = 64), *E. faecium* (n =18) et *E. gallinarum* (n = 2), tandis que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a pu caractériser tous les isolats d'*Enterococcus* au niveau de l'espèce avec un bon score d'identification.

E. faecalis était l'espèce la plus dominante de nos isolats (74.4%), *E. faecium* vient en deuxième position, avec un taux de 21%. Les autres espèces d'entérocoques identifiées (*E. casseliflavus*, *E. hirae* et *E. gallinarum*) n'ont présenté que 4.6% des souches isolées, ce

qui est comparable à la répartition des espèces d'entérocoques dans d'autres études [Sreeja *et al.*, 2012;Djahmi *et al.*, 2012;Jia *et al.*, 2014;Emaneini *et al.*, 2016;Yadegarynia and Arab-Mazar, 2016].

Le MALDI-TOF est considéré comme un outil puissant, rapide et hautement précis, capable d'identifier les souches bactériennes au niveau de l'espèce par analyse de leurs protéines totales (notamment les protéines ribosomales et les protéines associées aux membranes) en une durée inférieure à une heure [Kuehl *et al.*, 2011;Seng *et al.*, 2009;Angeletti, 2017].

D'autre part, il est important de noter, que le MALDI-TOF a permis de caractériser des espèces classiquement non identifiées ou significativement sous-estimées (telles que: *E. casseliflavus* et *E. hirae*) par les méthodes microbiologique standards.

En outre, nous avons démontré la capacité de cette nouvelle technologie à discriminer entre les deux espèces d'entérocoques " *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*", qui sont hautement apparentées génétiquement, dont les séquences nucléotidiques de leur ARNr 16S sont très identiques « 99.9% de similarité » [Patel *et al.*, 1998], ce qui rends leurs discrimination par l'analyse génétique de leur ARN 16S très difficile. Le MALDI-TOF devient ainsi une alternative du séquençage standard des gènes ARNr 16S [Bourafa *et al.*, 2016].

L'espèce *E. hirae* identifiée parmi nos isolats constitue un agent pathogène zoonotique rarement isolé des infections humaines [Bourafa *et al.*, 2015]. La présente étude représente la première description d'*E. hirae* impliqué dans une infection humaine en Algérie [Bourafa *et al.*, 2015].

Dans la présente étude, les entérocoques ont été isolés de divers spécimens cliniques incluant : les urines, les prélèvements vaginaux, le pus, le sang et le sperme; dont plus d'un tiers (38,4%) des souches était isolé des prélèvements urinaires. Ceci est similaire à ceux signalés par d'autres investigations [Agudelo Higuaita and Huycke, 2014;Abat *et al.*, 2016b;Abdelkareem *et al.*, 2017], les infections des voies urinaires causées par les entérocoques sont fréquentes, conduisant ainsi à classer ces bactéries au second rang parmi les bactéries responsables des infections des voies urinaires [Abdelkareem *et al.*,

2017;Werner G, 2013], notons que les infections urinaires sont l'une des plus répandues infections bactériennes humaines, et sont responsables à des niveaux significatifs de morbidité [Abat *et al.*, 2016a;Abdelkareem *et al.*, 2017]. L'espèce *E. faecalis*, qui est connue pour être l'une des principales causes des infections des voies urinaires chez l'homme dans le monde entier [Abat *et al.*, 2016a;Poulsen *et al.*, 2012b] a été isolée dans 85.7 % de nos prélèvements urinaires d'origine externe. Selon les études épidémiologiques de Abat *et al* [Abat *et al.*, 2016a] et Poulsen *et al* [Poulsen *et al.*, 2012b], les infections urinaires à *E. faecalis* notamment celles acquises à la communauté sont probablement d'origine zoonotique, dont ils ont démontré la présence des liens épidémiologiques entre des clones d'*E. faecalis* isolés des animaux producteurs d'aliments et ceux responsables des infections urinaires humaines [Abat *et al.*, 2016a]. Soulignons que l'espèce *E. faecalis* est considérée parmi les agents pathogènes humains les plus fréquemment isolés des animaux producteurs de viande, en particulier les volailles [Abat *et al.*, 2016a;Aslam *et al.*, 2012].

Les infections des voies urinaires à entérocoques sont particulièrement préoccupantes, car elles peuvent conduire à une bactériémie [Abat *et al.*, 2016a;Guzman Prieto *et al.*, 2016], dont 18,6% de nos souches ont été isolées à partir des infections invasives. Actuellement, les entérocoques représentent le deuxième agent pathogène responsable des bactériémies nosocomiales [Agudelo Higuaita and Huycke, 2014], ainsi les bactériémies à entérocoques pouvant mener à une endocardite, notamment en présence de valvules cardiaques lésées, dont ces bactéries sont en cause de 20% des endocardites infectieuses [Dahl *et al.*, 2016;Madsen *et al.*, 2017].

Au cours de ce travail nous avons noté que la tranche d'âge la plus touchée par les infections à entérocoques est celle des personnes de plus de 55 ans, soit un pourcentage de 54.65% ; une observation similaire a été notée par d'autres études [Wang *et al.*, 2013;Djahmi *et al.*, 2012], cela peut être expliqué par l'altération des mécanismes de défenses immunitaires liée au processus de vieillissement chez les personnes âgées. D'autre part, nous n'avons pas constaté une grande différence entre les pourcentages des deux sexes féminins (53%) et masculins (47%) infectés par les entérocoques, dont le sexe ratio Homme/ Femme égale à 0.86, d'après ce résultat et en comparaison avec d'autre études épidémiologiques [Djahmi *et al.*, 2012;Abdelkareem *et al.*, 2017] nous pouvons

déduire que le critère du sexe de patient n'est pas considéré comme un facteur de risque pour les infections à entérocoques.

Tel que mentionné précédemment, les isolats examinés dans cette étude comprennent des souches isolées des patients hospitalisés et communautaires, dont 72% des souches sont d'origine hospitalière. La répartition des souches d'origine hospitalière en fonction des services hospitaliers a montré que le service de réanimation est placé en premier rang, ceci montre évidemment le caractère opportuniste des entérocoques sur les patients débilisés hospitalisés dans ce service. Le taux des souches d'entérocoques isolées dans le service d'urologie vient en deuxième rang, ce qui confirme l'implication importante de ces bactéries dans les infections des voies urinaires. Le service d'urologie est suivi par le service infectieux, puis le service de chirurgie générale dont les entérocoques sont parmi les principaux agents responsables des infections des plaies chirurgicales [Yadegarynia and Arab-Mazar, 2016; Orsi and Ciorba, 2013].

L'augmentation de la prévalence des infections nosocomiales à entérocoques est essentiellement due à l'utilisation croissante des agents antibactériens à large spectre en milieu hospitalier [Abat *et al.*, 2016b]. Egalement, les entérocoques pouvaient être transmis de patient à patient ou directement par les mains du personnel soignant ou par l'intermédiaire du matériel souillé [Weng *et al.*, 2013; Russotto *et al.*, 2015], dont ces bactéries peuvent survivre plusieurs semaines dans le milieu hospitalier notamment sur les surfaces, le linge souillé et les dispositifs médicaux [Chemaly *et al.*, 2014].

En Algérie, une seule étude sur la résistance des entérocoques aux antibiotiques chez des patients hospitalisés a été décrite [Djahmi *et al.*, 2012], la présente investigation permet ainsi de contrôler les niveaux résistance chez les patients communautaires, et de surveiller l'évolution des niveaux de résistance aux antibiotiques chez les patients hospitalisés afin d'actualiser les mesures thérapeutiques et prophylactiques.

L'examen phénotypique de la résistance aux β -lactamines a montré que l'ampicilline et la pénicilline, qui sont les β -lactames les plus actifs contre les entérocoques par inhibition de la synthèse du peptidoglycane [Miller *et al.*, 2014], étaient moyennement actives sur notre collection avec des taux de résistance de 61.6 et 54.6%, respectivement; et

leur action a été exercée sur les deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium*. Ces taux de résistance constatés sont plus élevés par rapport à ceux trouvés en Inde [Sreeja *et al.*, 2012] et en Éthiopie [Abamecha *et al.*, 2015], et légèrement élevés comparés à ceux déclarés en Chine [Jia *et al.*, 2014] et en Arabie saoudite [Salem-Bekhit *et al.*, 2012].

La résistance des entérocoques aux β -lactamines constitue une préoccupation majeure, car ces antibiotiques sont couramment utilisés seuls ou associés à des aminoglycosides pour le traitement des infections à entérocoques, dont une telle thérapie combinée entraîne la destruction synergique de ces bactéries [Conceicao *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2014].

Concernant l'amoxicilline, nous avons constaté que cet antibiotique était inactif sur 83.3% des souches d'*E. faecium*, sachant que la résistance à l'amoxicilline est généralement naturelle chez cette espèce, dont le mécanisme de résistance demeure inconnue [Stucki *et al.*, 2014]. Par ailleurs, cet antibiotique était actif sur la totalité des souches d'*E. faecalis* isolées, à la différence de l'étude de Abdelkareem *et al.*, en Egypte [Abdelkareem *et al.*, 2017], où 24% des souches d'*E. faecalis* étaient résistantes à cet antibiotique.

