



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd

- Tlemcen -

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie,
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire de Microbiologie Appliquée à la Microbiologie au
Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : MICROBIOLOGIE

Thème



Caractérisation De Souches
d'Enterococcus Sp. Isolées Du
Centre Hospitalo-Universitaire De Tlemcen
Et Etude De Leur Antibiorésistance

Présentée par : Mme Malika RAHMOUN épouse REBIAHI

Devant le jury :

Dr BOUBLENZA. L	UABB Tlemcen	Présidente
Pr BELAHCENE. M	U. Ain-Temouchent	Examineur
Pr DJIBAOUI. R	U. Mostaganem	Examineur
Dr BARKA. S	UABB Tlemcen	Examineur
Pr HASSAINE. H	UABB Tlemcen	Directrice de thèse

Année universitaire 2020/2021

REMERCIEMENTS

*Mes plus vifs remerciements vont à
Mme Hafida HASSAINE, Professeur à l'université de Tlemcen. Sa gentillesse, sa
disponibilité dans les moments difficiles, et ses conseils judicieux ont été pour moi l'unique
repère, puisse-t-elle trouver dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude.*

*Je témoigne ma reconnaissance à
Mme Lamia BOUBLENTA, Maître de Conférences A, à l'université de Tlemcen,
pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury.*

*Je remercie vivement
Mr DJIBAOU, Professeur à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté
de juger ce travail.*

*Je remercie profondément
Mr BELLAHCENE, Professeur à l'université de Tlemcen pour avoir accepté
d'examiner ce travail.*

*Je remercie énormément
Mr BARKA Salih, Maître de conférences à l'université Tlemcen, pour avoir accepté en
toute modestie d'examiner ce travail.*

*Un grand hommage à
Mr REBIAHI Sid Ahmed, Professeur à l'université de Tlemcen, pour son aide et son
soutien indispensables, sans qui ce travail n'aurait jamais abouti.*

*Je remercie vivement
Pr Z. Boucherit, Professeur à l'université de Tlemcen, qui a mis à notre disposition tous les
équipements de son laboratoire.*

*Un grand merci aux
Professeurs Cherif Ameer et Ramzi Landolsi, de l'Institut supérieur de biotechnologie,
Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Géo Ressources (BVBGR) LR11/La
Université de la Manouba, Tunisie, pour leur précieux soutien au laboratoire.*

*Je remercie spécialement
Professeurs Antonio Gálvez et Rubén Pérez Pulido, de l'Université de Jaén, Espagne.*

DÉDICACES

A la mémoire de mon père RAHMOUN Ibrahim

J'ai la chance d'avoir deux mamans : Fadela et Zakia, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifices. Vos prières et vos Bénédictiones m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance.

*Puisse Dieu tout puissant, vous préserver et vous accorder santé,
longue vie et Bonheur*

A Sid Ahmed, mon mari, ta présence est la source de mon existence. Merci pour tes encouragements et ton aide dans la réalisation de ce travail, je ne te remercierai jamais assez mais je prie dieu le tout puissant qu'il te garde pour moi et pour tes filles.

A mes filles chéries : Hiba, Anfele, Aya et mon adorable Farah. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite. que dieu vous garde et vous protège.

A ma sœur Amina, son mari Mustapha et ses enfants que j'adore : Wissem, Malak, Mohamed Nazih, et la petite Hanna.

A mes frères

Amine et ses enfants, que dieu vous bénisse et vous accorde paix et sérénité

Ali, toujours présent et très gentil, je te souhaite tout le bonheur du monde

A mes chères sœurs et cousines Bahia et Hafida, Amel et Karima

A ma belle famille

A la mémoire de mon beau-père REBIAHI Djilali et mon beau frère REBIAHI Mustapha

Ma belle-mère

Ma belle sœur Fatema, son mari et ses enfants

A Souad et ses enfants, j'espère que tu resteras toujours aussi positive et bonne vivante

A Lila, Mohamed, Souad, Najia, Hadjer et les garçons

A la famille RAHMOUN et la famille SKENDER, mes oncles et tantes paternels et maternels, en particulier Zineb

A toutes mes amies : Zahira, Nouria, et tous les membres du laboratoire LAMAABE

ملخص

يستمر جين *vanA* في الانتشار في جميع أنحاء العالم. لا يبدو أن الجزائر بمنأى عن ذلك ، لكن البيانات ، التي لا تزال متفرقة ، وقديمة أيضًا. وقد برر هذا الاهتمام المهيمن في استكشاف الحالة الحالية لمقاومة المضادات الحيوية في *Enterococci* ، مع التركيز على وجود جينات معينة.

دراسة تواتر العزل ومستوى مقاومة المضادات الحيوية للمكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* المعزولة خلال عامين في مستشفى تلمسان (شمال غرب الجزائر) ، أثناء التحقيق في احتمال وجود المكورات المعوية (VRE) مادة مقاومة للفانكوميسين .

الدراسة الحالية عبارة عن دراسة استطلاعية تم فيها عزل *Enterococcus spp* من خمسة أقسام مختلفة تم تحديدها وتأكيدتها من خلال التعريف الجزيئي لجين *tuf* " (*E. faecalis* 59 (53%) ، *E. avium* 2 (1.8%) ، *E. faecium* 47 (42%) و *E. faecium* 3 (*durans* 2.7%). تم إجراء حساسية المضادات الحيوية عن طريق طريقة انتشار الأجار وطريقة الحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC). تم البحث عن جينات مقاومة الفانكوميسين *vanA* و *vanB* عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) ثم تم تحديد تسلسلها بواسطة مختبر Genoscreen في ليل (فرنسا). تم استخدام الإصدار 20 من برنامج SPSS حزمة IBM الإحصائية لإحصاءات العلوم الاجتماعية (SPSS) 20 لتحليل البيانات التي تم الحصول عليها من الدراسة.

أظهر تفاعل البوليميراز المتسلسل للجين *tuf* " نوعين سائدين هما *E. faecalis* و *E. faecium* تتمتع جميع العزلات بمقاومة متعددة للأدوية ، وقد تميز اثنان من *E. faecium* بمقاومتهما للفانكوميسين مع $MICs > 256$ ميكروغرام/مل. في أصل هذه المقاومة ، تم توصيف جين *vanA* وتسلسله ؛ تم إدخال التسلسل الذي تم الحصول عليه في قاعدة بيانات Genbank National Center Biotechnology Information (NCBI)

كشفت هذا العمل عن مستويات مثيرة للقلق من مقاومة المضادات الحيوية في المكورات المعوية، تم العثور على جين *vanA* في اثنين من *E. faecium* كشف تسلسل هذا الجين عن تماثل كامل مع آخر معزول في كوبا ، مما يدل على انتشار عالمي لهذا الجين المقاوم.

الكلمات الدلالية: *CHU* ، **مضاد حيوي** ، *Enterococci* ، **مقاومة** ، *vanA* .

Résumé

Le gène *vanA* continue de se propager dans le monde. L'Algérie ne semble pas être épargnée, mais les données, qui restent sporadiques, sont également anciennes. Cela a justifié l'intérêt d'explorer l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques, tout en se concentrant sur la présence de certains gènes. Etudier la fréquence d'isolement et le niveau de résistance aux antibiotiques d'*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolés pendant deux ans à l'hôpital de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie), tout en recherchant la présence éventuelle des gènes de résistance à la Vancomycine.

Cette étude prospective dans laquelle *Enterococcus spp* a été isolé de cinq services différents, quatre espèces ont été identifiées et confirmées par identification moléculaire du gène «*tuf*» *E. faecalis* 59 (53%), *E. faecium* 47 (42%), *E. avium* 2 (1.8%) et *E. durans* 3 (2.7%). La sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la diffusion sur gélose et la méthode de concentration minimale inhibitrice (CMI). Les gènes de résistance à la vancomycine (*vanA*, *vanB*) ont été recherchés par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) puis séquencés par le laboratoire Genoscreen à Lille (France). Le logiciel SPSS version 20 (IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) statistics 20) a été utilisé pour analyser les données issues de l'étude.

La PCR du gène «*tuf*» a révélé deux espèces prédominantes *E. faecalis* et *E. faecium*. Tous les isolats ont une multirésistance, deux *E. faecium* ont été distingués par leur résistance à la vancomycine avec des CMI > 256 µg /mL. A l'origine de cette résistance, le gène *vanA* a été caractérisé et séquencé ; la séquence obtenue a été introduite dans la base de données du Genbank National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Ces travaux ont révélé des niveaux alarmants de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques, le gène *vanA* a été retrouvé chez deux *E. faecium* ; le séquençage de ce gène a révélé une homologie totale avec un autre isolat à Cuba, ce qui démontre une diffusion mondiale de ce gène de résistance.

Mots-clés : *CHU, Antibiotique, Enterococcus, Résistance, vanA.*

ABSTRACT

The *vanA* gene continues to spread throughout the world. Algeria does not seem to be spared, but the data, which remain sporadic, are also old. This has justified the overriding interest in exploring the current state of antibiotic resistance in *Enterococci*, while focusing on the presence of certain genes. To study the isolation frequency and the level of antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated during two years at the Tlemcen Hospital (northwest Algeria), while investigating the possible presence of *Vancomycin Resistant Enterococci* (VRE).

The present study was a prospective study in which *Enterococcus spp* was isolated from five different departments, four species were identified and confirmed by molecular identification with 'tuf' gene: *E. faecalis* 59 (53%), *E. faecium* 47 (42%), *E. avium* 2 (1.8%) and *E. durans* 3 (2.7%). Antibiotic sensitivity was done by the agar diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. The vancomycin resistance genes (*vanA*, *vanB*) were researched by Polymerase Chain Reaction (PCR) and then sequenced by the Genoscreen laboratory in Lille (France). SPSS software version 20 (IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) statistics 20) was used to analyse the data obtained from the study.

The PCR of the "tuf" gene revealed two predominant species *E. faecalis* and *E. faecium*. All isolates have a multidrug resistance, two *E. faecium* were distinguished by their resistance to vancomycin with MICs >256 µg/mL. At the origin of this resistance, the *vanA* gene was characterised and sequenced; the obtained sequence has been introduced into the Genbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

This work revealed alarming levels of antibiotic resistance in *Enterococci*, the *vanA* gene was found in two *E. faecium*; sequencing of this gene has revealed a total homology with another isolated in Cuba, which demonstrates a worldwide spread of this resistance gene.

Keywords : *CHU, Antibiotic, Enterococci, Resistance, vanA.*

Tables des matières.....	I
Liste des abréviations.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	IV
INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	1
CHAPITRE 1 : LES ENTEROCOQUES	3
1. Généralités sur les Entérocoques	3
2. Caractéristiques bactériologiques.....	5
3. Virulence et pathogénicité des entérocoques.....	6
3.1. Substance d'agrégation	7
3.2. Protéine de surface (Esp)	8
3.3. Gélatinase	8
3.4. Hémolysine	9
3.5. Bactériocines	10
3.6. Dismutase extracellulaire.....	10
3.7. Hyaluronidase.....	11
3.8. Formation de Biofilm	11
4. Infections et entérocoques.....	11
4.1. Infections urinaires.....	12
4.2. Bactériémie.....	12
4.3. Infections intra-abdominales et pelviennes	13
4.4. Endocardites	13
4.5. Infections du site opératoire (ISO).....	13
4.6. Autres infections	14
4.7. Entérocoques et Covid 19	14
CHAPITRE 2 : ETAT DE RESISTANCE DES ENTEROCOQUES	15
1. Résistance et évolution dans le monde.....	15
2. Résistances et mécanismes de résistance chez les entérocoques	17
2.1. Résistance intrinsèque.....	17
2.2. Résistance acquise (Figure 5)	19
2.2.1. Résistance aux de β -lactamines	19
2.2.2. Résistance aux glycopeptides.....	20
2.2.3. Résistance à la daptomycine	25

2.2.4.	Résistance aux macrolides et aux lincosamides	26
2.2.5.	Résistance à la tétracycline	26
2.2.6.	Résistance à la rifampicine	27
2.2.7.	Résistance aux quinolones	27
2.2.8.	Résistance aux oxazolidines	28
CHAPITRE 3 : PROGRAMME DE SURVEILLANCE DES ENTEROCOQUES		29
1.	Traitement actuel des infections à Entérocoques	29
2.	Recommandations et mesures de prévention des infections à entérocoques.....	30
MATERIEL ET METHODES		31
1.	Prélèvements	31
2.	Isolement et purification	31
3.	Identification	32
3.1.	Identification biochimique	32
3.1.1.	Recherche de la catalase.....	32
3.1.2.	Activité hémolytique.....	33
3.1.4.	Identification génotypique des souches d'entérocoques isolées.....	33
3.1.4.1.	Extraction d'ADN chromosomique	34
3.1.4.2.	Recherche du gène <i>Tuf</i>	34
3.1.4.3.	Séquençage du gène « <i>tuf</i> »	35
4.	Détermination phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérocoques isolées	36
5.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur microplaque	36
6.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices des glycopeptides par E-test	37
7.	Analyse statistique	37
8.	Recherche et amplification des gènes de résistance à la vancomycine par PCR.....	38
8.1.	Extraction d'ADN plasmidique.....	38
8.1.1.	Extraction par la technique de (<i>Courvalin et al., 1985</i>)	38
8.1.2.	Extraction Avec le Kit Nucleospin Tissue	39
8.2.	Recherche des gènes de résistance aux glycopeptides : gène <i>VanA</i> et <i>VanB</i>	41
8.2.1.	Amplification des gènes <i>vanA</i> chez les souches témoins.....	41
8.2.2.	Recherche des gènes <i>vanA</i> chez les souches d' <i>Enterococcus faecium</i>	42
8.3.	Recherche du gène <i>VanB</i> par PCR	43
8.4.	Recherche des gènes <i>VanA</i> et <i>VanB</i> par le laboratoire Genoscreen (Lille-France) (compte rendu en annexe III)	44
8.4.1.	Extraction des ADN.....	44
8.4.2.	Conditions PCR	44