L'amoxicilline est considéré comme un agent antibactérien de premier choix notamment pour le traitement des infections des voies urinaires à *E. faecalis* [Poulsen *et al.*, 2012a]. Le nitrofurane, le linezolide et la fosfomycine sont également recommandés pour traiter les infections des voies urinaires à entérocoques [Agudelo Higueta and Huycke, 2014; Werner G, 2013].

Les entérocoques sont naturellement résistants aux aminoglycosides en doses standards utilisées en clinique contre d'autres bactéries, en raison de l'imperméabilité de leur paroi [Fisher and Phillips, 2009; Agudelo Higueta and Huycke, 2014; Werner G, 2013; Guzman Prieto *et al.*, 2016], c'est pour cette raison, que ces bactéries doivent être examinées contre les aminoglycosides hautement chargés.

Les résultats ont montré que plus de la moitié des souches examinées présentent un HNRA « la gentamicine (53.5%) et la kanamycine (68.60%) ». Les niveaux de résistance obtenus sont assez importants par rapport à ceux signalés en Egypte [Abdelkareem *et al.*, 2017], en chine [Jia *et al.*, 2014] et en Inde [Sreeja *et al.*, 2012].

Les aminoglycosides en doses standards sont habituellement utilisés en association avec d'autres agents antibactériens actifs sur la paroi, tels que les pénicillines et les glycopeptides, pour le traitement des infections graves à entérocoques, telle que l'endocardite [Hollenbeck and Rice, 2012; Rosvoll *et al.*, 2012]. Au fait, le HNRA élimine l'effet synergique bactéricide et entraîne une réduction majeure des options thérapeutiques efficaces [Rosvoll *et al.*, 2012].

D'autre part, nous avons noté que la tétracycline et l'érythromycine étaient les antibiotiques les moins actifs sur notre collection avec des pourcentages de résistance de 86 et 85%, respectivement. Ces résultats sont assez comparables à ceux rapportés dans l'étude de Djahmi *et al* réalisée sur la résistance aux antibiotiques des entérocoques en Algérie [Djahmi *et al.*, 2012] et à l'étude de Yadegarynia *et al* en Iran (particulièrement pour la tétracycline) [Yadegarynia and Arab-Mazar, 2016]. Par ailleurs, nous avons constaté que ces taux de résistance sont légèrement plus élevés que ceux rapportés dans d'autres pays, tels en Arabie Saoudite [Salem-Bekhit *et al.*, 2012], en Egypte [Abdelkareem *et al.*, 2017], en Mexique [Castillo-Rojas *et al.*, 2013] et en Chine [Jia *et al.*, 2014].

L'inactivité de la tétracycline, qui est un antibiotique à large spectre, peut être expliquée par son large utilisation dans le traitement des infections à *Enterococcus* pendant plus d'un moitié du siècle [Donhofer *et al.*, 2012]. De même, la forte résistance à l'érythromycine est due principalement à l'utilisation large de cet antibiotique dans le traitement des infections bactériennes à Gram-positif pendant plusieurs années [Aakra *et al.*, 2005; Schwaiger and Bauer, 2008]. De plus, à cause de l'utilisation générale des macrolides, des souches d'entérocoques résistantes à l'érythromycine ont été également isolées chez les animaux [Hammerum, 2012; Zou *et al.*, 2011].

Le linézolide et la tigécycline étaient actifs contre tous les isolats testés. Il est intéressant de noter que jusqu'à présent, la résistance à ces antibiotiques chez les entérocoques est très rare [Jia *et al.*, 2014; Mutschler *et al.*, 2013; Salem-Bekhit *et al.*, 2012; Hoban *et al.*, 2015]. D'autre part, l'efficacité du linézolide et la tigécycline dans le traitement des infections graves à entérocoques a été prouvée [Agudelo Higuita and Huycke, 2014; Shen *et al.*, 2015].

Également, la vancomycine était actif sur tous les isolats d'entérocoques testés, à l'exception des deux souches d'*E. gallinarum* qui sont intrinsèquement résistantes à la vancomycine.

Les ERV sont des souches d'entérocoques qui ont développé plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques dont la vancomycine (généralement aux amino-pénicillines et aux quinolones aussi), cet antibiotique a traditionnellement été réservé comme un antibiotique de dernier recours pour le traitement des infections provoquées par des entérocoques multirésistants aux antibiotiques [Seo and Lee, 2013].

En Algérie, la résistance à la vancomycine a été signalée dans deux cas cliniques à Alger (*E. faecalis* en 2008 et *E. faecium* en 2013) [Aggoune *et al.*, 2008; Hamidi *et al.*, 2013]. Habituellement, les gènes *vanA* et *vanB* confèrent une résistance à la vancomycine chez les deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium* [Reynolds and Courvalin, 2005]. Il est à noter que les ERV sont principalement représentés par les souches d'*E. faecium* appartenant au complexe clonal (CC17) [Abat *et al.*, 2016b; Yang *et al.*, 2015; Werner G, 2013], qui est associé aux infections nosocomiales à *E. faecium* [Werner G, 2013; Yang *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2013; Abat *et al.*, 2016b; Willems *et al.*, 2012].

L'émergence des infections nosocomiales à ERV a été signalée dans de nombreux pays d'Asie [Pourakbari *et al.*, 2012; Salem-Bekhit *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015] et d'Europe ainsi qu'aux États-Unis [Souli *et al.*, 2009; Ochoa *et al.*, 2013; Arias and Murray, 2012].

L'utilisation intensive de la vancomycine, la transmission croisée et le transfert génétique des gènes de résistance à la vancomycine à d'autres souches, espèces et même genres bactériens, y compris les staphylocoques par conjugaison, sont les principales causes de la prévalence croissante des ERV [Salem-Bekhit *et al.*, 2012; Agudelo Higuaita and Huycke, 2014; Arias and Murray, 2012]. La perte de la sensibilité à cet antibiotique impose le recours à des antibiotiques de dernier ressort coûteux, tels que, le linézolide, la tigécycline ou la daptomycine [Troillet and Bally, 2011; Abdelkareem *et al.*, 2017].

En Europe, il a été démontré que l'émergence des ERV était due à l'utilisation de l'avoparcine, un antibiotique glycopeptidique utilisé dans l'alimentation animale en tant que promoteur de croissance, ce qui a conduit à la sélection des ERV chez les animaux et qui sont ensuite transmis aux humains à travers la chaîne alimentaire [Cattoir and Leclercq,

2013;Abat *et al.*, 2016b;Arias and Murray, 2012]. La résistance à la vancomycine a été diminuée en Europe après l'interdiction de l'utilisation de l'avoparcine chez les animaux en 1996 [Abat *et al.*, 2016b;Arias and Murray, 2012]. Et comme l'avoparcine n'est jamais utilisé en Algérie [Aggoune *et al.*, 2008], cela pouvait contribuer à l'absence de la résistance acquise à la vancomycine chez nos isolats. En outre, le nombre des isolats d'*E. faecium* analysés dans la présente étude est plus petit par rapport à celui des isolats d'*E. faecalis*, ce qui pouvait influencer l'absence des ERV dans cette étude, étant donné que l'espèce *E. faecium* est reconnue d'être plus résistante à la vancomycine et à d'autres agents antibactériens par rapport à l'espèce *E. faecalis* [Abat *et al.*, 2016b;Willems *et al.*, 2012;Kuch *et al.*, 2012;Werner G, 2013]. L'espèce *E. faecium* est caractérisée par la plasticité remarquable de son génome, en la rendant ainsi capable d'acquérir plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, de coloniser les patients et de persister en milieu hospitalier [Abat *et al.*, 2016b;Werner G, 2013;Cattoir and Leclercq, 2013;Ochoa *et al.*, 2013]. La capacité de la plupart des souches d'*E. faecium* d'origine hospitalière à acquérir des déterminants de résistance aux antibiotiques est corrélée à l'absence d'un système de défense appelé CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats : courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) qui protège les bactéries contre l'acquisition d'ADN étranger [Abat *et al.*, 2016b;Kuch *et al.*, 2012;Arias and Murray, 2012;Bourafa *et al.*, 2016].

Pour échapper à l'action létale des antibiotiques, les entérocoques ont développé de très nombreux mécanismes de résistance contre une grande variété d'agents antibactériens.

Au cours de la présente étude, et sur le plan moléculaire, nous avons identifié certains gènes impliqués dans la résistance des entérocoques aux antibiotiques, dont nous avons ciblé les gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminoglycosides, l'érythromycine, la tétracycline, le chloramphénicol et la vancomycine.

L'identification moléculaire des gènes vanC de résistance intrinsèque à la vancomycine a détecté le gène vanC-1 chez les deux souches d'*E. gallinarum* et le gène vanC-4 chez la souche d'*E. casseliflavus*. À ce jour, le gène vanC-4 est identifié pour la première fois en Algérie par la présente étude, et a été décrit seulement par une seule étude dans le monde, au Japon en 2009 [Watanabe *et al.*, 2009].

Les gènes vanC confèrent un bas niveau de résistance à la vancomycine (CMI = 2 à 32 mg / l) [Fisher and Phillips, 2009;Quincampoix and Mainardi, 2001] . L'expression de ces gènes peut être constitutive ou inductible par la synthèse des précurseurs D-serine de faible affinité à la vancomycine au lieu du résidu D-ala du peptidoglycane [Miller *et al.*, 2014;Reynolds and Courvalin, 2005]. Il est intéressant de noter, que selon plusieurs auteurs, les gènes vanC peuvent être détectés chez les souches d'entérocoques qui ont une CMI à la vancomycine de 2-32 mg / mL, mais selon le CA-SFM, les souches qui présentent une CMI à la vancomycine ≤ 4 sont considérées comme sensibles. Pour cette raison, nous avons considéré la souche d'*E. casseliflavus* (CMI = 4 mg / mL) comme sensible à la vancomycine.

La prévalence des ERV représentée par les ERV-vanC dans notre étude, a été estimée à 2.4%. Une faible prévalence des ERV-vanC a déjà été signalée en Algérie [Djahmi *et al.*, 2012] et dans d'autres pays, tels: l'Arabie saoudite [Salem-Bekhit *et al.*, 2012] et la Hongrie [Dombradi *et al.*, 2012].

Cependant, une forte prévalence des ERV-vanC a été signalée au cours d'un dépistage rectale chez des patients hospitalisés à l'unité de soins intensifs au Brésil [Batistao *et al.*, 2012] et dans l'unité de transplantation de la moelle osseuse en Suisse [Tschudin *et al.*, 2010]. Toutefois, plusieurs études ont rapporté que ERV-vanC peuvent être impliqués dans une grande variété de maladies invasives chez l'homme comme l'endocardite, la bactériémie, la méningite et les abcès hépatiques [Tschudin *et al.*, 2010;Watanabe *et al.*, 2009].

Dans la présente étude, nous avons constaté que les souches isolées des patients hospitalisés sont plus résistantes aux antibiotiques, et portent plus de gènes de résistance que les souches isolées des patients communautaires. Ceci est fortement lié à l'utilisation très large des antibiotiques en milieu hospitalier, de même, cet environnement facilite la dissémination des souches résistantes qui peuvent être transmises par les mains du personnel soignant ou par du matériel contaminé [Russotto *et al.*, 2015;Dahl *et al.*, 2016]. En outre, les déterminants de résistance vis à vis ces antibiotiques sont généralement portés par des transposons et plasmides transférables contribuant à leur diffusion, limitant ainsi le choix thérapeutique [Castillo-Rojas *et al.*, 2013;Hegstad *et al.*, 2010].

D'autre part, nous avons constaté que cinq déterminants de résistance identifiés sur six (à l'exception des gènes *vanC*), ont été caractérisés chez des souches d'origine communautaire. L'isolement des entérocoques multirésistants à partir des patients extrahospitaliers, et aussi des animaux ou d'aliments a été également déclaré par certaines études [Thumu and Halami, 2014; Abat *et al.*, 2016a; Abdelkareem *et al.*, 2017], ceci suggère que le développement de cette résistance n'est pas donc un phénomène restreint aux hôpitaux mais la chaîne alimentaire pourrait jouer un rôle dans la dissémination des entérocoques à résistance multiples, ceci peut être due à l'utilisation des agents antimicrobiens dans les fermes d'élevages [Abat *et al.*, 2016a]. En outre, la consommation empirique des antibiotiques sans diagnostic ou la prescription médicale d'une antibiothérapie sans réalisation de l'antibiogramme notamment chez les patients externes sont des causes majeures de la dissémination de la multirésistance en milieu extrahospitalier.

En outre, nous avons observé que tous les isolats présentant une résistance au chloramphénicol étaient également résistants à l'érythromycine et à la tétracycline. La combinaison de ces trois antibiotiques a été rapportée par plusieurs auteurs [Hunt, 1998; Pospiech and Neumann, 1995; Templer *et al.*, 2008; Templer and Baumgartner, 2007].

D'après les profils de co-résistance identifiés, nous remarquons qu'ils sont très hétérogènes, ce qui suggère la diversité des isolats [Abdelkareem *et al.*, 2017]. En outre, ces résultats montrent la grande capacité de cette bactérie à acquérir des gènes de résistance, qui ont fortement contribué à son évolution de sa nature commensale à un pathogène nosocomial important [Chibebe *et al.*, 2013; Lebreton *et al.*, 2012].

Actuellement, le typage moléculaire par MLST constitue un outil important utilisé pour étudier la structure de la population et l'épidémiologie moléculaire des souches d'entérocoques [Ochoa *et al.*, 2013; Kuch *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015].

L'analyse clonale par l'utilisation du logiciel Eburst a permis de caractériser les différents complexes clonaux, notamment ceux associés aux pathogènes adaptés à l'hôpital (ou lignées associées aux infections nosocomiales et les épidémies hospitalières) et a permis également d'étudier la relations phylogénétique des isolats.

L'épidémiologie moléculaire et la structure de la population des entérocoques en Algérie ont été étudiées par une seule étude, réalisée par Djahmi *et al* [Djahmi *et al.*, 2012] sur des patients hospitalisés à l'hôpital universitaire d'Annaba, dont les résultats ont montré douze ST pour les isolats d'*E. faecalis* sur une collection de quatre-vingts souches, avec la détection des clones associés à l'hôpital chez *E. faecalis* (CC9, CC2) et *E. faecium* CC17. Au cours de notre étude, nous avons combiné à la fois des souches isolées des patients hospitalisés et externes, collectées à partir de trois établissements de santé dans trois villes de l'Est algérien afin d'investiguer les lignées épidémiques et les relations phylogénétiques. Nous avons trouvé plus de ST (50 ST), dont un nombre important de NSTs a été identifié (38 NSTs). La comparaison des NSTs identifiés chez nos isolats d'*E. faecalis* avec celles de la database de données MLST a révélé que la variation génétique de 84% des NSTs est due à un changement homologue de l'allèle *aroE*, ces variations sont probablement créées par recombinaison homologue [Leavis *et al.*, 2006]. Des taux élevés de recombinaisons génétiques au niveau des gènes de ménage: *gyd*, *gki*, *pstS* et *xpt* ont été également décrits [Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Bakshi *et al.*, 2016].

Par ailleurs, et à la différence de l'allèle *aroE*, nous avons noté que seulement 11% des NSTs d'*E. faecalis* ont été créés suite à des variations homologues de l'allèle *gdh*, ces résultats suggèrent que l'échange de l'allèle *gdh* est restreint.

Les NSTs créés suite à des mutations au niveau des séquences nucléotidiques des gènes de ménage ont été identifiés chez une seule souche d'*E. faecalis* et une seule souche d'*E. faecium*. D'après ces résultats, on peut déduire que la diversité génétique des souches d'entérocoques est principalement due à l'évolution des souches des ancêtres suite à des recombinaisons homologues plus qu'à des mutations, ce qui confirme les données des autres études [Palmer *et al.*, 2014; Willems *et al.*, 2012; Werner, 2013].

La relation phylogénétique établie par le logiciel Eburst entre les différents STs obtenus, a révélé l'identification de plusieurs clones « ou une clustérisation multiclonale » (figure 21) chez l'espèce *E. faecalis*, cela est probablement dû à la dissémination de multiples clones d'*E. faecalis* à partir de différentes origines, clinique, alimentaire ou à partir des animaux de ferme [Kuch *et al.*, 2012; Abat *et al.*, 2016a; Bourafa *et al.*, 2016].

En outre, nous rapportons la première identification d'*E. faecalis* ST6 (CC2) en Algérie, qui présente l'ancêtre ou le fondateur à haut risque des lignées hospitalières [Yang *et al.*, 2015; Kuch *et al.*, 2012; Bourafa *et al.*, 2016]. *E. faecalis* ST6 est spécialement adapté à l'environnement hospitalier, et caractérisé par un profil de multirésistance aux antibiotiques [Muruzabal-Lecumberri *et al.*, 2015], dont, au cours de ce travail, nous avons trouvé que les souches d'*E. faecalis* ST6 portent de deux à trois gènes de résistances. Cependant, aucun des STs constituant les CC9, CC40 ou CC87 fréquemment trouvés en Europe [Kuch *et al.*, 2012; Bourafa *et al.*, 2016] n'a été identifié dans notre étude.

L'MLST des isolats d'*E. faecium* a révélé l'existence des trois lignées épidémiques ST17, 18 et 78, qui sont les fondateurs représentatifs de CC17 [Willems *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Bourafa *et al.*, 2016], associé aux épidémies hospitalières [Yang *et al.*, 2015]. Le CC17 représente une sous-population distincte d'*E. faecium* très adaptée aux contraintes de l'environnement hospitalier par rapport à d'autres isolats d'*E. faecium* [Cattoir and Leclercq, 2013; Yang *et al.*, 2015; Bourafa *et al.*, 2016].

La capacité des souches appartenant au CC17 à acquérir des gènes de résistance a considérablement augmenté l'incidence d'*E. faecium* dans les milieux hospitaliers [Abat *et al.*, 2016b; Bourafa *et al.*, 2016], dont, nous avons trouvé, que 9 souches d'*E. faecium* sur 12, représentées par les STs hospitaliers à haut risque, possèdent trois gènes de résistance. D'autre part, il est à noter, que les STs associés aux infections nosocomiales et les épidémies hospitalières, ST17 et 18 d'*E. faecium* identifiés dans le présent travail [Bourafa *et al.*, 2016], ne sont jamais été décrits en Algérie.