9. Séquençage des gènes <i>Van</i>	45
RESULTATS ET DISCUSSION	46
1. Epidémiologie.....	46
2. Identification.....	49
2.1. Répartition des souches d'entérocoques selon les services et le type de prélèvements..	51
3. Résultats de l'état de résistance des souches de <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i> vis-a-vis des familles d'antibiotiques.....	52
4. Etat de multirésistance chez les souches d' <i>E. faecalis</i> et d' <i>E. faecium</i> isolées.....	57
5. Concentrations minimales inhibitrices	58
5.1. Résultats des CMI des glycopeptides : Cas de la vancomycine.....	59
5.2. Résultats des CMI des β -lactamines	62
5.3. Résultats des CMI des Fluoroquinolones (Ciprofloxacine)	62
5.4. Résultats des CMI des Aminosides (Gentamicine, Amikacine).....	63
6. Concentration minimales inhibitrices par E-test.....	64
7. Recherche des gènes <i>VanA</i> et <i>VanB</i>	65
8. Résultat du séquençage des gènes <i>Van</i> des ADN des souches d' <i>Enterococcus faecium</i>	68
CONCLUSION	72
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74

AK : Amikacine
AMC : Amoxicilline/Acide clavulanique
AMP : Ampicilline
BEA : Bile Esculine Agar
BHIB : Bouillon cœur cerveau
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CC17: complexe clonal 17
CDS = CoDing Sequences
CIP : Ciprofloxacine
CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
COVID-19 : Corona virus disease 2019
EI : Endocardite infectieuse
EPI : équipements de protection individuelle
EQ: Eau Ultra Pure
ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine
ERVfm: Enterococcus faecium résistant à la vancomycine
Esp : Protéine de surface
GN : Gentamicine
IPM : Imipénème
ISO : Infection du site opératoire
LAB : Lactic Acid Bacteria
MH : Muller Hinton
mM : Milli Molaire
NCBI : National Center for Biotechnology
pb : Paire de bases
PAI : îlot de pathogénicité
PBP : Protein Binding Penicillin
PCR : Polymerase chain reaction
PLP : Protéine de liaison à la pénicilline
SA : substance d'agrégation
SARS : syndrome respiratoire aigu sévère
ST: sequence type
TAE : Tampon Tris Acétate EDTA
TBE : Tampon Tris Borate EDTA
Tec : Teicoplanine
Tuf : Gène codant pour le facteur d'élongation Tu
VA : Vancomycine
Van : gène de résistance à la vancomycine
WGS: Whole Genome sequencing

Tableau 1. Facteurs de virulence des entérocoques (Fiore <i>et al.</i> , 2018)	6
Tableau 2. Résistance Intrinsèque et acquise chez les entérocoques (Şanlibaba, 2018)	17
Tableau 3. Mécanismes de résistance intrinsèque aux antibiotiques chez les entérocoques (Kiruthiga et Padmavathy, 2020)	18
Tableau 4. Résumé des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des opérons chez les ERV (Ahmed et Baptiste, 2018)	24
Tableau 5. Origine des prélèvements effectués dans chaque service	31
Tableau 6. Amorces utilisées pour la recherche du gène ' <i>Tuf</i> '	34
Tableau 7. Composition des mélanges réactionnels pour la PCR	35
Tableau 8. Propriétés des couples d'amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance à la vancomycine	41
Tableau 9. Préparation du mix pour l'amplification des souches contrôle	41
Tableau 10. Préparation du mix pour les souches d' <i>E. faecium</i>	42
Tableau 11. Conditions PCR suivies par le laboratoire Genoscreen (Lille)	44
Tableau 12. Nombre de prélèvements effectués dans chaque service	46
Tableau 13. Pourcentage et profils de résistance des deux espèces <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	57
Tableau 14. Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) des entérocoques testés	59
Tableau 15. Résistance à la vancomycine chez les entérocoques (Werner <i>et al.</i> , 2008)	61

Figure 1. Arbre phylogénétique de 49 genres d' <i>Enterococcus</i> basé sur les séquences de l'ARNr 16S (Zhong <i>et al.</i> , 2017)	4
Figure 2. <i>E. faecalis</i> par microscopie électronique à balayage (x4000)	5
Figure 3. Organisation structurale générale des substances d'agrégation chez les Entérocoques	7
Figure 4. Modèle pour l'expression de la cytolysine chez <i>E. faecalis</i>	9
Figure 5. Mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques chez les entérocoques (Mercuro <i>et al.</i> , 2018)	20
Figure 6. Diagramme schématique des opérons <i>van</i> chez les entérocoques.	21
Figure 7. Mécanismes de résistance à la daptomycine chez les entérocoques	25
Figure 8. Schéma illustratif pour l'identification préemptive des Entérocoques d'intérêt clinique (Leyral et Joffin, 1998)	32
Figure 9. Protocole pour l'extraction et la purification d'ADN plasmidique selon (Courvalin <i>et al.</i> , 1985)	38
Figure 10. Protocole pour l'extraction et la purification d'ADN génomique NucleoSpin Tissue (Macherey-Nigel)	40
Figure 11. Programme de la réaction d'amplification en chaine (<i>VanA</i> , <i>VanB</i>)	43
Figure 12. Distribution de l'infection selon la tranche d'âge chez les patients hospitalisés en service de chirurgie – CHU TLEMCEN	47
Figure 13. Répartition des infections urinaires chez les patients hospitalisés dans le service d'urologie– CHU TLEMCEN	48
Figure 14. Résultats de l'identification selon les espèces par le système API Strep	50
Figure 15. Résultat de l'identification par PCR du gène ' <i>tuf</i> '	50
Figure 16. Répartition des souches selon les services	51
Figure 17. Répartition des souches selon le type de prélèvements	52
Figure 18. Profils de résistance des deux espèces <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	56
Figure 19. Etat de multirésistance des deux espèces <i>E. faecalis</i> et <i>E. faecium</i>	58
Figure 20. Résultats des CMI par E-test vis-à-vis des glycopeptides pour les deux souches d' <i>E. faecium</i> isolées	64
Figure 21. Analyse par amplification en chaine (PCR) de l'ADN des deux souches d' <i>Enterococcus faecium</i> et recherche des gènes <i>Van</i> selon les deux techniques utilisées	67
Figure 22. Séquence de la souche EF1. <i>VanA</i> soumise à Genbank	70

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Cliniquement, *E. faecalis* et *E. faecium* sont les deux principales espèces trouvées chez l'homme (**Kristich et al., 2014**). Bien que faisant partie de la flore intestinale, ils se retrouvent souvent dans des infections mixtes, avec d'autres organismes plus virulents, tels que les bacilles à Gram négatif ou les anaérobies ; mais ils peuvent aussi être responsables d'infections graves comme les infections des voies urinaires, ou encore l'endocardite et la bactériémie (**Higuita et al., 2014**).

Selon le National Healthcare Safety Network, les espèces d'entérocoques ont été classées au deuxième rang des infections associées aux soins de santé entre 2011 et 2014. En particulier, *E. faecalis* dans 7,4% des cas. En outre, les espèces d'entérocoques se sont révélées être le premier isolat responsable d'infections associées aux cathéters centraux, suivi des infections du site opératoire, les infections des voies urinaires associées aux sondes urinaires, et des pneumonies associées au respirateur (**Levitus et al., 2020**).

En Algérie, ces infections ne cessent de gagner du terrain, entraînant chaque jour une morbidité et une mortalité exponentielles, générant un surcoût important. Elles sont le résultat de plusieurs facteurs, telle la pression de sélection exercée par les antibiotiques, un dysfonctionnement des procédures thérapeutiques et un déséquilibre de l'hygiène hospitalière. La surveillance devient plus que jamais indispensable, notamment contre les microorganismes qui se caractérisent à la fois par leur longévité sur supports et leur capacité d'adaptation aux différentes conditions auxquelles ils sont soumis, et par leur résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques (**Stucki et al., 2014**).

La prise en charge thérapeutique des infections à entérocoques implique souvent l'utilisation d'un agent bloquant la synthèse de la paroi comme l'ampicilline, la pénicilline et la vancomycine en association avec un aminoside ; ces pratiques s'accompagnent fréquemment de l'émergence de résistances. A l'origine du phénomène, plusieurs gènes contribuent à améliorer les réponses aux molécules disponibles. Cette résistance peut être intrinsèque ou acquise par des mutations ou des transferts de gènes horizontaux, y compris des systèmes « *Van* » qui codent pour la résistance à la vancomycine (**Werner et al., 2008**).

L'émergence des entérocoques résistants à la vancomycine en Algérie a été rapportée depuis 2006, décrivant les deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium* isolées dans la région d'Alger caractérisées par une multirésistance à la vancomycine et à la teicoplanine avec des concentrations minimales inhibitrices supérieures à 256 µg/mL [(Aggoune *et al.*, 2008 ; Hamidi *et al.*, 2013)]. Des données récentes confirment l'apparition de nouvelles souches d'*Enterococcus* portant des gènes de résistance variés (Benammar *et al.*, 2018).

Face à cette situation, et afin de trouver une réponse thérapeutique adaptée au contexte, il est impératif de comprendre le phénomène en évaluant l'état actuel de la résistance aux antibiotiques. Le but de cette étude a été d'évaluer le niveau et le profil de résistance des espèces d'*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées à l'hôpital universitaire de Tlemcen, en détectant la présence éventuelle du gène « *Van* ».

***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

CHAPITRE 1 : LES ENTEROCOQUES

1. Généralités sur les Entérocoques

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

Selon la topologie de l'arbre chronologique, les humains et les mammifères peuvent être les hôtes originaux des *Enterococcus* (**Zhong et al., 2017**). L'estimation de l'horloge moléculaire, ainsi que l'analyse de leur distribution environnementale, la diversité phénotypique et la concordance avec les archives fossiles de l'hôte, situent les origines des entérocoques à l'époque de la terrestrialisation animale entre 425 et 500 millions d'années (**Lebreton et al., 2017**).

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

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

Le genre *Enterococcus* appartient au groupe des bactéries lactiques (LAB) et représente le troisième plus grand genre LAB après *Lactobacillus* et *Streptococcus* [(**Franz et al., 2011**) ; (**Hanchi, 2018**)]. Les genres de LAB parmi lesquels les entérocoques sont groupés possèdent une faible teneur en G + C <50 mol% (soit 37,5% de GC dans le chromosome d'*Enterococcus faecalis*) (**Paulsen et al., 2003**).

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

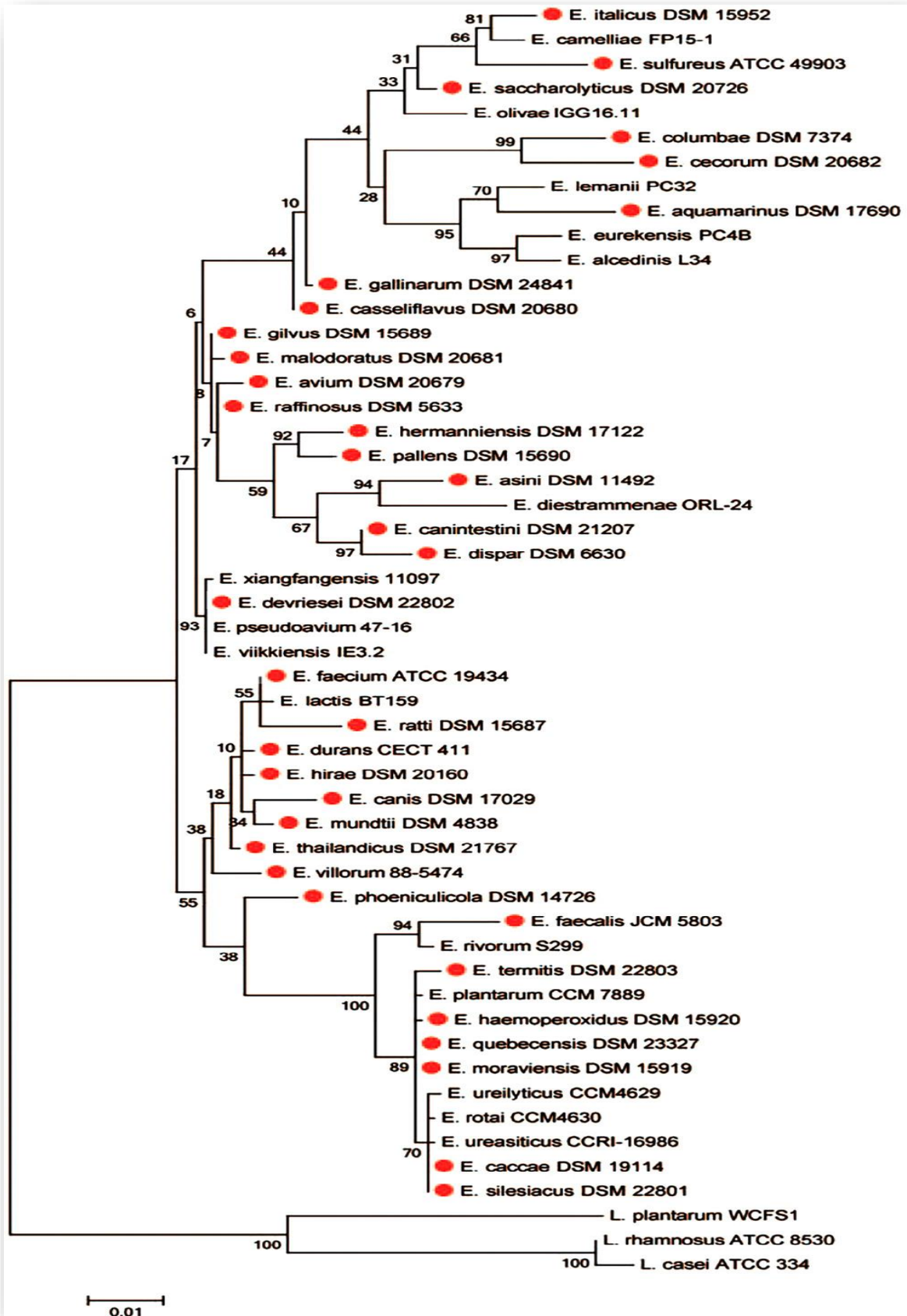


Figure 1. Arbre phylogénétique de 49 genres d'*Enterococcus* basé sur les séquences de l'ARNr 16S (Zhong *et al.*, 2017).