D'autre part, nous avons constaté que le CC2 et le CC17, qui sont associés aux lignées épidémiques majeures, et responsables des infections nosocomiales [Yang *et al.*, 2015; Bourafa *et al.*, 2016], sont les plus représentés parmi nos isolats hospitaliers, cette observation est similaire à celle qui a été rapportée dans d'autres investigations épidémiologiques [Kuch *et al.*, 2012; Leavis *et al.*, 2006].

Par ailleurs, nous avons constaté quelques souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* isolées des patients communautaires étaient représentées par les complexes clonaux associés à l'hôpital (CC2 et CC17); la diffusion des STs associés à l'hôpital en milieu extrahospitalier peut être due à une hospitalisation antérieure des patients externes, mais vu le manque de

l'historique des patients externes au niveau de nos laboratoires d'analyses, nous ne pouvons pas donner une conclusion décisive. Néanmoins, la détection des souches d'origine non cliniques appartenant aux CC épidémiques a été signalée dans d'autres pays [Freitas *et al.*, 2009; Hammerum, 2012], ceci montre la propagation de ces lignées.

Dans notre étude, une association statistiquement significative ($P < 0.5$) entre le CC2 et les gènes de résistance à l'ampicilline et la gentamicine a été trouvée. Ce type d'association a été rapporté par plusieurs études épidémiologiques [McBride *et al.*, 2007; Muruzabal-Lecumberri *et al.*, 2015; Hammerum, 2012; Rathnayake *et al.*, 2011]. En outre, une relation entre le CC17 et des déterminants de résistance à l'ampicilline et la gentamicine a été décrite par plusieurs auteurs [Rosvoll *et al.*, 2012; Novais *et al.*, 2016; Hegstad *et al.*, 2010; Rathnayake *et al.*, 2011; Leavis *et al.*, 2006], dont ils ont rapportés que les génotypes caractérisés par la présence de ces déterminants sont plus fréquents chez les isolats associés aux épidémies, et la résistance à ces deux antibiotiques a considérablement contribué à la récente augmentation dramatique des lignées d'*E. faecium* (ST17, ST18 et ST78) adaptées à l'hôpital.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont caractérisées par leur résistance intrinsèque à un grand nombre des antibiotiques et leur capacité exceptionnelle d'acquérir de nouvelles résistances à de nombreux agents antibactériens rendant l'antibiothérapie très limitée, et expliquant, en partie, leur implication croissante dans les infections nosocomiales et dans l'émergence d'épidémies à travers différents hôpitaux du monde.

Dans le cadre du présent travail, nous avons examiné une collection de 86 souches d'entérocoques isolées de différents prélèvements pathologiques à partir des patients hospitalisés et externes au niveau de trois établissements de santé de l'Est Algérien (Annaba, Guelma et El-kala), afin d'évaluer les niveaux de résistance aux antibiotiques chez les deux groupes d'entérocoques étudiés et de déceler les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance, ainsi que l'étude épidémiologique des souches par l'analyse de la diversité génétique et les relations phylogénétiques.

L'identification des souches au niveau de l'espèce a été réalisée par l'utilisation de la galerie miniaturisé API 20 strep et a été par la suite confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF, cet outil a permis la détection et l'identification des espèces d'entérocoques classiquement difficiles à identifier par les méthodes microbiologiques conventionnelles, et nous a permis également de déceler directement et rapidement les souches d'entérocoques intrinsèquement résistantes à la vancomycine, ce qui peut guider sur le choix antibiothérapeutique.

L'étude phénotypique de la résistance aux antibiotiques nous a permis d'apprécier l'évolution de la résistance des entérocoques dans nos établissements de santé, et de contrôler le niveau de cette résistance chez les patients communautaires. Cette étude phénotypique a été suivie par une caractérisation moléculaire des gènes de résistance impliqués, dont des amorces spécifiques ont été utilisées.

L'analyse comparative au point de vue phénotypique et moléculaire entre les deux groupes d'entérocoques isolés des patients hospitalisés et externes a montré que les souches d'origine hospitalières sont plus résistantes aux antibiotiques et hébergent plus de gènes de résistance que les souches d'origine communautaires. Ceci est principalement dû

à l'utilisation massive des antibiotiques en milieu hospitalier, notamment ceux à large spectre, et à la transmission des souches résistantes entre patients, particulièrement ceux hospitalisés dans le même service ou la même pièce. Egalement, les mains du personnel soignant et le matériel médical contaminé pouvaient être une source de diffusion des souches multirésistantes en milieu hospitalier.

D'autre part, il est important de noter que la vancomycine, le linezolide et la tigécycline étaient efficace contre tous les isolats examinés; en revanche, la tétracycline et l'érythromycine étaient les antibiotiques les moins actifs.

Le typage moléculaire par MLST a révélé une grande diversité génétique chez les isolats d'*E. faecalis*, avec un grand nombre de NSTs identifiés, amplifiant ainsi la gamme des lignées pathogènes d'*E. faecalis*, en outre, des lignées épidémiques fondatrices des complexes clonaux associés aux infections hospitalières ont été détectées chez les deux espèces *E. faecalis* (ST6) et *E. faecium* (ST17, 18, 75).

Toutefois, l'analyse des résultats MLST par l'utilisation du logiciel bioinformatique (eBurst) a révélé la présence des complexes clonaux associés aux pathogènes adaptés à l'hôpital (CC2 d'*E. faecalis* et CC17 d'*E. faecium*), dont une relation statistiquement significative entre le CC2 et les gènes de résistance aux β -lactamines « blaZ » et aux aminoglycosides « aac (6') - aph (2'') » a été détectée.

En raison du potentiel de diffusion rapide des entérocoques en milieu hospitalier, leur grande capacité d'acquérir des gènes de résistance et le risque de transmission de ces gènes à d'autres bactéries hospitalières, d'importantes mesures d'hygiène et de surveillance systématique et continue de la résistance aux antibiotiques chez les espèces d'entérocoques, ainsi que l'usage raisonné des traitements antibiothérapeutiques, doivent être mises en place, afin d'éviter la sélection des souches résistantes et réduire les risques de leur dissémination.

Cependant, ce travail de thèse nécessite des travaux de recherche phénotypiques et moléculaires approfondis afin de déceler les différents facteurs de virulence permettant à ces bactéries de coloniser et envahir l'organisme hôte, ainsi que les mécanismes impliqués pour la régulation de leur expression.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aakra A, Vebo H, Snipen L, Hirt H, Aastveit A, Kapur V, Dunny G, Murray BE, Nes IF (2005): Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2246-2259.
- Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A (2015): Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. *BMC Res Notes* 8:213.
- Abat C, Huart M, Garcia V, Dubourg G, Raoult D (2016a): *Enterococcus faecalis* urinary-tract infections: Do they have a zoonotic origin? *J Infect* 73:305-313.
- Abat C, Raoult D, Rolain JM (2016b): Low Level of Resistance in Enterococci Isolated in Four Hospitals, Marseille, France. *Microb Drug Resist* 22:218-222.
- Abbassi MS, Znazen A, Mahjoubi F, Hammami A, Ben HA (2007): Emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sfax: clinical features and molecular typing. *Med Mal Infect* 37:240-241.
- Abdelkareem MZ, Sayed M, Hassuna NA, Mahmoud MS, Abdelwahab SF (2017): Multi-drug-resistant *Enterococcus faecalis* among Egyptian patients with urinary tract infection. *J Chemother* 29:74-82.
- Aggoune N, Chabani A, Tiouit D, Naim M, Rahal K (2008): [First case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Algeria]. *Med Mal Infect* 38:557-558.
- Agudelo Higueta NI, Huycke MM (2014): Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment.
- Angeletti S (2017): Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 138:20-29.
- Arias CA, Murray BE (2012): The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10:266-278.
- Arsene S, Leclercq R (2007): Role of a qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3254-3258.
- Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L (2012): Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol* 156:222-230.
- Bakshi U, Sarkar M, Paul S, Dutta C (2016): Assessment of virulence potential of uncharacterized *Enterococcus faecalis* strains using pan genomic approach - Identification of pathogen-specific and habitat-specific genes. *Sci Rep* 6:38648.
- Batistao DW, Gontijo-Filho PP, Conceicao N, Oliveira AG, Ribas RM (2012): Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:57-63.

- Berenger R, Bourdon N, Auzou M, Leclercq R, Cattoir V (2011): In vitro activity of new antimicrobial agents against glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from France between 2006 and 2008. *Med Mal Infect* 41:405-409.
- Bourafa N, Abat C, Loucif L, Olaitan AO, Bentorki AA, Boutefnouchet N, Rolain JM (2016): Identification of vancomycin-susceptible major clones of clinical *Enterococcus* from Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 6:78-83.
- Bourafa N, Loucif L, Boutefnouchet N, Rolain JM (2015): *Enterococcus hirae*, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: first case report in Algeria. *New Microbes New Infect* 8:7-9.
- Brisse S, Fussing V, Ridwan B, Verhoef J, Willems RJ (2002): Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* 40:1977-1984.
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ (2012): Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:685-706.
- Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Ponce de LS, Amieva-Fernandez RI, Agis-Juarez RA, Huebner J, Lopez-Vidal Y (2013): Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS One* 8:e59491.
- Cattoir V, Leclercq R (2013): Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 68:731-742.
- Chemaly RF, Simmons S, Dale C, Jr., Ghantoji SS, Rodriguez M, Gubb J, Stachowiak J, Stibich M (2014): The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. *Ther Adv Infect Dis* 2:79-90.
- Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, Hu F, Zhu D, Xu X, Wang M (2015): High Prevalence of vanM in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7795-7798.
- Chibebe JJ, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, Gilmore MS, Rice LB, Tegos GP, Hamblin MR, Mylonakis E (2013): Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One* 8:e55926.
- Chopra I, Roberts M (2001): Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232-260.
- Christiansen KJ, Turnidge JD, Bell JM, George NM, Pearson JC (2007): Prevalence of antimicrobial resistance in *Enterococcus* isolates in Australia, 2005: report from the Australian Group on Antimicrobial Resistance. *Commun Dis Intell Q Rep* 31:392-397.
- Conceicao N, de Oliveira CC, da Silva LE, de Souza LR, de Oliveira AG (2012): Ampicillin susceptibility can predict in vitro susceptibility of penicillin-resistant,

ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* Isolates to amoxicillin but not to imipenem and piperacillin. J Clin Microbiol 50:3729-3731.

Dahl A, Lauridsen TK, Arpi M, Sorensen LL, Ostergaard C, Sogaard P, Bruun NE (2016): Risk Factors of Endocarditis in Patients With *Enterococcus faecalis* Bacteremia: External Validation of the NOVA Score. Clin Infect Dis 63:771-775.

Day AM, Sandoe JA, Cove JH, Phillips-Jones MK (2001): Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Lett Appl Microbiol 33:392-396.

DiPersio LP, DiPersio JR, Frey KC, Beach JA (2008): Prevalence of the erm(T) gene in clinical isolates of erythromycin-resistant group D Streptococcus and Enterococcus. Antimicrob Agents Chemother 52:1567-1569.

Djahmi N, Boutet-Dubois A, Nedjai S, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP (2012): Molecular epidemiology of *Enterococcus* sp. isolated in a university hospital in Algeria. Scand J Infect Dis 44:656-662.

Dombradi Z, Dobay O, Nagy K, Kozak A, Dombradi V, Szabo J (2012): Prevalence of vanC vancomycin-resistant enterococci in the teaching hospitals of the University of Debrecen, Hungary. Microb Drug Resist 18:47-51.

Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W (2003): Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. Int J Food Microbiol 88:165-188.

Donhofer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN (2012): Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 109:16900-16905.

Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, Lari AR (2016): Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. J Prev Med Hyg 57:E197-E200.

Faron ML, Ledebor NA, Buchan BW (2016): Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. J Clin Microbiol 54:2436-2447.

Feil EJ, Spratt BG (2001): Recombination and the population structures of bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol 55:561-590.

Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S (2006): Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. Microb Drug Resist 12:265-268.

Fisher K, Phillips C (2009): The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology 155:1749-1757.

Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Peixe L (2009): Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings. Appl Environ Microbiol 75:4904-4908.

Garsin DA, Frank KL, Silanpaa J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, Murray BE (2014): Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection.

Gawryszewska I, Hryniewicz W, Sadowy E (2012): Penicillin Resistance in *Enterococcus faecalis*: Molecular Determinants and Epidemiology. Polish Journal of Microbiology 61:153–160.

Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D (2012): Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. J Clin Microbiol 50:2918-2931.

Guzman Prieto AM, van SW, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJ (2016): Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? Front Microbiol 7:788.

Hamidi M, Ammari H, Ghaffor M, Benamrouche N, Tali-Maamar H, Tala-Khir F, Younsi M, Rahal K (2013): [Emergence of glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* in Algeria: a case report]. Ann Biol Clin (Paris) 71:104-106.

Hammerum AM (2012): Enterococci of animal origin and their significance for public health. Clin Microbiol Infect 18:619-625.

Hannaoui I, Barguigua A, Serray B, El MN, Timinouni M, Ait CA, El AM (2016): Intestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci in a community setting in Casablanca, Morocco. J Glob Antimicrob Resist 6:84-87.

Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A (2010): Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect 16:541-554.

Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, van SW (2009): LPxTG surface proteins of enterococci. Trends Microbiol 17:423-430.

Hoban DJ, Reinert RR, Bouchillon SK, Dowzicky MJ (2015): Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004-2013. Ann Clin Microbiol Antimicrob 14:27.

Hollenbeck BL, Rice LB (2012): Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. Virulence 3:421-433.

Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JD, Willems RJ (2002): Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 40:1963-1971.

Hunt CP (1998): The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. Br J Biomed Sci 55:149-156.

Jia W, Li G, Wang W (2014): Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. Int J Environ Res Public Health 11:3424-3442.

- Kacmaz B, Aksoy A (2005): Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 25:535-538.
- Khani M, Fatollahzade M, Pajavand H, Bakhtiari S, Abiri R (2016): Increasing Prevalence of Aminoglycoside-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates Due to the aac(6')-aph(2'') Gene: A Therapeutic Problem in Kermanshah, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 9:e28923.
- Klibi N, Gharbi S, Masmoudi A, Ben SK, Poeta P, Zarazaga M, Fendri C, Boudabous A, Torres C (2006): Antibiotic resistance and mechanisms implicated in clinical enterococci in a Tunisian hospital. *J Chemother* 18:20-26.
- Kristich CJ, Rice LB, Arias CA (2014): Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance.
- Kuch A, Willems RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A, Klare I, Ruiz-Garbajosa P, Simonsen GS, van Luit-Asbroek M, Hryniewicz W, Sadowy E (2012): Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother* 67:551-558.
- Kuehl B, Marten SM, Bischoff Y, Brenner-Weiss G, Obst U (2011): MALDI-ToF mass spectrometry-multivariate data analysis as a tool for classification of reactivation and non-culturable states of bacteria. *Anal Bioanal Chem* 401:1593-1600.
- Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ (2006): Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 9:454-460.
- Lebreton F, van SW, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Le BF, Verneuil N, Zhang X, Giard JC, Dhalluin A, Willems RJ, Leclercq R, Cattoir V (2012): AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. *PLoS Pathog* 8:e1002834.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS (2014): Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization.
- Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN (2001): Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 2:S133-S145.
- Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M (2017): Virulence Factors Associated with *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *Open Microbiol J* 11:1-11.
- Mahabeer Y, Lowmanc W, Govind C, Swe-Swe-Han K, Robinson OJ, Mlisana K (2016): First outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus in a haematology unit in Durban, South Africa. *S Afr J Infect Dis* 31:20-24.
- Manero A, Blanch AR (1999): Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 65:4425-4430.
- McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, Moellering RC, Jr., Gilmore MS (2007): Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2:e582.

- Miller WR, Munita JM, Arias CA (2014): Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:1221-1236.
- Muruzabal-Lecumberri I, Girbau C, Canut A, Alonso R, Fernandez-Astorga A (2015): Spread of an *Enterococcus faecalis* sequence type 6 (CC2) clone in patients undergoing selective decontamination of the digestive tract. *APMIS* 123:245-251.
- Mutschler M, Trojan S, Defosse JM, Helmers A, Probst C, Bouillon B, Wappler F, Sakka SG (2013): Severe sepsis caused by a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a 10-year-old girl after multiple trauma. *Int J Infect Dis* 17:e466-e467.
- Novais C, Tedim AP, Lanza VF, Freitas AR, Silveira E, Escada R, Roberts AP, Al-Haroni M, Baquero F, Peixe L, Coque TM (2016): Co-diversification of *Enterococcus faecium* Core Genomes and PBP5: Evidences of pbp5 Horizontal Transfer. *Front Microbiol* 7:1581.
- Ochoa SA, Escalona G, Cruz-Cordova A, Davila LB, Saldana Z, Cazares-Domimiguez V, Eslava CA, Lopez-Martinez B, Hernandez-Castro R, Aquino-Jarquín G, Xicohtencatl-Cortes J (2013): Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC Microbiol* 13:291.
- Orsi GB, Ciorba V (2013): Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. *Ann Ig* 25:485-492.
- Palmer KL, van SW, Willems RJL, Gilmore MS (2014): Enterococcal Genomics.
- Patel R, Piper KE, Rouse MS, Steckelberg JM, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR, III, Kline BC (1998): Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *J Clin Microbiol* 36:3399-3407.
- Pospiech A, Neumann B (1995): A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* 11:217-218.
- Poulsen LL, Bisgaard M, Son NT, Trung NV, An HM, Dalsgaard A (2012a): *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. associated with chronic and self-medicated urinary tract infections in Vietnam. *BMC Infect Dis* 12:320.
- Poulsen LL, Bisgaard M, Son NT, Trung NV, An HM, Dalsgaard A (2012b): *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 18:1096-1100.
- Pourakbari B, Aghdam MK, Mahmoudi S, Ashtiani MT, Sabouni F, Movahedi Z, Alyari AE, Sadeghi RH, Mamishi S (2012): High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in an Iranian referral children medical hospital. *Maedica (Buchar)* 7:201-204.
- Quincampoix JC, Mainardi JL (2001): Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS 10:267-275.