De nouvelles espèces ont été récemment découvertes : *Enterococcus dongliensis* (Li et Gu, 2019), et *Enterococcus florum* (Techo et al., 2019), *Enterococcus burkinafasonensis* (Gouba et al., 2020), et *Enterococcus xinjiangensis* (Ren et al., 2020).

2. Caractéristiques bactériologiques

Les Entérocoques se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes (**Figure 2**), Ils ont une taille comprise entre 0,6 et 2 μm . Ce sont des anaérobies facultatifs non sporulants et des chimio-organotrophes fermentatifs obligatoires, certaines espèces peuvent être mobiles par des flagelles rares. Ils sont oxydase et catalase négatives bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans leur génome [(Paulsen, 2003) ; (Lebreton et al., 2014)].

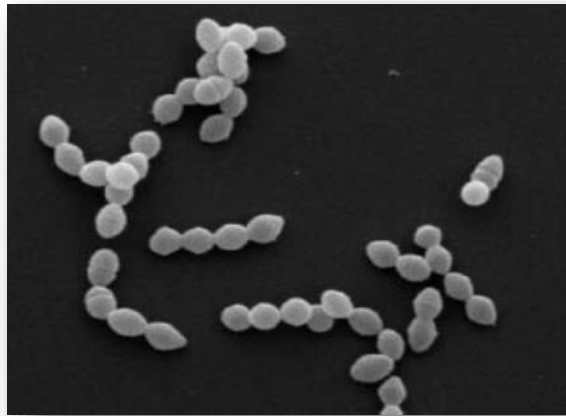


Figure 2. *E. faecalis* par microscopie électronique à balayage (x4000)
(Portenier et al., 2003)

Ils poussent dans des conditions hostiles de 6,5 % de NaCl, dans du lait renfermant 0,1 % de bleu de méthylène, dans des concentrations en sels biliaires de 40 %, ils sont capables d'hydrolyser l'esculine en "esculétine" (noircissement caractéristique du milieu bile esculine) et tolèrent une gamme de pH comprise entre 4,4 et 9,6 (Aguilar-Galvez, 2012).

E. faecalis et *E. faecium* peuvent survivre à une température de 60 ° C pendant 30 minutes, ce qui permet de les distinguer des autres genres apparentés tels que *Streptococcus* (Foulquie et al., 2006).

La gélose trypticase soja ou la gélose Columbia contenant 5% (v/v) de sang de mouton défibriné peuvent être utilisées pour évaluer l'hémolyse produite par les entérocoques (**Domig et al., 2003**).

Une grande variété d'hydrates de carbone est produite dans un bouillon de fermentation du glucose avec principalement de l'acide lactique à un pH final de 4,2 à 4,6. Les entérocoques ne réduisent pas normalement les nitrates et ne peuvent pas digérer la cellulose ou la pectine [(**Flahaut et al., 1996**) ; (**Laplace et al., 1996**)].

En anaérobiose, le lactate est le principal produit du métabolisme du glucose, tandis qu'en condition d'aérobiose, les produits du métabolisme sont l'acétate et le CO₂. Ces espèces sont capables de métaboliser divers types de sucres comme le N-acétyl glucosamine, l'amygdaline, l'arbutine, le cellobiose, le D-fructose, le galactose, le β-gentiobiose, le glucose, le lactose, le maltose, le D-mannose, le β-D-méthyle glucopyranoside, le ribose, la salicine et le tréhalose [(**Schleifer et al., 1984**) ; (**LeBlanc, 2006**)].

3. Virulence et pathogénicité des entérocoques

Les entérocoques possèdent un certain nombre de facteurs de virulence (**Tableau 1**) qui permettent l'adhérence aux cellules hôtes et la matrice extracellulaire, facilitent l'invasion tissulaire, et l'effet d'immunomodulation et causent des dommages à médiation par la toxine (**Fiore et al., 2018**).

Tableau 1. Facteurs de virulence des entérocoques (Fiore et al., 2018)

Facteurs de virulence	Description
Hémolysine	Hémolysine/ bactériocine, lyse une large gamme de cellules eucaryotes et Gram-positives
Gélatinase	Métalloprotéase de zinc sécrétée
Sérine protéase	Sérine protéase sécrétée
Hyaluronidase	Dégrade l'acide hyaluronique
Esp	Protéine ancrée dans la paroi cellulaire, améliore la formation de biofilm et la colonisation de l'épithélium de la vessie
Substance d'agrégation	Protéine ancrée dans la paroi cellulaire, impliquée dans la conjugaison et l'adhésion aux cellules eucaryotes
Ace	Protéine ancrée dans la paroi cellulaire, protéine de liaison au collagène

Epa	Antigène polysaccharidique entérococcique, polysaccharide de paroi cellulaire anti-phagocytaire capsulaire
Cps	Polysaccharide capsulaire, polysaccharide de la paroi cellulaire antiphagocytaire
LTA	Acide lipotéichoïque, antigène du groupe entérococcique, substance de liaison pour la conjugaison Réactif
Métabolites toxiques	Espèces réactives à l'oxygène : superoxyde extracellulaire, peroxyde d'hydrogène

3.1. Substance d'agrégation

La substance d'agrégation (SA) est une adhésine de surface qui médie le contact cellule-cellule pendant l'accouplement sensible aux phéromones des cellules *d'E. faecalis* du donneur et du receveur, ce qui est crucial pour le transfert de plasmide (**Figure 3**) (Clewell et Weaver, 1989).

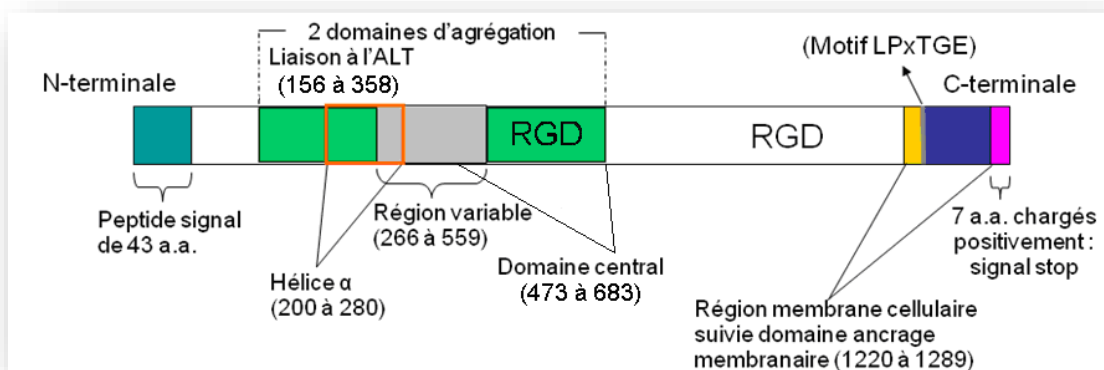


Figure 3. Organisation structurale générale des substances d'agrégation chez les Entérocoques (Clewell et Weaver, 1989)

La SA peut renforcer la virulence d'*E. faecalis* en servant d'adhésine dans les interactions hôte-bactérie, et c'est un facteur déterminant dans au moins quatre modes distincts :

- ✓ Elle joue un rôle dans la diffusion de facteurs de virulence codés par des plasmides, tels que la cytolysine entérococcique et les déterminants de la résistance aux antibiotiques dans l'espèce [(Clewell, 1981 ; Manson *et al.*, 2010)].

- ✓ Elle peut faciliter la fixation des entérocoques aux cellules épithéliales rénales et intestinales et la colonisation de ces surfaces [(Kreft *et al.*, 1992 ; Olmsted *et al.*, 1994)].
- ✓ Elle peut aussi protéger contre les leucocytes polynucléaires (PMN) ou de mise à mort des macrophages à médiation par la promotion de la phagocytose des bactéries de manière à activer les PMN ou les macrophages, mais n'entraîne pas la destruction microbienne [(Arduino *et al.*, 1994) ; (Rakita *et al.*, 1999)].
- ✓ La substance d'agrégation et la cytolysine ont des actions synergiques, qui renforcent la virulence en activant le mode de quorum-sensing dans la régulation de la cytolysine, ce qui se traduira par des dommages des tissus et l'invasion des tissus plus profonds (Chow *et al.*, 1993).

3.2. Protéine de surface (Esp)

La protéine de surface entérocoquique a été identifiée pour la première fois chez une souche d'*E. faecalis* très virulente, résistante à la gentamicine provenant d'une bactériémie. Cette protéine de 202 kDa possède des caractéristiques structurales propres aux protéines de surface des bactéries à Gram-positif (Shankar *et al.*, 1999).

La contribution de la protéine de surface (Esp) à la colonisation et la persistance d'*E. faecalis* dans les infections des voies urinaires a été démontrée dans un modèle animal (Shankar *et al.*, 2001). Esp est également associée à la promotion de l'attachement primaire et à la formation de biofilm d'*E. faecalis* sur les surfaces abiotiques (Toledo-Arana *et al.*, 2001).

De plus, la formation de biofilm par *E. faecalis* a également été observée sur les parois dentinaires, et cette forme d'organisation pourrait permettre aux bactéries de résister à l'effet bactéricide du médicament à base d'hydroxyde de calcium sur les canaux de la racine infectée (Distel *et al.*, 2002).

3.3. Gélatinase

La gélatinase purifiée par Makinen *et al.*, en (1989), est capable de dégrader un certain nombre de substrats, notamment la gélatine, l'insuline, l'endothéline humaine, le collagène, les peptides liés aux phéromones sexuelles d'*E. faecalis* et plusieurs peptides bioactifs de mammifères (Makinen, P et Makinen, 1994).

Il a également été démontré que la gélatinase clive les protéines de surface mal repliées d'*E. faecalis* ainsi que la fibrine, pour réduire taux de phéromones chez cette espèce par activation d'une autolysine. Il a été rapporté que des souches d'*E. faecalis* isolées à partir de patients hospitalisés ont une augmentation de la production de la gélatinase par rapport aux souches communautaires (Coque *et al.*, 1996).

3.4. Hémolysine

L'hémolysine (cytolysine) est une toxine plasmidique produite par des souches d'*E. faecalis* bêta-hémolytiques. Elle lyse les érythrocytes, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, elle tue les cellules bactériennes et peut conduire à la réduction de la phagocytose [(Gilmore *et al.*, 1990) ; (Booth *et al.*, 1996)].

La production et l'activation de la cytolysine implique une série d'étapes complexes (Figure 4). Les précurseurs du facteur lytique CylLL (La longue sous-unité) et CylLS (courte sous-unité) sont synthétisés par les ribosomes puis modifiés par CylM. Les peptides modifiés sont ensuite clivés par protéolyse et sécrétés de la cellule par les transporteurs CylB et ABC. Les sous-unités peptidiques sécrétées CylLL et CylLS sont ensuite clivées et activées au niveau extracellulaire par CYLA, une sérine protéase. Entièrement matures, CylLL et CylLS sont tous les deux nécessaires pour la lyse des cellules cibles (Haas et Gilmore, 1999).

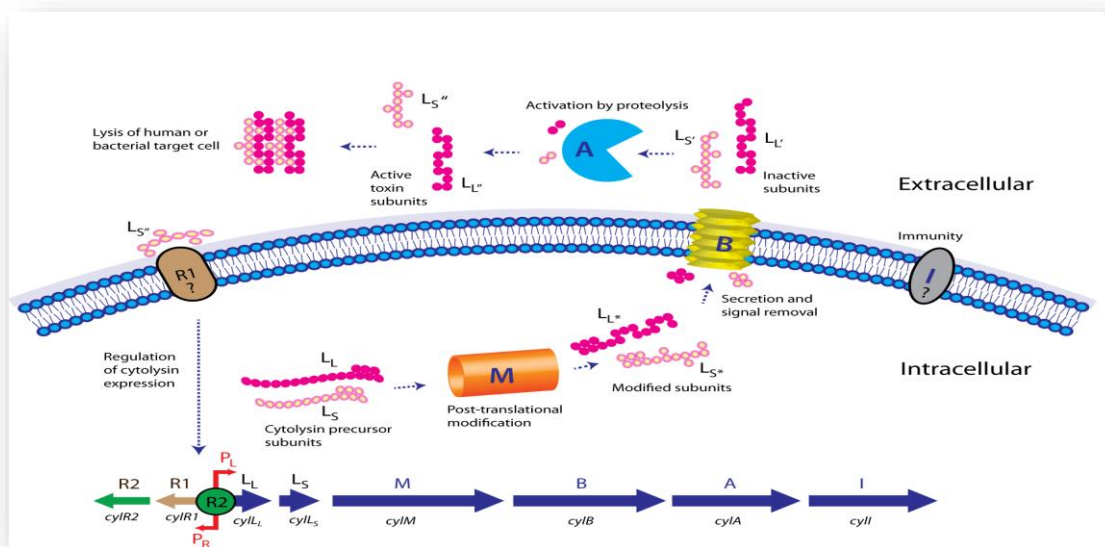


Figure 4. Modèle pour l'expression de la cytolysine chez *E. faecalis* (Garsin *et al.*, 2014)

3.5. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens extracellulaires qui démontrent une activité envers des espèces bactériennes étroitement liées. Quatre gènes sont nécessaires afin de produire les bactériocines : un gène de structure codant pour un pré-peptide, un gène d'immunité (auto-protection), un gène transporteur ABC et un gène codant pour une protéine requise à l'exportation de la bactériocine. Les bactériocines sont formées en tant que pré-peptide dans la cellule et la maturation se fait durant l'exportation. Les bactériocines sont des protéines cationiques et amphiphiles contenant peu ou pas de cystéine (**Garneau et al., 2002**).