Ramirez MS, Tolmasky ME (2010): Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13:151-171.

Rathnayake IU, Hargreaves M, Huygens F (2011): Genotyping of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates by use of a set of eight single nucleotide polymorphisms. *J Clin Microbiol* 49:367-372.

Reynolds PE, Courvalin P (2005): Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob Agents Chemother* 49:21-25.

Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza MJ, Laukova A, Elias M, Tenreiro R, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T (2011): Antibiotic resistance and virulence factors among *Enterococci* isolated from chourico, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *J Food Prot* 74:465-469.

Ricaurte JC, Boucher HW, Turett GS, Moellering RC, Labombardi VJ, Kislak JW (2001): Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin Microbiol Infect* 7:17-21.

Roberts MC (2005): Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245:195-203.

Roberts MC (2008): Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 282:147-159.

Rosvoll TC, Lindstad BL, Lunde TM, Hegstad K, Aasnaes B, Hammerum AM, Lester CH, Simonsen GS, Sundsfjord A, Pedersen T (2012): Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with aac(6')Ie-aph(2'')Ia-encoding transferable megaplasmids hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66:166-176.

Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, Coque TM, Canton R, Baquero F, Murray BE, del CR, Willems RJ (2006): Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol* 44:2220-2228.

Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A (2015): Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care* 3:54.

Salem-Bekhit MM, Moussa IM, Muharram MM, Alanazy FK, Hefni HM (2012): Prevalence and antimicrobial resistance pattern of multidrug-resistant enterococci isolated from clinical specimens. *Indian J Med Microbiol* 30:44-51.

Scapellato PG, Ormazabal C, Scapellato JL, Bottaro EG (2005): Meningitis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* successfully treated with combined intravenous and intraventricular chloramphenicol. *J Clin Microbiol* 43:3578-3579.

Schwaiger K, Bauer J (2008): Detection of the erythromycin rRNA methylase gene erm(A) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2994-2995.

- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543-551.
- Seo Y, Lee G (2013): Antimicrobial Resistance Pattern in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated From Expressed Prostatic Secretions of Patients With Chronic Bacterial Prostatitis. *Korean J Urol* 54:477-481.
- Shekh RM, Roy U (2012): Biochemical characterization of an anti-Candida factor produced by *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol* 12:132.
- Shen F, Han Q, Xie D, Fang M, Zeng H, Deng Y (2015): Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of severe infectious diseases: an updated meta-analysis of RCTs. *Int J Infect Dis* 39:25-33.
- Souli M, Sakka V, Galani I, Antoniadou A, Galani L, Siafakas N, Zerva L, Fytrou H, Tsiodras S, Giamarellou H (2009): Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. *Int J Antimicrob Agents* 33:137-142.
- Sreeja S, Babu PRS, Prathab AG (2012): The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res* 6:1486-1488.
- Starikova I, Al-Haroni M, Werner G, Roberts AP, Sorum V, Nielsen KM, Johnsen PJ (2013): Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 68:2755-2765.
- Stucki K, Harbarth S, Nendaz M (2014): Infections à entérocoques : du plus simple au plus complexe from Algeria. *Rev Med Suisse* 10:1918-1923.
- Tan CK, Lai CC, Wang JY, Lin SH, Liao CH, Huang YT, Wang CY, Lin HI, Hsueh PR (2010): Bacteremia caused by non-faecalis and non-faecium enterococcus species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. *J Infect* 61:34-43.
- Templer SP, Baumgartner A (2007): Enterococci from Appenzeller and Schabziger raw milk cheese: antibiotic resistance, virulence factors, and persistence of particular strains in the products. *J Food Prot* 70:450-455.
- Templer SP, Rohner P, Baumgartner A (2008): Relation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from foods and clinical specimens. *J Food Prot* 71:2100-2104.
- Thumu SC, Halami PM (2014): Phenotypic expression, molecular characterization and transferability of erythromycin resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from naturally fermented food. *J Appl Microbiol* 116:689-699.
- Tripathi A, Shukla SK, Singh A, Prasad KN (2016): Prevalence, outcome and risk factor associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* at a Tertiary Care Hospital in Northern India. *Indian J Med Microbiol* 34:38-45.

Troillet N, Bally F (2011): Entérocoques résistants à la vancomycine. Caduceus Express Publication de l'Institut Central des Hôpitaux.

Tschudin SS, Frei R, Dangel M, Gratwohl A, Bonten M, Widmer AF (2010): Not all patients with vancomycin-resistant enterococci need to be isolated. Clin Infect Dis 51:678-683.

Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecon MA, Ortega M, Coque TM, Garcia M, Saez-Nieto JA (2009): Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother 63:17-20.

von GA, van NW, Duse A, Kassel M, McCarthy K, Brink A, Meyers M, Smego R, Koornhof H (2000): Epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci colonizing high-risk patients in hospitals in Johannesburg, Republic of South Africa. J Clin Microbiol 38:905-909.

Wang JT, Chang SC, Wang HY, Chen PC, Shiao YR, Lauderdale TL (2013): High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 75:406-411.

Watanabe S, Kobayashi N, Quinones D, Hayakawa S, Nagashima S, Uehara N, Watanabe N (2009): Genetic diversity of the low-level vancomycin resistance gene vanC-2/vanC-3 and identification of a novel vanC subtype (vanC-4) in *Enterococcus casseliflavus*. Microb Drug Resist 15:1-9.

Weng PL, Ramli R, Shamsudin MN, Cheah YK, Hamat RA (2013): High genetic diversity of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing from a hospital in Malaysia. Biomed Res Int 2013:938937.

Werner G (2013): Molecular Typing of Enterococci/VRE. J Bacteriol Parasitol S5 -001 6:680-683.

Willems RJ, Top J, van SW, Leavis H, Bonten M, Siren J, Hanage WP, Corander J (2012): Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. MBio 3:e00151-12.

Yadegarynia D, Arab-Mazar Z (2016): Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Among Enterococcus Species by E-Test Method at Khatam-ol-Anbia Hospital During 2013 – 2014. Arch Clin Infect Dis 6:78-83.

Yang JX, Li T, Ning YZ, Shao DH, Liu J, Wang SQ, Liang GW (2015): Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. Infect Genet Evol 33:253-260.

Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, Zhou YS, Yang X, Xu CW, Xia QQ (2011): Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. New Microbiol 34:73-80.

RESUME

Les entérocoques sont des agents pathogènes majeurs des infections nosocomiales et sont également impliqués dans les infections communautaires. Les objectifs visés par cette étude étaient d'évaluer les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'entérocoques d'origine hospitalière et communautaire recueillies de l'Est algérien, d'identifier les mécanismes de résistance impliqués et d'investiguer la diversité génétique et la clonalité.

Au total, 86 isolats non dupliqués collectés entre 2010 et 2013 ont été identifiés par MALDI-TOF. La sensibilité aux antibiotiques a été testée par la méthode de disques et par E. test. Les gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés par PCR et séquençage. Le typage moléculaire a été réalisé par MLST et l'analyse clonale a été effectuée par le logiciel Eburst.

Enterococcus faecalis était l'espèce la plus prédominante (75.3%), suivie par *E. faecium* (21.2%), *E. gallinarum* (2.4%), *E. casseliflavus* (1.2%) et *E. hirae* (1.2%). Les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'origine hospitalière sont statistiquement plus élevés que ceux détectés chez les souches d'origine communautaires. Une grande diversité génétique a été observée chez les isolats d'*E. faecalis*, avec identification d'un nouveau complexe clonal (CC256). En outre, nous avons identifié les fondateurs à haut risque des lignées hospitalières *E. faecalis* ST6 et *E. faecium* ST17, ST18 et ST78, ainsi que les complexes clonaux associés aux infections nosocomiales et les épidémies hospitalières CC2 d'*E. faecalis* et CC17 d'*E. faecium*.

Cette étude décrit pour la première fois en Algérie l'identification d'*E. faecalis* ST6 et *E. faecium* ST17 et ST18. D'autre part, la vancomycine, le linezolid et la tigécycline se sont révélés efficaces contre les isolats.

Bien que la résistance acquise à la vancomycine n'a pas été détectée, il est nécessaire de bien cerner l'étendue et le développement de la résistance aux antibiotiques par l'usage prudent des antibiotiques et la mise en place des mesures d'hygiène hospitalières.

Mots clés: Entérocoques, résistance aux antibiotiques, typage moléculaire, clonalité.

Enterococci are the major pathogens of nosocomial infections and are also involved in human community diseases. The objectives of this study were to evaluate the levels of antibiotics resistance of hospital and community enterococci strains recovered in eastern Algeria, to identify the implicated resistance mechanisms and to investigate the genetic diversity and clonality.

A total of 86 non-duplicate isolates collected between 2010 and 2013 were identified using MALDI-TOF. Antibiotic susceptibility testing was performed using disk diffusion and Etest methods. Antibiotic resistance genes were identified by PCR and sequencing. Molecular typing was performed by MLST and clonality analysis was carried out by the Eburst software.