Les genres *Enterococcus* sont connus pour produire une grande variété d'entérocoques incluant les entérocoques A, B et P, lesquelles sont actives contre les espèces *Listeria*, *Clostridium* et *Staphylococcus aureus* (**Campos et al., 2006**). La plupart des bactériocines produites par *E. faecalis* et *E. faecium* sont identiques aux entérocoques A et B étant les premières décrites chez *E. faecium* CTC492 et *E. faecium* T136 (**De Kwaadsteniet et al., 2005**).

L'activité des bactériocines envers des bactéries à Gram-négatif est plutôt inhabituelle, mais la bactériocine ST15 d'*E. mundtii* peut être efficace contre une variété de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif telles que *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* et *Pseudomonas* (**De Kwaadsteniet et al., 2005**).

Une autre bactériocine, appelée bactériocine 51, isolée de la souche clinique résistante à la vancomycine *E. faecium* VRE38 et codée sur le plasmide mobile *pHY* (6kb), a été caractérisée. La bactériocine 51 (Bac 51) démontre une activité à spectre plutôt étroit et est active contre les souches *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. Contrairement à l'effet bactéricide produit par les bactériocines formatrices de pores, le mode d'action de la bactériocine 51 est bactériostatique. Cette dernière a été identifiée chez des isolats d'*E. faecium* cliniques à une fréquence de 2%, mais elle n'a pas été détectée chez des isolats cliniques d'*E. faecalis*. Ceci semble indiquer que Bac 51 est spécifique aux isolats cliniques *E. faecium* (**Yamashita et al., 2011**).

3.6. Dismutase extracellulaire

La production de superoxyde extracellulaire est également associée à la virulence des entérocoques, et il a été démontré que sa production est nettement plus élevée dans les souches invasives que chez les isolats commensaux [(**Mundy et al., 2000 ; Huycke et al., 2002**)].

3.7. Hyaluronidase

Elle peut provoquer des lésions tissulaires en catalysant l'hydrolyse de l'acide hyaluronique, un composant de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Il a été suggéré que *E. faecium* décompose l'acide hyaluronique de l'hôte en substrats plus simples qui sont transportés et métabolisés dans la cellule bactérienne lui fournissant ainsi des nutriments **(Rice et al., 2003)**.

3.8. Formation de Biofilm

De nombreux microorganismes sont capables de former des communautés microbiennes attachées sur une surface, appelées biofilms. *E. faecalis* a la capacité de produire du biofilm, ce qui lui permet de survivre dans un environnement défavorable, notamment en présence d'antibiotiques **[(Seno et al., 2005) ; (Guiton et al., 2010)]**.

L'adhérence et la production de biofilm par *E. faecalis* et *E. faecium* sur différents biomatériaux ont été démontrées, et la capacité des entérocoques à se lier à divers dispositifs médicaux, tels que les stents urétraux, les cathéters intravasculaires, les stents biliaires et les dispositifs gastrostomiques en silicone a été associée avec la capacité des entérocoques à produire des biofilms. Les entérocoques dans les biofilms sont plus résistants aux antibiotiques que les entérocoques à croissance planctonique, donc l'impact potentiel de la formation de biofilm pourrait être important **(Mohamed et Huang, 2007)**.

4. Infections et entérocoques

Les bactéries appartenant au genre *Enterococcus* font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux. Cependant, ils peuvent également agir comme des pathogènes opportunistes, et sont reconnus comme des agents importants des infections nosocomiales invasives et non invasives, affectant les patients immunodéprimés gravement malades **(Gawryszewska et al., 2016)**.

Selon un rapport du *World Health Network*, ces agents pathogènes causent environ 12 pour cent de toutes les infections nosocomiales et tuent 1 300 personnes par an **(Jackson et al., 2019)**.

En Europe, Selon le Centre européen de prévention des maladies et contrôle (ECDC), les entérocoques ont été la troisième bactérie, après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, la plus fréquemment isolées des infections nosocomiales **(ECDC, 2013)**.

Enterococcus faecalis et *Enterococcus faecium* représentent les deux espèces les plus importantes en milieu clinique, tandis que les infections causées par d'autres entérocoques sont rares **[(Gordon et al, 1992) ; (Gawryszewska et al., 2016)]**.

Ces germes sont responsables, chez l'adulte, d'infections urinaires, d'endocardites, de méningites, de pneumonies, de péritonites, d'abcès viscéraux et de septicémies (**De Fatima Silva Lopes et al., 2005**).

4.1. Infections urinaires

Les espèces d'entérocoques sont la deuxième cause la plus fréquente d'infections des voies urinaires associées aux cathéters (CAUTI) signalées au National Healthcare Safety Network. Ils sont impliqués dans approximativement 10% de toutes les infections des voies urinaires et dans 16% des infections urinaires nosocomiales (**Johnson et al., 2004**).

Une étude a montré que le pathogène le plus souvent isolé dans l'infection des voies urinaires était *Escherichia coli* représentant 47% des infections (**Trautner, 2010**), et les entérocoques représentent globalement 5 à 10% des infections urinaires de l'homme mais leur fréquence est plus élevée dans certaines circonstances et sont également incriminés dans les prostatites chroniques comme un pathogène potentiel (**Hooton, 2012**).

4.2. Bactériémie

Dans les années 1980, les entérocoques étaient la sixième cause la plus commune de la bactériémie nosocomiale (**Vergis et al., 2001**) ; ils représentent aux États-Unis, respectivement environ 4% et 9% des bactériémies communautaires et nosocomiales, et sont la deuxième cause la plus fréquente de bactériémies nosocomiales (**Kollef et al., 2011**). De même, en Europe, la prévalence des infections entérocoquiques semble augmenter (**Buetti et al., 2017**).

Au Japon, les entérocoques sont le troisième agent pathogène le plus courant dans les bactériémies nosocomiales et le taux brut de mortalité par bactériémie entérocoquique est le deuxième pire dans les hôpitaux universitaires japonais (**Nagao, 2013**).

Jusqu'à deux tiers des isolats appartiennent à l'espèce *E. faecalis*, et environ un tiers à *E. faecium* [(**Vergis et al., 2001**) ; (**Fernandez-Guerrero et al., 2002**)].

La porte d'entrée pour une bactériémie à entérocoques est généralement le tractus génito-urinaire, bien qu'une bactériémie résulte également souvent de sources intra-abdominales ou biliaires, de lignes centrales à demeure ou d'infections des tissus mous. Les entérocoques font plus souvent partie de la bactériémie polymicrobienne que les autres organismes (**Agudelo Higueta et Huyke, 2014**).

4.3. Infections intra-abdominales et pelviennes

Les infections intra-abdominales et pelviennes sont souvent polymicrobiennes, mais les entérocoques sont des composantes importantes de la flore infectante. Ils sont impliqués dans les péritonites associées aux dialyses péritonéales chroniques ambulatoires, les péritonites spontanées chez les patients cirrhotiques ou néphrotiques, ainsi que dans les salpingites aiguës, les abcès pelviens et d'autres formes de pathologie périnatale (Svec *et al.*, 2005).

4.4. Endocardites

Parmi les infections causées par les entérocoques, l'endocardite infectieuse (EI) est l'une des plus difficiles sur le plan thérapeutique [(Megran, 1992) ; (Munita *et al.*, 2012)]. Les entérocoques représentent entre 10 et 20% de tous les cas d'EI (Murdoch *et al.*, 2009).

E. faecalis étant à l'origine de la majorité des cas. Dans l'EI, la colonisation bactérienne de l'endocarde conduit à des végétations dans les tissus et à une matrice en forme de biofilm entourant les bactéries, qui est difficile à pénétrer soit par le système immunitaire, soit par les antibiotiques (Chuang-Smith *et al.*, 2010).

Les endocardites à entérocoques sont observées le plus fréquemment chez les hommes âgés, souffrant souvent d'infections des voies urinaires ou venant de subir des tests invasifs impliquant de l'instrumentation. Les entérocoques sont considérés depuis leurs premières descriptions comme étant une cause importante d'endocardite. Ces bactéries comptent pour environ 20% des cas d'endocardites bactériennes de la valve native et pour environ 6 à 7% des cas d'endocardites de la valve prothétique. *E. faecalis* est plus souvent responsable d'endocardite que l'espèce *E. faecium* (Fernandez-Guerrero *et al.*, 2002).

4.5. Infections du site opératoire (ISO)

Elles surviennent chez 2 à 5% des patients subissant une chirurgie hospitalière, survenant soit au site d'incision, soit dans les tissus plus profonds ou les organes environnants au site d'incision (Abt *et al.*, 2016). Elles sont fréquentes chez les patients immunodéprimés et sont associées à jusqu'à 7 à 11 jours d'hospitalisation postopératoires supplémentaires, ce qui représente un lourd fardeau économique (Anderson *et al.*, 2014).

4.6. Autres infections

Les infections néonatales, du tractus respiratoire ou du système nerveux central, aussi bien que les otites, sinusites, arthrites septiques et endophthalmies à entérocoques, peuvent se produire dans de rares cas. La plupart des cas d'infections représentent des complications de maladies sous-jacentes (**Svec et al., 2005**). De plus, il y a des évidences du rôle des entérocoques dans les infections dentaires (**Portenier et al., 2003**).

4.7. Entérocoques et Covid 19

Un épisode d'infection nosocomiale à entérocoques impliquant trois patients atteints de COVID-19 et deux patients en soins intensifs SARS-CoV-2 négatifs a été décrit en Allemagne, des souches d'entérocoques résistants à la vancomycine provenant d'échantillons cliniquement pertinents (hémoculture et drainage pleural) et ont été détectés chez trois patients des deux sous-unités de soins intensifs. Un dépistage a été lancé et a révélé deux autres patients positifs à l'ERV. Des prélèvements environnementaux effectués lors de cette période sur les surfaces de contact avec les mains, l'espace de travail, PC, moniteur, support de perfusion, ont donné lieu à 17 échantillons positifs pour *E. faecium*, dont 11 étaient des ERV (**Kampmeier et al., 2020**).

Un séquençage du génome par WGS (Whole genome sequence-based typing) en combinaison avec l'analyse des données épidémiologiques a confirmé que les surfaces contaminées étaient également impliquées dans la transmission de cette espèce (**Kampmeier et al., 2020**).

Une autre étude réalisée en Italie par **Bonazzetti et al., (2021)**, a signalé des bactériémies nosocomiales à entérocoques associées au COVID-19. Une explication possible de la fréquence étonnamment élevée des bactériémies dues à *Enterococcus* peut être la perturbation de la barrière intestinale causée par le SARS-CoV-2. Comme il a été démontré que SARSCoV-2 infecte de manière productive les entérocytes intestinaux humains, il est possible que l'infection par le SRAS-CoV-2 augmente la perméabilité intestinale et la translocation bactérienne, qui est un facteur de risque connu pour le développement de bactériémie. Des études pathologiques sont nécessaires pour faire la lumière sur les dommages possibles de la barrière entérique induits par le SARSCoV-2 (**Bonazzetti et al., 2021**).

CHAPITRE 2 : ETAT DE RESISTANCE DES ENTEROCOQUES

1. Résistance et évolution dans le monde

Les entérocoques sont la deuxième cause d'infections liées aux soins dans le monde et la première cause d'infections aux États-Unis (20 à 30% des infections) (Darvishi *et al.*, 2020). *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les espèces les plus rencontrées en milieu clinique. *E. faecalis* cause 85 à 90% des infections, tandis que, *E. faecium* seulement 5-10% (Jabbari Shiadeh *et al.*, 2019).

L'incidence des infections nosocomiales causée par des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) est particulièrement élevée dans les unités de soins intensifs (ICU) (Simner *et al.*, 2015).

La source la plus constante de transmission dans les centres de soins de santé reste les mains du personnel (Snyder *et al.*, 2008). Les ERV peuvent persister jusqu'à 60 minutes sur les mains et aussi longtemps que 4 mois sur les surfaces [(Noskin *et al.*, 1999 ; Kramer *et al.*, 2006)].

La voie commune pour les ERV nosocomiaux commence par l'acquisition par contact de personne à personne ou par exposition à des objets contaminés, le microbiote intestinal est alors supprimé grâce à une pression antimicrobienne sélective, ce qui permet une prolifération de l'ERV, car il est intrinsèquement résistant à plusieurs antibiotiques (O'Driscoll et Crank, 2015).

Une augmentation significative de la prévalence des ERV a été observée dans de nombreux pays. Notamment en Allemagne où la proportion d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine a augmenté rapidement de <5% en 2001 à 14,5% en 2013 [(Gastmeier *et al.*, 2014 ; ECDC, 2017)].

Selon le rapport de surveillance de 2016 du Réseau Européen de Résistance aux Antimicrobiens (EARS-Net), sept pays parmi les 30 participants, ont affiché les taux de résistance les plus élevés des ERV : l'Irlande (44,1%), Grèce (27,9%), Slovaquie (26,4%), Pologne (25,2%) et la Hongrie (22,5%), tandis que les pays voisins ont des proportions de résistance à la vancomycine beaucoup plus faibles (Pologne, 8,4% ; Autriche, 3,2% ; Danemark, 2,0% ; Belgique 1,4% ; France, 0,8% ; et Pays-Bas 0,0%) (Gastmeier *et al.*, 2014).

Aux États-Unis, les entérocoques sont le troisième agent pathogène nosocomial le plus courant, à l'origine de 14% des infections nosocomiales entre 2011 et 2014, contre 11% en 2007 [(Hidron *et al.*, 2008) ; (Weiner *et al.*, 2016)].

En Afrique, la prévalence des entérocoques résistants à la vancomycine était autour de 16% en Ethiopie depuis 2015 (Melese *et al.*, 2020), 17,2% en Egypte (Aladarose, 2019), 21% au Maroc (Hannaoui *et al.*, 2016) et 7,7% en Tunisie (Elhani *et al.*, 2014).