Enterococcus faecalis was the most predominant species (75.3%), followed by *E. faecium* (21.2%), *E. gallinarum* (2.4%), *E. casseliflavus* (1.2%) and *E. hirae* (1.2%). Antibiotic resistance levels of hospital-acquired strains are statistically higher than those found in strains of community origin. High genetic diversity was observed among the *E. faecalis* isolates, with the identification of a new clonal complex (CC256). In addition, we have identified the founders of high-risk hospital lineages *E. faecalis* ST6 and *E. faecium* ST17, ST18 and ST78, as well as the clonal complexes associated with nosocomial infections and hospital outbreaks CC2 of *E. faecalis* and CC17 of *E. faecium*.

This study describes for the first time in Algeria the identification of *E. faecalis* ST6 and *E. faecium* ST17 and ST18. On the other hand, vancomycin, linezolid and tigecycline were found to be effective against the isolates.

Although acquired vancomycin resistance was not detected, it is necessary to limit the extent and the development of antibiotic resistance through prudent use of antibiotics and the establishment of hospital hygiene measures.

Keywords: Enterococci, antibiotic resistance, molecular typing, clonality.

المكورات المعوية هم مسببات رئيسية للأمراض التعفنفة داخل وخارج الوسط الاستشفائي. الأهداف التي ترمي لها هذه الدراسة تتمثل في تقييم مستويات مقاومة المكورات المعوية المعزولة من مرضى استشفائيين وغير استشفائيين بالشرق الجزائري ضد المضادات الحيوية، تحديد آليات المقاومة والبحث في التنوع الجيني والعلاقات الجينية.

إجمال 86 مكورة معوية غير مكررة جمعت من 2010 إلى 2013 تم تحديدها بتقنية (MALDI- TOF). إختبار الحساسية ضد المضادات الحيوية تم بطريقة الأقراص و طريقة تحديد التركيز الأدنى لمنع نمو البكتريا (E. test)، و تم التعرف على جينات المقاومة بطرق البيولوجيا الجزيئية séquençage و PCR.

دراسة العلاقات الجينية تمت بواسطة برنامج MLST والتعيين الجزيئي للجينات ثم بواسطة تقنية Eburst.

Enterococcus faecalis هي نوع المكورة المعوية الذي وجدناه بكثرة (75.3%) تتبع ب *E. faecium* (21. 2%)، *E. casseliflavus* (1.2%)، *E. gallinarum* (2. 4%)، *E. hirae* (1.2%) مستويات المقاومة للعينات المعزولة من المستشفى هي إحصائيا أعلى بالمقارنة مع العينات المعزولة خارج المستشفى.

لوحظ وجود تنوع وراثي كبير عند النوع *E. faecalis*، مع تحديد مجمع نسلي جديد CC256. بالإضافة إلى ذلك، حددنا السلالات المؤسسة للسلالات الأستشفائية عالية الخطورة ST78، ST18، *E. faecium* ST17، و *E. faecalis* ST6، فضلا عن المجمعات النسلية المرتبطة بالتعفنات والأوبئة الأستشفائية *E. faecalis* CC2 و *E. faecium* CC17.

هذه الدراسة قامت بتحديد لأول مرة بالجزائر الجينات vanC- 4، وتعرض التقرير الأول عن ST18 و *E. faecium* ST171 و *E. faecalis* ST6. من ناحية أخرى وجدنا أن linezolid و vancomycin و tigecycline فعالين ضد العزلات.

على الرغم من أن المقاومة المكتسبة ل vancomycin لم تكتشف، لكن من الضروري الحد من مدى و تطور المقاومة ضد المضادات الحيوية وذلك بالإستخدام الحذر للمضادات الحيوية ووضع تدابير النظافة في المستشفيات.

الكلمات المفتاحية: المكورات المعوية، المقاومة ضد المضادات الحيوية، التحديد الجزيئي، المجمعات النسلية.

ANNEXES

■ Gélose cœur cerveau :

Pour 1 litre de milieu

- Extrait cœur-cerveau17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique2,5 g
- Glucose.....2,0 g
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

■ Gélose bile esculine azide (BEA) :

Pour 1 litre de milieu

- Tryptone.....17,00 g
- Peptone pepsique de viande3,00 g
- Extrait autolytique de levure.....5,00 g
- Bile de bœuf bactériologique10,00 g
- Chlorure de sodium.....5,00 g
- Esculine1,00 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....0,50 g
- Azide de sodium0,15 g
- Agar agar bactériologique.....13,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,1 \pm 0,2$.

■ Milieu hyper-sallé à 6,5% de NaCl :

Pour 1 litre de milieu

- Peptone 5,0 g
- Extrait de viande 5,0 g
- Tryptose 5,0 g
- Chlorure de sodium 65,0 g
- pH = 7,5

La galerie API 20 Strep

➤ **Principe**

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés nécessaire pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

➤ **Mode opératoire**

➤ **Sélection des colonies**

- Noter le type d'hémolyse sur la fiche de résultats (21° test).
- Prélever une colonie bien isolée (les Entérocoques donnent des colonies de taille suffisante après 24 heures d'incubation.) et la mettre en suspension dans 0,3 ml d'eau stérile. Bien homogénéiser.
- Inonder une boîte de gélose Columbia au sang de mouton avec cette suspension (ou écouvillonner stérilement toute la surface de la gélose).
- Incuber la boîte 24 heures (± 2 heures) à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en anaérobiose.

➤ **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl_2 , CO_2 ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).

- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ **Préparation de l'inoculum**

- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif.
- A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
- Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

➤ **Inoculation de la galerie**

- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette ou de la PSIPipette sur le côté de la cupule) :
- pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule.
- pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :
- ouvrir une ampoule d'API GP Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.
- répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

➤ **Lecture de la galerie**

Après 4 heures d'incubation :

- Ajouter les réactifs :
- Test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2.
- Test HIP: 2 gouttes de NIN.
- tests PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP: 1 goutte de ZYM A et ZYM B (*).
- Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture. Si nécessaire, exposer la galerie à une lampe forte (1000 W) 10 secondes pour décolorer le réactif en excès dans les tubes PYRA à LAP.
- Alors, relire après 24 heures les réactions ESC, ADH et RIB à GLYG **sans relire les réactions enzymatiques** (HIP, PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP) et VP.

Noter toutes les réactions sur la fiche de résultats.

➤ **Interprétation**

- Détermination du profil numérique :

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

L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

* à l'aide du catalogue analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

* à l'aide du logiciel d'identification:

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.
- Noté que la réaction hémolytique constitue le 21^o test ; la β -hémolyse est considérée comme positive et sa valeur numérique est 4. Toute autre réaction hémolytique est considérée comme négative et sa valeur numérique est 0. Toutefois, ces caractères ont une valeur indicative pour l'identification de certaines espèces.

TABLEAU DE LECTURE

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

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.

(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.

(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION /
TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ /
IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL / TABELA IDENTYFIKACYJNA**

% de réactions positives après 4/24 h à 36°C ± 2°C / % of reactions positive after 4/24 hrs. at 36°C ± 2°C /
% der positiven Reaktionen nach 4/24 h bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 4/24 h a 36°C ± 2°C /
% di reazioni positive dopo 4/24 ore a 36°C ± 2°C / % das reacções positivas após 4/24 h a 36°C ± 2°C /
% θετικών αντιδράσεων μετά από 4/24 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 4/24 timmar vid 36°C ± 2°C /
% positive reaktioner efter 4/24 timer ved 36°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 4/24 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20 STREP V7.0	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGRU	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	HEM
<i>Abiotrophia defectiva</i>	25	0	15	99	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	98	100	5	92	99	0	0
<i>Aerococcus urinae</i>	3	99	24	12	0	52	41	50	92	28	28	0	32	13	56	64	1	1	40	0	0
<i>Aerococcus viridans</i> 1	13	50	96	54	33	16	37	1	5	1	83	33	85	70	83	99	33	41	70	33	1
<i>Aerococcus viridans</i> 2	15	70	50	76	10	20	25	1	5	5	25	1	35	2	70	89	1	5	24	1	5
<i>Aerococcus viridans</i> 3	22	88	99	40	85	48	14	14	1	1	8	2	82	5	91	99	37	99	14	1	1
<i>Alloiococcus otitis</i>	0	25	0	100	0	3	100	1	90	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus avium</i>	99	60	99	94	15	0	24	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1
<i>Enterococcus durans</i>	100	43	100	97	32	2	76	1	91	100	99	15	2	0	84	76	0	0	56	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	99	46	99	97	1	0	21	4	99	92	98	1	98	92	92	100	0	1	96	2	1
<i>Enterococcus faecium</i> *	94	43	99	95	42	1	89	1	97	93	85	70	78	18	84	98	15	10	60	3	1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	95	0	1	0	1	53	0	99	0	46	6	1	0	1	0	0	0	73	53	0
<i>Gemella haemolysans</i>	25	0	0	70	0	0	1	84	40	1	1	0	20	10	5	2	0	0	10	5	1
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	0	35	0	0	10	35	86	4	5	0	1	0	1	11	3	1	16	5	0
<i>Globicatella sanguinis</i>	4	40	98	40	52	16	100	0	9	0	76	95	71	47	76	100	71	95	100	90	0
<i>Granulicatella adiacens</i>	0	0	10	80	0	25	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	98	25	41	1	23	0	18	4	88	0	27	0	17	0	97	30	0	15	25	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	90	40	99	35	3	0	35	3	96	95	95	15	45	1	72	87	4	5	90	3	1
<i>Leuconostoc</i> spp	91	1	60	5	55	0	65	2	70	10	37	35	29	4	35	65	0	42	11	0	0
<i>Listeria</i> spp	97	79	98	0	0	0	0	0	85	0	6	0	0	0	49	92	1	1	72	0	26
<i>Streptococcus agalactiae</i> **	100	99	1	1	4	79	1	96	99	99	98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75
<i>Streptococcus anginosus</i>	100	0	100	0	44	0	1	99	100	100	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>Streptococcus bovis</i> I	99	1	100	1	34	2	1	0	100	0	0	1	97	1	100	100	65	98	98	98	1
<i>Streptococcus bovis</i> II 1	100	0	1	0	58	0	0	0	100	0	0	0	0	0	90	0	0	97	97	97	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 2	100	2	100	0	89	97	99	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	72	31	5	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 3	99	1	100	0	99	0	6	0	100	0	0	0	0	0	100	6	6	100	93	0	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 4	98	1	100	0	97	2	10	0	100	1	1	32	1	1	98	40	84	99	99	97	0
<i>Streptococcus canis</i>	0	1	25	4	95	1	80	100	100	100	100	0	0	0	99	1	0	1	99	0	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	100	1	27	0	0	0	5	99	100	100	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>Streptococcus dys.</i> ssp <i>dysgalactiae</i>	0	0	1	1	1	99	0	100	99	100	99	0	1	50	86	100	0	1	99	30	2
<i>Streptococcus dys.</i> ssp <i>equisimilis</i>	0	1	25	1	1	99	1	99	100	97	97	1	1	1	45	99	0	1	98	40	94
<i>Streptococcus equi</i> ssp <i>equi</i>	1	0	1	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	1	0	0	100	100	100
<i>Streptococcus equi</i> ssp <i>zooepidemicus</i>	0	1	15	0	0	100	1	99	100	99	85	0	0	99	100	0	0	0	99	99	99
<i>Streptococcus equinus</i>	100	0	95	0	28	0	1	1	100	0	0	0	30	0	25	7	25	15	17	10	0
<i>Streptococcus group</i> L	1	75	1	0	0	100	1	100	100	100	100	0	0	0	75	100	0	0	100	98	94
<i>Streptococcus intermedius</i>	100	0	87	0	0	0	44	99	100	100	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40
<i>Streptococcus mitis</i> 1	1	0	3	1	21	0	25	35	99	19	14	1	0	1	94	7	3	26	67	5	0
<i>Streptococcus mitis</i> 2	0	0	3	0	31	0	35	50	100	99	1	0	1	0	100	1	1	31	84	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	99	0	99	1	64	0	1	1	100	18	0	0	99	90	90	100	81	81	1	0	1
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	1	1	50	0	46	72	100	5	1	0	1	0	99	32	1	72	96	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	39	60	70	3	79	3	100	57	3	1	0	0	99	98	64	87	84	10	1
<i>Streptococcus porcinus</i>	100	5	99	1	19	99	1	97	97	100	98	0	88	88	83	99	0	0	50	0	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1	5	98	0	15	0	100	100	99	0	0	8	1	99	98	0	1	61	22	98
<i>Streptococcus salivarius</i>	85	0	98	1	8	0	70	20	100	0	0	0	5	1	86	67	34	88	74	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0	1	42	0	63	0	1	5	100	90	0	0	1	48	83	98	33	55	67	0	0
<i>Streptococcus suis</i> I	0	1	82	53	80	94	76	1	100	91	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89	0
<i>Streptococcus suis</i> II	0	1	70	41	91	91	52	3	100	95	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96	2
<i>Streptococcus uberis</i>	99	98	100	35	10	86	5	30	100	98	99	0	99	98	99	99	87	10	50	20	0

* si / if / wenn / se / εάν / om / hvis / gdy : { *Enterococcus casseliflavus* ou / or / od / o / ή / eller / lub } possible / möglich / posible / possibile / possível / πιθανόν / möglich / mulig / możliwość

** Voir § Limites du test / See § Limitations of the method / Siehe § Limitierungen / Ver § Limites del método / Vedere § Limiti del metodo / Consultar § Limites do teste / Βλέπε § Περιορισμοί Μεθόδου / Se avsnittet "Metodens begränsningar" / Se § Metodens begränsninger / Patrz § Ograniczenia testu

Nouveaux STs identifiés chez *E. faecalis*

Strain	country	region	year	Source	Species	Reference	isol_site	gdh	gyd	pstA	gki	aro	xpt	yik	ST
10	Algeria	Guelma	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	1	7	9	1	75	1	1	540
11	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Blood	5	1	1	3	1	7	6	541
15	Algeria	Annaba	2010	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Blood	2	1	11	11	1	4	2	542
20	Algeria	Guelma	2010	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	27	7	16	3	1	1	7	544
21	Algeria	Guelma	2010	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	2	7	11	3	6	4	2	545
23	Algeria	Guelma	2011	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	12	7	3	7	1	4	5	539
24	Algeria	Guelma	2010	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	6	10	11	17	1	4	1	547
28	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	10	1	11	6	21	1	4	549
32	Algeria	Guelma	2011	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	12	7	3	7	21	1	5	550
33	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	4	6	7	29	3	1	20	551
35	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	4	6	7	1	6	1	20	552
36	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	5	1	1	3	4	7	6	553
39	Algeria	Annaba	2012	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	15	7	37	1	6	15	11	554
40	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	12	1	3	7	8	1	5	555
42	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	12	7	3	7	1	1	5	543
50	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	1	1	9	1	6	1	1	556
51	Algeria	Annaba	2010	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	27	7	16	10	6	1	7	548
52	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	4	6	7	29	6	1	20	557
53	Algeria	Al-kala	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	2	7	11	11	17	15	2	558
56	Algeria	Al-kala	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	12	7	3	7	10	2	5	559
57	Algeria	Al-kala	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	12	7	3	7	6	2	5	546
61	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	2	7	11	11	8	1	2	560
63	Algeria	Annaba	2011	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	27	7	16	10	6	10	7	561
65	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Blood	12	7	3	7	5	1	5	564
66	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	12	7	3	7	7	7	5	565
67	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	12	7	3	7	21	10	5	566
70	Algeria	Al-kala	2011	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	1	7	11	21	4	2	1	567
71	Algeria	Al-kala	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	1	7	11	21	6	4	1	562
72	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	12	7	3	7	6	4	5	563
73	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	1	7	9	1	21	1	1	568
74	Algeria	Annaba	2011	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	1	7	9	1	6	1	1	569
75	Algeria	Guelma	2010	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Pus	2	7	11	6	3	4	2	570
76	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	1	7	9	1	7	7	1	571
79	Algeria	Al-kala	2011	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	1	7	11	21	6	1	1	572
92	Algeria	Annaba	2013	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Vaginal	4	8	37	16	40	46	15	573
94	Algeria	Guelma	2013	Non-hospitalized person	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	1	7	71	1	1	1	1	574
96	Algeria	Guelma	2014	Hospitalized patient	<i>E. faecalis</i>	Bourafa Nadjette	Urine	16	15	33	16	17	15	11	575

Nouveaux STs identifiés chez *E. faecium*

Strain	country	region	year	Source	Species	isol_site	AtpA	Ddl	Gdh	PurK	Gyd	PstS	Adk	ST
30	Algeria	Al-kala	2012	Hospitalized patient	<i>E. faecium</i>	urine	9	1	1	2	1	1	1	907
55	Algeria	Annaba	2010	Hospitalized patient	<i>E. faecium</i>	pus	9	2	1	2	1	1	1	908
62	Algeria	Annaba	2011	Hospitalized patient	<i>E. faecium</i>	pus	15	1	1	75	1	1	1	909

Séquence types des souches d'*E. faecalis* et *E. faecium* isolées de l'Est Algérien.

<i>E. faecalis</i>	ST		<i>E. faecalis</i>	ST		<i>E. faecalis</i>	ST		<i>E. faecalis</i>	ST		<i>E. faecium</i>	ST
S01	539		S37	6		S66	565		S87	256		S60	18
S10	540		S38	450		S67	566		S9	23		S2	78
S11	541		S39	554		S7	6		S91	19		S22	78
S15	542		S40	555		S70	567		S92	573		S54	78
S17	543		S41	550		S71	562		S93	23		S31	17
S20	544		S42	543		S72	563		S94	574		S14	17
S21	545		S50	556		S73	568		S95	423		S3	17
S23	539		S51	548		S74	569		S96	575		S5	17
S24	547		S52	557		S75	570		S97	6		S77	17
S25	6		S53	558		S76	571		S98	202		S81	17
S26	548		S56	559		S78	21					S89	17
S27	532		S57	546		S79	572					S90	17
S28	549		S59	576		S8	6					S12	909
S29	539		S6	448		S80	21					S13	909
S32	550		S61	560		S83	6					S62	909
S33	551		S63	561		S84	278					S 58	262
S35	552		S64	562		S85	25					S55	908
S36	553		S65	564		S86	21					S30	907