En Algérie, peu de données et de travaux sont disponibles, En 2006, le premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine a été isolé des urines d'un patient dans un hôpital militaire à Alger (Aggoune *et al.*, 2008), d'autres infections à *Enterococcus* ont été signalées en 2010 et 2011 [(Djahmi *et al.*, 2012 ; Hamidi *et al.*, 2013)]. En 2018, Benammar *et al.*, ont signalé la présence de quatre souches d'*Enterococcus faecium* porteuses de gène de résistance à la vancomycine à l'hôpital de Batna. Le taux d'ERV en Algérie reste très bas (2,8%) contrairement à l'Afrique du sud qui enregistre un taux élevé de 74,8% (Begashaw, 2019).

La prévalence des ERV en Asie peut varier de 17% en Iran (Jahansepas *et al.*, 2017), 17,3% en Arabie saoudite (Alotaibi et Bukhari, 2017), et en chine la fréquence des ERV est <5%, due à la non utilisation de la vancomycine orale en traitement (Hu *et al.*, 2018).

Les facteurs de risque de colonisation comprennent les caractéristiques de l'hôte et l'exposition aux antimicrobiens. Un risque accru de colonisation par l'ERV se produit avec l'immunosuppression, les hémopathies malignes, la transplantation d'organe, une hospitalisation prolongée dans une unité de soins intensifs (USI) ou dans un établissement de soins, l'infection d'un autre site corporel, la proximité avec un autre patient colonisé ou infecté, une hospitalisation dans une unité à forte prévalence d'ERV, et des états de comorbidités graves tels que le diabète, ou l'insuffisance rénale (O'Driscoll et Crank, 2015).

Une exposition préalable aux antimicrobiens est le plus grand prédicteur de la colonisation des ERV, y compris l'administration orale et intraveineuse (IV) de vancomycine (Van der Auwera *et al.*, 1996), d'aminosides (Ghanem *et al.*, 2007), de céphalosporines [(Torniepoth *et al.*, 1996) ; (Fridkin *et al.*, 2001)], d'agents anti-anaérobies tels que la clindamycine et le métronidazole et les carbapénèmes (Ghanem *et al.*, 2007).

2. Résistances et mécanismes de résistance chez les entérocoques

Les entérocoques sont beaucoup plus résistants de façon intrinsèque envers les antimicrobiens que d'autres bactéries à Gram-positif cliniquement importantes (**Tableau 2**). Une des hypothèses est que cette résistance naturelle résulterait de leur besoin de survivre et de persister dans des écosystèmes hautement compétitifs et potentiellement défavorables, tels que le tractus gastro-intestinal (**Tannock et Cook, 2002**).

Tableau 2. Résistance Intrinsèque et acquise chez les entérocoques (Şanlıbaba, 2018)

Résistance Intrinsèque	Résistance Acquise
β-Lactamines (particulièrement les céphalosporines et les pénicillines)	β-lactamines à fortes concentrations, par altération des PLPs ou par production de β-lactamases
Aminosides à faibles concentrations	Aminosides à fortes concentrations
Clindamycine	Glycopeptides (vancomycine, teicoplanine)
Fluoroquinolones	Tétracycline
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	Erythromycine
	Fluoroquinolones
	Rifampicine
	Chloramphénicol
	Acide Fusidique
	Nitrofurantoin

2.1. Résistance intrinsèque

Les entérocoques possèdent une résistance intrinsèque *in vitro* et/ou *in vivo* modérée envers plusieurs antimicrobiens utilisés au niveau clinique (bêta-lactamines, aminoglycosides, clindamycine et lincomycine, triméthoprime/sulfaméthoxazole, quinolones, streptogramines A et glycopeptides) (**Tableau 2**).

La résistance intrinsèque modérée correspond à une tolérance de la bactérie face à un antibiotique (exemple : CMI/CMB bêta-lactamines $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ chez l'espèce *E. faecium*).

La résistance complète ou partielle aux bêta-lactamines, particulièrement les céphalosporines et les pénicillines (pénicillinase-résistantes), est une caractéristique du genre *Enterococcus*. Aussi, tous les entérocoques possèdent une résistance modérée aux aminoglycosides avec des CMI allant de 4 à 256 $\mu\text{g/mL}$. De plus, il est intéressant de signaler que les entérocoques sont résistants à des niveaux cliniques envers les lincosamides (clindamycine et lincomycine). La résistance modérée envers la vancomycine est caractérisée par des CMI allant de 8 à 32 $\mu\text{g/mL}$, mais ayant une sensibilité à la téicoplanine (CMI $< 4 \mu\text{g/mL}$), et caractérise la plupart des espèces *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens* (Tannock et Cook, 2002).

Le **Tableau 3** illustre les antibiotiques dont la résistance intrinsèque est décrite dans le genre *Enterococcus* ainsi que leur mécanisme de résistance correspondant.

Tableau 3. Mécanismes de résistance intrinsèque aux antibiotiques chez les entérocoques (Kiruthiga et Padmavathy, 2020)

Antibiotique	Mode d'action	Mécanisme de résistance intrinsèque	Espèce impliquée
Bêta-lactamines Ampicilline Pénicilline	Interfère avec la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines de liaison à la pénicilline	(1) Production de β -lactamases, qui détruisent le cycle β -lactame (2) Présence de PLP modifiés, qui ont une affinité plus faible pour les β -lactamines PLP4, PLP5	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i>
Céphalosporines	Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	(3) Paroi cellulaire altérée (1) Réticulation PLP-5 du peptidoglycane (2) Régulation de la voie de transduction du signal (3) Activité kinase d'IreK (4) Présence du gène <i>mur AA</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecalis</i>
Aminosides	Se lie à l'ARNr 16S de la sous-unité ribosomale 30S et interfère avec la synthèse des protéines	(1) Faible perméabilité de la paroi cellulaire (2) Enzymes modifiant les aminosides (3) Enzymes modifiant le ribosome	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i>
Glycopeptidés	Inhibe la croissance bactérienne en interférant avec la synthèse du peptidoglycane	Présence de 9 phénotypes Van : <i>vanC</i> ; Codes <i>vanC C1, C2, C3, C4</i> pour la résistance intrinsèque (Résistance de bas niveau à la vancomycine mais pas à la téicoplanine)	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i> <i>E. faecium</i>

		<i>vanD</i> ; <i>vanD1, D2, D3, D4, D5</i> (Résistance Faible à élevée pour la vancomycine et la teicoplanine) <i>VanN</i> (Résistance de bas niveau à la vancomycine)	<i>E. faecium</i> <i>E. faecium</i>
Fluoroquinolones	Inhibition des enzymes topoisomérases bactériennes, à savoir l'ADN gyrase et la topoisomérase IV	Présence d'un homologue du gène <i>qnr</i> (<i>qnr E. faecalis</i>) Ofloxacine et ciprofloxacine	<i>E. faecalis</i>
Macrolides/ lincosamide s/ streptogramines	Inhibition de la synthèse des protéines par liaison à la sous-unité 50S du ribosome	Pompe à efflux ABC (Quinupristine, Dalfopristine, Clindamycine) (1) gène <i>msrC</i> (Clindamycine, Streptogramine A et B) (2) gène <i>lsa</i> (Lincosamide et Streptogramines)	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>

2.2. Résistance acquise (Figure 5)

2.2.1. Résistance aux de β -lactamines

Plusieurs souches d'*E. faecium* ont acquis des résistances de haut niveau aux β -lactamines par modification de la protéine de liaison à la pénicilline 5 (PLP5) qui entraîne: (i) une diminution de l'affinité des β -lactamines en raison d'un produit protéique modifié; (ii) une augmentation de la tolérance aux β -lactamines due à la régulation de l'expression génique; ou (iii) une combinaison de modifications (i) et (ii), qui peuvent augmenter la résistance de manière exponentielle (Lee *et al.*, 2019).

Une autre forme de résistance à l'ampicilline, médiée par une β -lactamase qui inactive l'antibiotique par le clivage du cycle β -lactame, a été décrite à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium* (Coudron *et al.*, 1992).

Initialement décrit chez les staphylocoques, le gène *blaZ* code pour une β -lactamase dans le cadre d'un opéron avec *blaR1*, un capteur transmembranaire et un transducteur de signal, et *blaI*, un gène répresseur (Hackbarth et Chambers, 1993).

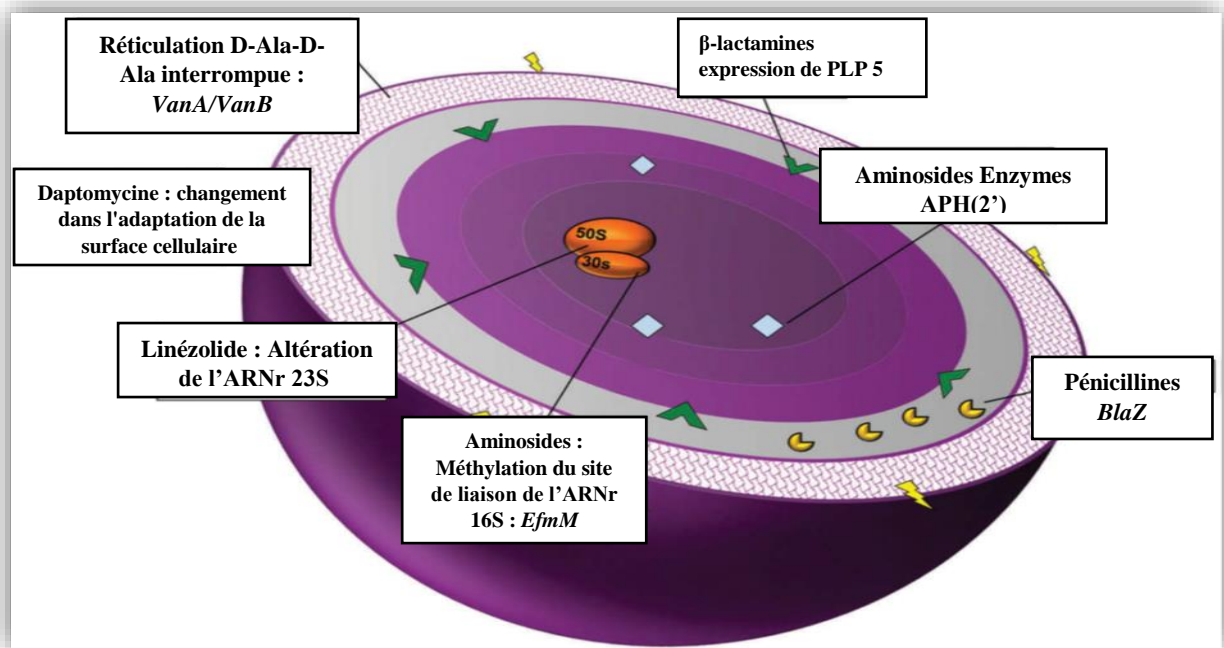


Figure 5. Mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques chez les entérocoques
(Mercurio *et al.*, 2018)

Contrairement aux staphylocoques, où la production de β -lactamase est inductible, *blaZ* chez les entérocoques est exprimé de manière constitutive et à un niveau beaucoup plus faible, donc un inoculum bactérien élevé est nécessaire pour assurer une production suffisante de β -lactamase [(Garrido *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2019)].

2.2.2. Résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides inhibent la croissance bactérienne en interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane. Les antibiotiques forment des complexes avec les extrémités peptidiques D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane sur la surface externe de la cellule, ce qui empêche les enzymes de biosynthèse de la paroi cellulaire de les utiliser comme substrats pour la transglycosylation et la transpeptidation et, par conséquent, une altération de l'intégrité de la paroi cellulaire (Miller *et al.*, 2014).

Au moins huit types de résistance acquise aux glycopeptides ont été rapportés (Tableau 4) sur la base des données phénotypiques et génotypiques (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* et *vanN*) (Figure 6), bien que *vanC* est une caractéristique intrinsèque d'*Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus casseliflavus* [(Courvalin, 2006 ; Cattoir et Leclercq, 2013)].

Des gènes conférant une résistance aux glycopeptides sont désignés selon le nom du gène de la ligase, qui code soit pour un d-Ala-d-Lac (*vanA*, *vanB*, *vanD* et *vanM*) ou un d-Ala-d-Ser (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* et *vanN*) ligase pour la synthèse des précurseurs de peptidoglycane à faible affinité pour les glycopeptides (Woodford, 2001).

Les groupes de gènes *vanA*, *vanB* et *vanD* contiennent des gènes pour un système de régulation à deux composants (*vanR* et *vanS*), trois gènes de résistance (*vanH*, codant pour la déshydrogénase ; *vanA*, *vanB* ou *vanD*, codant pour la ligase ; et *vanX*, codant pour la dd-dipeptidase) ; un gène accessoire (*vanY*) ; et le gène *vanZ*, qui est présent dans le groupe de gènes *vanA*, alors que le gène *vanW* ne se trouve que dans l'opéron *vanB*. Les gènes *van* sont fréquemment localisés dans des plasmides ou des transposons, qui facilitent leur diffusion au moyen de gène de transfert horizontal (Woodford, 2001). Les types de résistance les plus répandus sont *vanA* et *vanB*. Le réservoir du type *VanA* transférable (et en partie du type *VanB*) de la résistance en médecine humaine et dans d'autres habitats est *E. faecium* (Garrido et al, 2014).

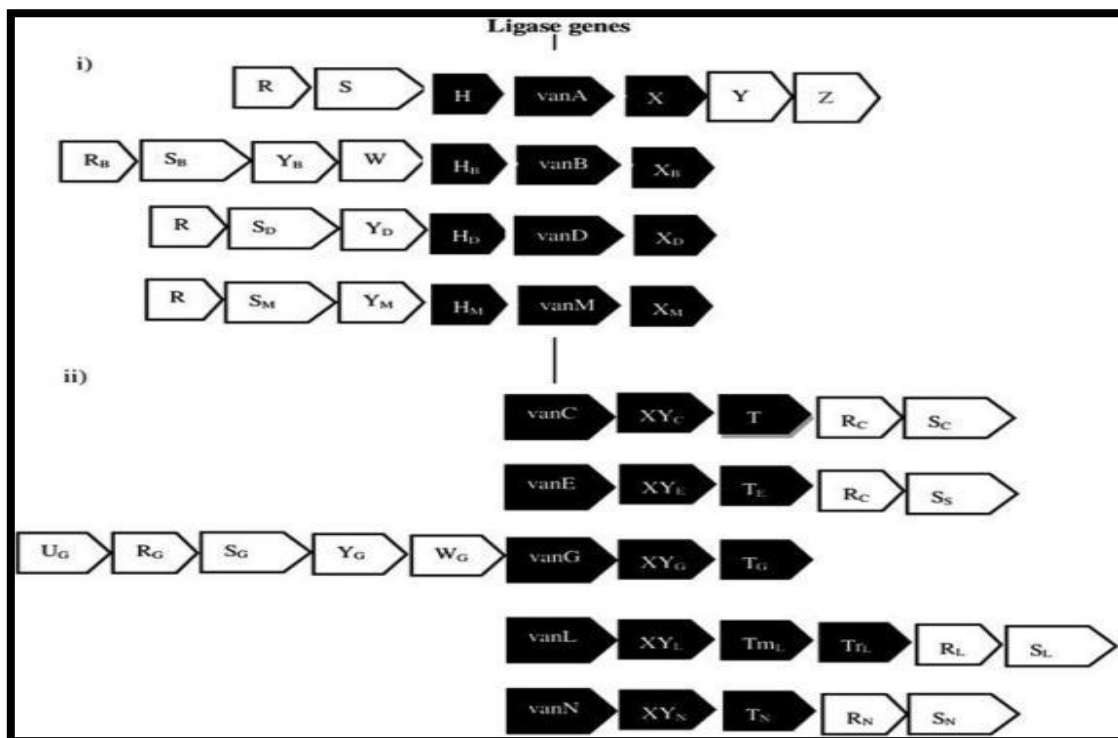


Figure 6. Diagramme schématisé des opérons *van* chez les entérocoques (Ahmed et Baptiste, 2018) (i) D-Ala-D-Lac operons (A, B, D, et M) (ii) D- Opérons Ala-D-Ser (C, E, G, L et N). D-Ala-D-Lac, D-Alanine-D-lactate; D-Ala-D-Ser, D-Alanine-D-Sérine; *vanU*, activateur transcriptionnel (U); régulateur de réponse *vanR*, (R); l'histidine kinase du capteur *vanS* (S); *vanW*, (W) fonction inconnue; *vanH*, (H) déshydrogénase; *vanT*, (T) sérine racémase; *vanTm*, domaine membranaire de sérine racémase (Tm); *vanTr*, domaine de la racémase (Tr) sérine; *vanY*; (Y) carboxypeptidase; *vanX*, (X) di-peptidase; *vanXY*, (XY) dipeptidase / carboxypeptidase; *vanZ*, (Z) fonction inconnue mais impliquée dans la résistance à la teicoplanine.

2.2.2.1. Le phénotype *vanA*

Ce phénotype représente la forme de résistance aux glycopeptides la plus fréquente chez les entérocoques. Généralement, il est associé à une résistance à la vancomycine (CMI $\geq 128 \mu\text{g} / \text{mL}$). La plupart des souches qui montrent ce phénotype est également résistante à la teicoplanine (CMI $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$). Ce type de résistance est induit par les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine, avoparcine et ristocétine) et par d'autres antibiotiques, comme la bacitracine, la polymyxine B ou la robénidine (**Woodford, 2001**).

Le gène *vanA* code pour la D-ala-D-lac ligase (VanA), qui synthétise le dipeptide terminal D-ala-D-lac, avec une affinité beaucoup plus faible pour la vancomycine. Le gène *vanH* code pour une déshydrogénase (VanH), qui produit du D-lactate par réduction du pyruvate. *vanX* code pour une D, D-dipeptidase (VanX), qui hydrolyse le dipeptide D-ala-D-ala, qui est généré par le chromosome ligase Ddl, et constitue la fin du pentapeptide glycopeptide-sensible. De cette façon, l'absence de toute cible de vancomycine dans la paroi cellulaire est assurée (**Woodford, 2001**).

En amont des gènes précités, il existe deux gènes régulateurs, *vanR* et *vanS*, qui codent pour un signal à deux composants du système de transduction (VanR, VanS) chargé de détecter la présence de glycopeptides et pour induire l'expression de gènes de résistance. *VanS* agit comme un capteur pour détecter la présence de vancomycine, il transmet le signal à *VanR*, le régulateur de réponse, ce qui entraîne l'activation de la synthèse d'autres protéines impliquées dans la résistance (VanH, VanA, VanX) (**Garrido et al., 2014**).

Dans les souches de phénotype *vanA*, la vancomycine ainsi que la teicoplanine peuvent induire le phénotype de résistance, bien que les signaux exacts n'ont pas été identifiés (**Garrido et al., 2014**).

2.2.2.2. Le phénotype *vanB*

Dans le phénotype *vanB*, la vancomycine induit une résistance mais pas la teicoplanine donnant un phénotype résistant à la vancomycine, mais sensible à la teicoplanine ; cependant, une expression constitutive (qui peut être sélectionnée par l'exposition à la teicoplanine) entraîne une résistance aux deux composés (**Hollenbeck et Rice, 2012**).

La plupart des éléments *vanB* confèrent un degré variable de résistance à la vancomycine (CMI, 4-1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$), mais la majorité des souches restent sensibles à la teicoplanine in vitro, car cet antibiotique ne peut agir comme inducteur. Cependant, des mutants résistants à la teicoplanine ont été décrits après un traitement in vivo à la vancomycine, ainsi que chez des animaux expérimentaux traités à la teicoplanine (**Hyden et al., 1993**).

Trois formes d'allèle de *vanB* (*vanB1*, *vanB2*, *vanB3*) avec des fonctions homologues de la VanA ligase ont été décrites, correspondant aux phénotypes *VanB1*, *VanB2* et *VanB3*. La présence de séquences d'insertion dans ce groupe est beaucoup plus faible que dans le phénotype *VanA* (Garrido *et al.*, 2014).

La présence de trois sous-types différents suggère qu'ils étaient acquis de forme indépendante de donateurs inconnus. Cependant, il semble que la plupart des phénotypes de résistance médiés par VanB sont acquis par la diffusion horizontale des gènes *vanB2* au moyen de transposons conjugatifs du type Tn916 (Garrido *et al.*, 2014).

Tableau 4. Résumé des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des opérons chez les ERV (Ahmed et Baptiste, 2018)

<i>Van-opéron</i>	Espèces	Niveau de résistance vancomycine vs. teicoplanine	Expression Phénotypique	Location & mobilité
<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	Élevé pour les deux	Inductible	Chromosome
<i>vanB</i> ; <i>vanB1</i> , <i>B2</i> , <i>B3</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	Transférable élevé-variable pour la vancomycine	Inductible	Chromosome
<i>vanC</i> ; <i>vanC1</i> , <i>C2</i> , <i>C3</i> , <i>C4</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E.</i> <i>casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	Sensible à la teicoplanine Transférable Bas pour la vancomycine Sensible à la teicoplanine	Constitutive Inductible	Chromosome —
<i>vanD</i> ; <i>vanD1</i> , <i>D2</i> , <i>D3</i> , <i>D4</i> , <i>D5</i>	<i>E. faecium</i>	Bas à Élevé pour les deux	Constitutive Inductible	Chromosome —
<i>vanE</i>	<i>E. faecalis</i>	Bas à modéré pour la vancomycine Sensible à la teicoplanine	Inductible	Chromosome —
<i>vanG</i> ; <i>vanG1</i> , <i>G2</i>	<i>E. faecalis</i>	Bas pour la vancomycine	Inductible	Chromosome
<i>vanL</i>	<i>E. faecalis</i>	Sensible à la teicoplanine Bas pour la vancomycine Sensible à la teicoplanine	Transférable Inductible	Chromosome —
<i>vanM</i>	<i>E. faecium</i>	Élevé pour les deux	Inductible	Unknown Transférable
<i>vanN</i>	<i>E. faecium</i>	Bas pour la vancomycine Sensible à la teicoplanine	Constitutive	Plasmide Transférable

2.2.3. Résistance à la daptomycine

La daptomycine est un antibiotique lipopeptidique avec une puissante activité bactéricide contre les bactéries à Gram-positif. Deux mécanismes principaux ont été postulés pour médier la résistance à la daptomycine chez les entérocoques. Le premier, caractérisé chez *Enterococcus faecalis*, est le détournement de l'antibiotique du septum (**Figure 7**) par redistribution des microdomaines de cardiolipine loin du plan de division au niveau du septum. Le deuxième mécanisme, observé chez *E. faecium*, est la répulsion électrostatique du complexe daptomycine / calcium chargé positivement de la membrane cellulaire. Plusieurs gènes peuvent être impliqués dans ce mécanisme (Miller *et al.*, 2014).

Parce que son mécanisme d'action est distinct de celui des autres antibiotiques, la daptomycine est utile pour le traitement des infections causées par des souches Gram-positives multirésistantes. Une résistance à la daptomycine a été observée dans des isolats cliniques d'entérocoques après un traitement à la daptomycine, généralement à la suite de mutations dans les gènes chromosomiques (Galimand *et al.*, 2011).

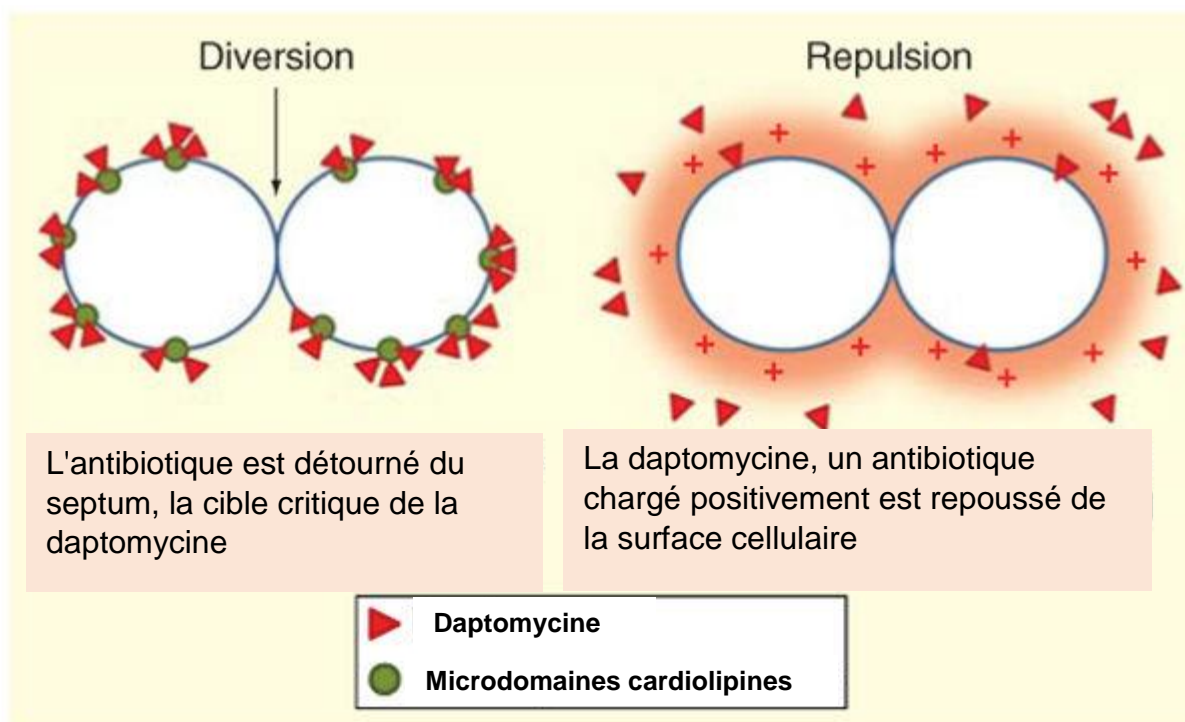


Figure 7. Mécanismes de résistance à la daptomycine chez les entérocoques (Miller *et al.*, 2014).

2.2.4. Résistance aux macrolides et aux lincosamides

Les macrolides sont utilisés dans le traitement des infections humaines, l'érythromycine étant l'antibiotique de premier choix chez les patients allergiques aux pénicillines (**Jensen et al., 1999**).

La résistance aux macrolides est basée sur différents mécanismes :

- Modification de la cible par des mutations précises.
- Modification de la cible par méthylation de la sous-unité 23S de l'ARNr, de sorte qu'elle empêche la liaison des macrolides (c'est-à-dire des gènes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR*).
- Hydrolyse du cycle lactone de la molécule d'antibiotique.
- Pompes à efflux, qui éliminent les molécules d'antibiotiques de l'intérieur de la cellule bactérienne (c'est-à-dire les gènes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrC*, *mreA*).

Les déterminants de la résistance aux macrolides les plus fréquents sont les gènes *erm*. Ceux-ci codent pour une méthyltransférase qui agit sur des résidus de la sous-unité 23S d'ARNr. Cette enzyme provoque une N6-diméthylation d'un résidu adénine dans la sous-unité 23S ARNr, inhibant de cette manière la liaison de l'érythromycine (**Pechère, 2001**).

La modification de la cible ribosomale provoque une résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramine B (MLSB), aux macrolides et lincosamides (MKS), ou aux macrolides, cétolides et streptogramine A et B (MKS). Plusieurs gènes *erm* ont été décrits, *erm (B)* étant le prédominant chez les entérocoques (**Jaglic et al., 2012**).

2.2.5. Résistance à la tétracycline

Chez les entérocoques, la résistance à la tétracycline est généralement associée à la présence du gène *tet(M)* qui confère une protection ribosomale, mais d'autres gènes apparentés offrant une protection ribosomale ont également été décrits, comme *tet(O)* et *tet(S)* (**Aarestrup et al., 2000**). Dans les isolats cliniques, *tet (M)* est fréquemment associé à des éléments transposables de type Tn916, mais il peut également être trouvé dans les plasmides conjugatifs et sur le chromosome. D'autres gènes de résistance codent pour des protéines qui se lient au ribosome et modifient sa conformation, empêchant la fixation de la tétracycline (**Leclercq, 1997**).

2.2.6. Résistance à la rifampicine

La rifampicine inhibe la croissance bactérienne en se liant à la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (RpoB) et en empêchant l'initiation de la transcription (Wehrli *et al.*, 1968).

La plupart des résistances à la rifampicine résultent de mutations de sites spécifiques dans le gène codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase, ce qui réduit l'affinité de la rifampicine pour la polymérase. Des mutations du *RpoB* responsables de la résistance à la rifampicine ont été identifiées chez de nombreuses et diverses espèces de bactéries. Des études suggèrent que la résistance à la rifampicine découle de l'exposition du commensal microbiote à cet antibiotique pendant le traitement d'autres infections bactériennes (Kristich *et al.*, 2014).

2.2.7. Résistance aux quinolones

Les quinolones ne présentent généralement qu'une activité modérée contre les entérocoques. Les quinolones inhibent la croissance des bactéries en interférant avec la réplication de l'ADN, en particulier en se liant aux topoisomérases de type II qui contrôlent le surenroulement de l'ADN (ADN gyrase et ADN topoisomérase IV) et en inhibant leur fonction, conduisant à des ruptures mortelles du double brin de l'ADN. La résistance à la quinolone chez de nombreuses espèces de bactéries se produit via des mutations dans les « régions déterminant la résistance aux quinolones » des gènes codant pour la gyrase et la topoisomérase IV. Ces mutations empêchent une liaison efficace de l'antibiotique à l'enzyme, ce qui permet à la réplication de l'ADN de se poursuivre malgré la présence de l'antibiotique (Kristich *et al.*, 2014).

De telles mutations ont été observées chez des isolats cliniques d'*E. faecium* et *E. faecalis* résistants aux quinolones (Werner *et al.*, 2009), mais sont absentes chez *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (López *et al.*, 2011).

L'externalisation de l'antibiotique par des pompes d'efflux est un autre mécanisme bien décrit de la résistance aux quinolones. Parmi eux, *NorA* et *PmrA* ont été impliqués dans la résistance aux quinolones et ont été décrits chez *E. faecium* (Hawkey, 2003).

Un troisième mécanisme de résistance, trouvé chez *E. faecalis* est médié par le gène *qnr* et code pour une protéine avec une série de répétitions pentapeptidiques (Arsène et Laclercq, 2007).

La présence de cette protéine est susceptible de protéger l'ADN gyrase en diminuant la liaison à l'ADN de la quinolone et la formation ultérieure du complexe quinolone-gyrase (tran *et al.*, 2005).

2.2.8. Résistance aux oxazolidines

L'antibiotique représentatif dans ce groupe est le linézolide, qui montre une activité antimicrobienne élevée contre les bactéries à Gram positif (**Diekema, 2001**).

Des mutations dans la sous-unité ribosomale 23S confèrent une résistance à cet antibiotique. Les niveaux de résistance dépendent du nombre d'allèles pour les gènes d'ARNr mutés. Les souches résistantes au linézolide peuvent également présenter une co-résistance à d'autres antibiotiques tels que la vancomycine, l'ampicilline, les macrolides, les fluoroquinolones, le chloramphénicol, la rifampicine, la gentamicine, la nitrofurantoïne et l'association triméthoprim / sulfométhoxazol (**Jones *et al.*, 2002**).

CHAPITRE 3 : PROGRAMME DE SURVEILLANCE DES ENTEROCOQUES

1. Traitement actuel des infections à Entérocoques

L'IDSA (Infectious Disease Society of America) a inclu *E. faecium* parmi les pathogènes ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*) pour lesquels de nouvelles thérapies sont nécessaires de toute urgence [(Rice *et al.*, 2004) ; (Arias et Murray, 2012)].

La Sélection optimale d'antibiotiques pour les infections à entérocoques multirésistants nécessite une réflexion approfondie sur l'efficacité clinique, la sécurité et les principes pharmacodynamique/pharmacocinétique. Il existe un consensus général selon lequel une bithérapie est préférée pour l'endocardite compliquée à *E. faecalis*, tandis que la monothérapie sur des durées plus courtes est généralement adéquate pour d'autres infections (Mercuro *et al.*, 2018). Bien que le linézolide soit le seul médicament approuvé par la «Food and Drug Administration (FDA)» pour l'infection à ERV, ses premières études étaient basées sur des données limitées lorsque peu d'options de traitement étaient disponibles. Le linézolide est bactériostatique et les échecs de traitement ont été décrits dans les infections endovasculaires (Mercuro *et al.*, 2018).

Des études récentes suggèrent que la daptomycine devrait être utilisée comme traitement de première ligne contre les souches d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine provoquant des infections sévères. Cet agent antimicrobien doit être utilisé à doses élevées (10 à 12 mg / kg), quel que soit le niveau de CMI dans la plage de sensibilité (<4 µg / mL). Néanmoins, en cas de maladie affectant les patients gravement malades ou immunodéprimés (p. ex. neutropénie), une association avec des β-lactamines (ampicilline) doit être envisagée comme thérapie définitive (Contreras *et al.*, 2019).

Les nouveaux agents antibactériens doivent cibler les protéines capteurs et responsables d'une voie de réponse au stress, et être capables de désactiver le réseau de défense d'un microbe résistant, le laissant vulnérable à une thérapie vieille de plusieurs décennies. De plus, les anticorps monoclonaux, qui ont été utilisés avec succès dans le cancer et les maladies auto-immunes, peuvent être conçus pour cibler spécifiquement les voies de transduction du signal entérococcique, rendant l'expression des gènes de résistance silencieuse pendant que l'antibiotique pénètre (Miller *et al.*, 2014).

La médecine génomique offre la promesse de traitements ciblés individuellement pour chaque patient. Il n'y a aucune bonne raison de penser que le traitement antimicrobien devrait être différent (Miller *et al.*, 2014).

2. Recommandations et mesures de prévention des infections à entérocoques

Une attention particulière est requise pour réduire la propagation des entérocoques par criblage du portage des *Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine (ERVfm), cela nécessite beaucoup d'efforts de la part des microbiologistes et des spécialistes du contrôle de l'infection.

D'autres mesures importantes doivent être prises en compte :

- Le rôle de la contamination par l'environnement hospitalier.
- Le développement de meilleurs milieux sélectifs, une PCR avec plus de spécificité ou des tests rapides pour détecter l'ERVfm plus efficacement.
- L'utilisation de PCR spécifiques aux clones, ce qui pourrait être utile pour détecter et contrôler les épidémies à ERVfm causées par des clones. Cette méthode combine la saisie et la détection d'une manière rapide et rentable.
- Développement de cibles antimicrobiennes nécessaires pour le traitement des *E. faecium* multirésistants (MDR).
- Le développement de nouveaux antibiotiques coûte cher, nécessite du temps et présente un risque de développement rapide de résistance à ces nouveaux médicaments. Par conséquent, il est important d'utiliser les antibiotiques actuellement disponibles avec prudence et optimiser le respect des précautions d'hygiène pour éviter la propagation des ERVfm résistants de patient à patient.
- Il peut être judicieux de réduire la propagation de l'ERVfm par surveillance dans les populations à haut risque.
- Des programmes de construction et de soutien financier structurel pour les hôpitaux seraient nécessaires pour mettre en œuvre le dépistage nosocomial du portage des ERVfm et des mesures ultérieures de contrôle des infections.
- Les Collaborations transfrontalières peuvent s'avérer utiles dans la mise en œuvre de tels programmes de surveillance (Zhou *et al.*, 2020).

***MATERIEL ET
METHODES***

MATERIEL ET METHODES

1. Prélèvements

Sur une période de 24 mois allant de Avril 2016 à Mars 2018, des prélèvements ont été effectués sur des patients hospitalisés dans différents services du CHU de Tlemcen et ayant séjourné pendant au moins 48 heures (**Tableau 5**), ces derniers ont été collectées soit par la technique d'écouvillonnage (**Jomha et al., 2014**) sur des plaies infectées ou par collecte des urines, de liquide de dialyse, d'hémoculture et des cathéters. Tous les prélèvements ont été acheminés au laboratoire (LAMAABE) pour être tout de suite analysés.

Les patients dont les signes cliniques n'évoquent pas une infection et ceux qui se sont présentés pour une consultation externe ont été exclus de l'étude.

Tableau 5. Origine des prélèvements effectués dans chaque service

Service	Origine
Pédiatrie	Cathéters, plaies infectées
Chirurgie A + B	Cathéters, plaies infectées, hémoculture
Néphrologie	Liquide de dialyse
Maternité	Plaies infectées, urine, cathéters, hémoculture
Urologie	Urines, hémoculture

2. Isolement et purification

Dans cette étude, seuls les entérocoques ont été recherchés. Dans cette perspective, tous les prélèvements ont été cultivés sur un milieu sélectif à la bile esculine azide (BEA), et incubés à 37°C pendant 24 à 48h.

L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif, la bile de bœuf quant à elle, empêche la croissance des bactéries à Gram positif, ainsi les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculétine.

Les colonies ainsi obtenues ont été ré-isolées sur bouillon cœur cerveau hyper salé (6.5% NaCl) et incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Les entérocoques donnent un trouble du bouillon BHIB ainsi qu'un précipité au fond du tube (aspect mie de pain).

La purification des souches a été obtenue par repiquage successif sur bouillon BHIB hyper salé puis sur gélose BEA (Bile Esculine Azide) (Brossard *et al.*, 2002).

La Figure 8 représente les étapes suivies pour l'isolement du genre *Enterococcus*

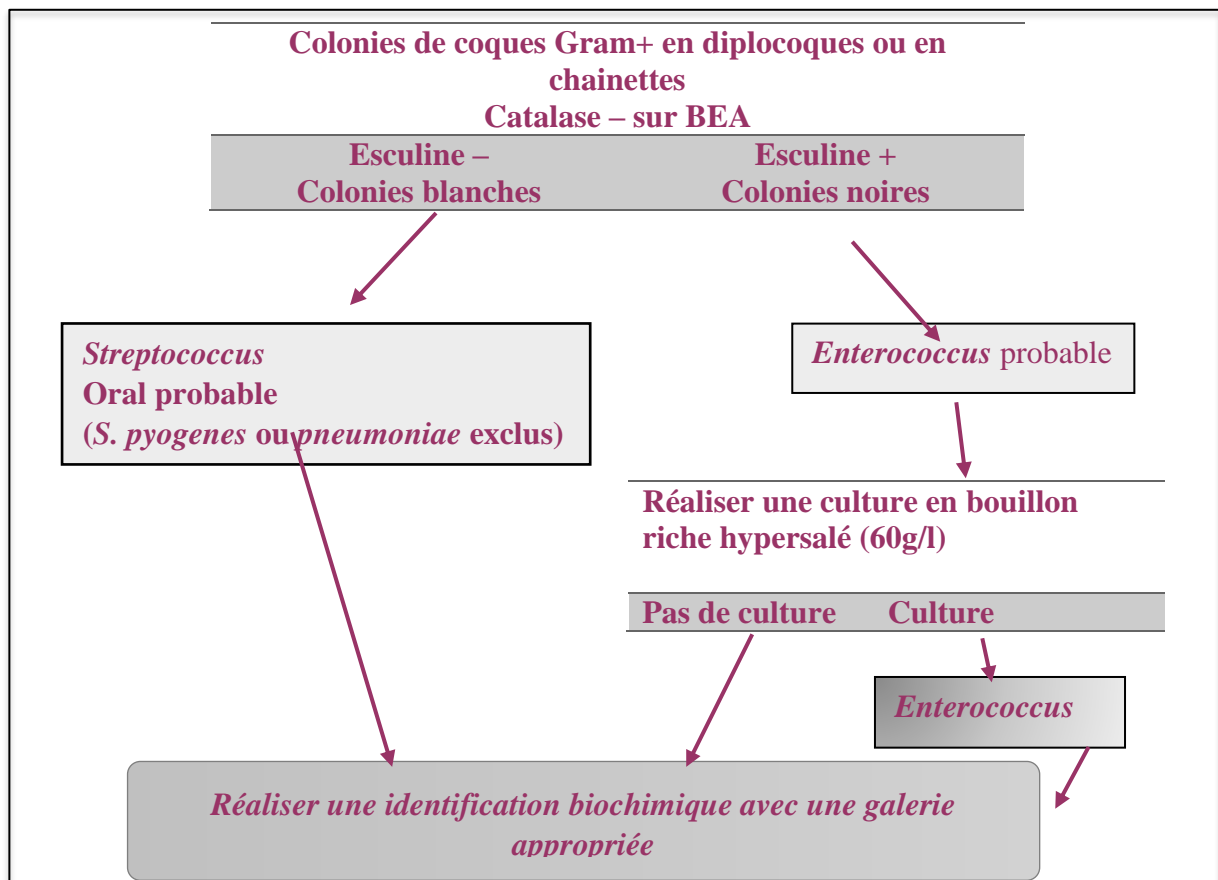


Figure 8. Schéma illustratif pour l'identification présumptive des Entérocoques d'intérêt clinique (Leyral et Joffin, 1998)

3. Identification

3.1. Identification biochimique

L'identification des isolats après le contrôle de la pureté a été basée sur les caractères phénotypiques macroscopiques et microscopiques (coloration de Gram).

Toutes les souches ont été identifiées grâce aux méthodes bactériologiques classiques (hydrolyse de l'esculine, absence de la catalase, hémolyse), et par les caractères biochimiques à l'aide des galeries *API 20 Strep* (Bio Mérieux).

3.1.1. Recherche de la catalase

Le test de la catalase est fondamental pour orienter l'identification des coques à gram positif. Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries.

Ce test est réalisé en prélevant une quantité suffisante de culture et en la mettant au contact d'eau oxygénée, une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat d'oxygène sous forme de bulles de gaz (Joffin et Leyral, 2001).

3.1.2. Activité hémolytique

L'activité de l'hémolysine de chaque souche a été déterminée sur gélose Columbia base au sang (Oxoid, Royaume-Uni) contenant 5% de sang de mouton défibriné. Ce test est très important dans l'identification et la classification des entérocoques, il présente trois types d'hémolyse :

- **Hémolyse α** : résulte d'une hémolyse partielle ou incomplète des hématies autour des colonies qui leur confère une couleur verdâtre.
- **Hémolyse β** : résulte d'une hémolyse complète des hématies qui s'interprète par une zone claire autour des colonies.
- **Hémolyse γ** : absence d'hémolyse

Les entérocoques présentent des zones claires autour des colonies indiquant la production de β -hémolysine (Joffin et Leyral, 2001).

3.1.3. Identification par système API Strep

L'identification a été complétée par les tests biochimiques de la galerie API 20 strep (biomérieux, France) de la souche préalablementensemencée sur une gélose au sang, c'est un système standardisé associant 20 tests biochimiques, des microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation des sucres. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (VP1, VP2, NIN, ZYMA et ZYM B) (Leyral et Joffin, 1998).

L'identification est obtenue à partir du profil numérique grâce au logiciel API.

3.1.4. Identification génotypique des souches d'entérocoques isolées

Cette technique a été réalisée en partenariat avec le laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Géo Ressources (BVBGR) LR11/ES3 à l'Institut Supérieur de Biotechnologie, BiotechPôle (BP-66, 2020) en Tunisie.

Cette technique moléculaire de polymérisation en chaîne (PCR) permet de confirmer l'identification des souches grâce à la recherche du gène '*tuf*', un facteur d'élongation qui joue un rôle important dans la synthèse des protéines (Li *et al.*, 2012).

3.1.4.1. Extraction d'ADN chromosomique

Il est essentiel de purifier l'ADN de l'échantillon d'intérêt de manière à pouvoir l'amplifier et l'analyser efficacement par des méthodes moléculaires. Il existe plusieurs méthodes d'extraction de l'ADN génomique, la technique de 'Boiling' étant la plus simple et son rendement est tout à fait efficace. Elle consiste à faire chauffer l'échantillon à la température d'ébullition, puis le placer dans de la glace, le choc thermique provoque l'éclatement de la cellule bactérienne et la libération de l'ADN.

Un volume de 1,5ml de culture en bouillon est centrifugé et le culot est récupéré puis mis dans 200 µL de tampon de lyse TE (Tris 10mM, EDTA 1mM (pH=8)). Le mélange obtenu est homogénéisé et chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Créer un choc thermique en mettant les tubes dans la glace. L'ADN bactérien total a été obtenu après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 mn et à 4°C. L'ADN ainsi récupéré de la phase aqueuse (surnageant) est conservé au congélateur à -80°C pour des utilisations ultérieures (Cupáková *et al.*, 2005).

3.1.4.2. Recherche du gène *Tuf*

Le gène *tuf* (EF-Tu) est impliqué dans la formation de la chaîne peptidique. Il s'agit d'une partie omniprésente et hautement conservée du génome de base et est plus discriminante que le gène de l'ARNr 16S pour identifier les souches appartenant aux genres *Enterococcus* (Ke *et al.*, 1999).

Les réactions d'amplification des gènes *tuf* (Bio-Life) ont été réalisées avec des couples d'amorces spécifiques illustrés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Amorces utilisées pour la recherche du gène 'Tuf'

Tuf-F	5'- CCAATGCCACAAACTCGT -3'
Tuf-R	5'- CCTGAACCAACAGTACGT -3'

La recherche du gène *tuf* a été réalisée dans un mix total de 50 µl à l'aide d'un appareil *Gene Amp* (*PCR system 9700*), suivie d'une révélation sur gel d'agarose à 2% (TAE 1X+ 7µL de bromure d'Ethidium (10 mg/mL, *Sigma*) pendant 30 min, et une visualisation sous UV.

Afin d'étudier l'ADN extrait et la recherche du gène, celui-ci doit être amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans un mélange réactionnel bien défini (**Tableau 7**). La taille du fragment amplifié par le couple *tuf F-tuf R* est de 803 pb.

Tableau 7. Composition des mélanges réactionnels pour la PCR

Constituants (CC Stock)	CC finale	Volume de la réaction (50 µL)
Tampon PCR 10x	5x	5 µL
MgCl ₂	-	3 µL
dNTP	250 mM	4
Amorce F : <i>tuf F</i>	-	1
Amorce R: <i>tuf R</i>	-	1
Taq polymérase	2.5 U	0.5 µL
ADN	-	5 µL
Qsq H2O vol. final		30.5 µL

Cette technique consiste en une succession de cycles thermiques, une dénaturation de 10 min à 94 °C et 30 cycles d'amplification constitués de 30 sec à 94 °C, 1 min à 51 °C et 1 min 30 sec à 72 °C, et enfin 10 min à 72 °C pour l'extension finale.

Les produits d'amplifications ont été séparés sur gel d'agarose à 2%.

Le marqueur de taille moléculaire 100pb /1kb a été placé à l'extrémité du gel afin de pouvoir analyser la taille des fragments obtenus. Ceux-la sont ensuite déterminés par le système d'imagerie en comparaison avec les contrôles positifs et en se référant aux marqueurs de tailles.

3.1.4.3. Séquençage du gène « *tuf* »

La succession des bases de données nucléotidiques a été analysée et comparée aux séquences disponibles sur la base de données d'informations GenBank au National Center for Biotechnology (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant le programme BLAST (**Altschul et al., 1990**).

4. Détermination phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérocoques isolées

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (2018). Un contrôle de qualité a été réalisé au préalable de chaque antibiogramme en utilisant deux souches de référence : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Dix-huit molécules d'antibiotiques sous forme de disques ont été testées: Vancomycine (30 µg), Teicoplanine (30 µg), Imipénème (10 µg), Ampicilline (10 µg), Amoxicilline (30 µg), Céfalexine (30 µg), Céfoxitine (30 µg), Gentamicine (10 µg), Tobramycine (10 µg), Amikacine (30 µg), Néomycine (30 µg), Ofloxacine (5 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Rifampicine (5 µg), Erythromycine (15 µg), Tétracycline (30 µg), Clindamycine (2 µg), Fosfomycine (5 µg).

Des disques imprégnés d'antibiotiques (Biomérieux, France) ont été déposés à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec une dilution calibrée (0.5 Mc Farland) de la souche à tester selon les recommandations du CASFM (2018).

Les diamètres de chaque zone d'inhibition ont été mesurés avec précision en mm, et chaque bactérie a été classée dans l'une des catégories : **sensible**, **intermédiaire** ou **résistante** (annexe I).

5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur microplaque

Des microplaques à 96 puits et à fond en U (plaque de microtitration) ont été utilisées pour la détermination des CMI vis à vis d'un même antibiotique allant de 0.5 à 512 µg/mL.

L'inoculum bactérien de densité 0.5 Mc Farland a été distribué dans une série de cupules d'une même ligne contenant les dilutions croissantes de l'antibiotique à l'aide de micropipette. Le tout est incubé 24h à une température de 37°C. la CMI de chaque antibiotique correspond à la première cupule 'claire' (pas de culture par rapport au témoin sans antibiotique). Celle-ci est comparée aux CMI critiques correspondantes à chaque antibiotique testé.

La CMI des huit antibiotiques suivants a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon MH selon les recommandations du CASFM (2018) : Ampicilline, Amoxicilline/Acide clavulanique, Imipénème, Gentamicine, Amikacine, Ciprofloxacine, Vancomycine et Teicoplanine.

6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des glycopeptides par E-test

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison de deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bandelette en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient préétabli de concentrations d'antibiotique, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en $\mu\text{g/mL}$ d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une gamme de concentrations allant de 0,016 à 256 $\mu\text{g/mL}$ ou 0,002 à 32 $\mu\text{g/mL}$ selon l'antibiotique.

La CMI des deux glycopeptides testés à savoir la Vancomycine et la Teicoplanine a été confirmée grâce aux bandelettes E-test (Biomérieux, France) sur milieu solide selon les recommandations du **CASFM (2018)**.

Les mêmes étapes que la réalisation d'un antibiogramme ont été suivies.

L'antibiotique diffuse en formant un gradient important : la zone d'inhibition a la forme d'une ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette, là où celle-ci rencontre la zone d'inhibition (**Joffin et Leyral, 2001**).

7. Analyse statistique

L'analyse statistique des fréquences d'isolement des deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium* ainsi que les pourcentages de résistance des deux espèces a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS (IBM SPSS statistics 20). Une probabilité inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) a été considérée comme statistiquement significative.

8. Recherche et amplification des gènes de résistance à la vancomycine par PCR

Les réactions de PCR ont été effectuées au vue de détecter les gènes codant pour la résistance à la vancomycine. L'extraction a été réalisée au laboratoire LAMAABE, puis les extraits ont été envoyés en Espagne au laboratoire de microbiologie, Université de Jaèn ; et au laboratoire Genoscreen (Lille, France) pour confirmation.

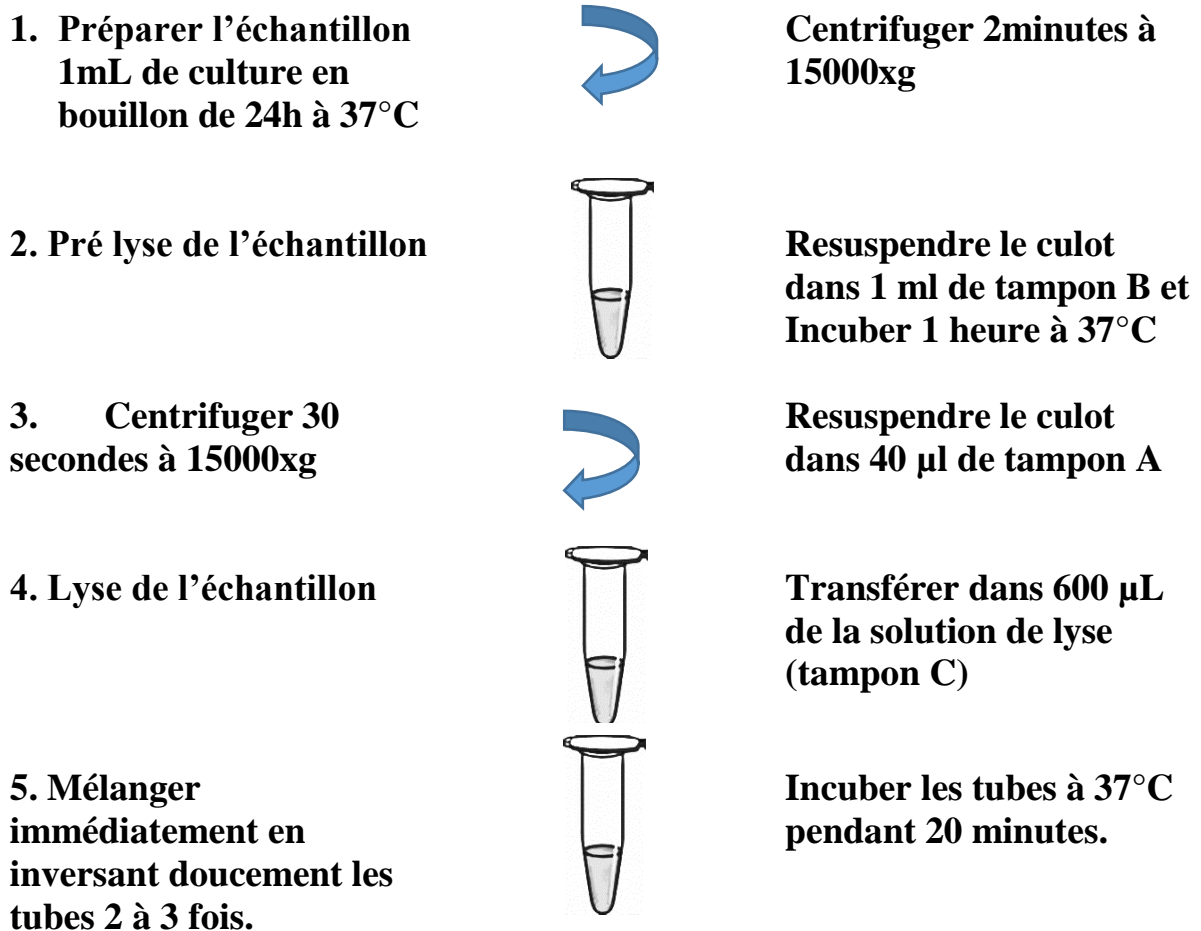
8.1. Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN de bactéries présentant une résistance phénotypique à la vancomycine et à la teicoplanine par la technique de diffusion des disques, et confirmée par E-test a été extrait en utilisant deux techniques différentes.

8.1.1. Extraction par la technique de (Courvalin et al., 1985)

La préparation des tampons est décrite dans (Annexe II).

L'extraction de l'ADN a été réalisée en plusieurs étapes selon la (Figure 9).



6. Neutralisation



Ajouter 30 μ l de tampon
D. Mélanger puis
Ajouter 160 μ L de
tampon E

**7. Incuber les tubes dans
de la glace pendant une
heure**



Centrifuger 5 minutes à
vitesse maximale

**1. Décanter le surnageant
(500 à 600 μ l) dans un
autre tube à Eppendorf**



Ajouter 550 μ l
d'isopropanol
prérefroidi à -20°C et
Incuber 30 min à -20°C

**9. Centrifuger 3 min à
vitesse maximale**



Décanter en inversant les
tubes

10. Récupérer l'ADN pur



Reprendre les culots
dans 40 μ l de tampon A.
Conserver à -20°C .

**Figure 9. Protocole pour l'extraction et la purification d'ADN plasmidique
selon Courvalin *et al.*, (1985)**

8.1.2. Extraction Avec le Kit Nucleospin Tissue

La Composition du kit « Nucleospin Tissue » de Macherey Nagel et la préparation des tampons sont décrites en (**Annexe II**) selon les instructions du fournisseur.

L'échantillon a été préparé selon le protocole décrit dans la **Figure 10**.

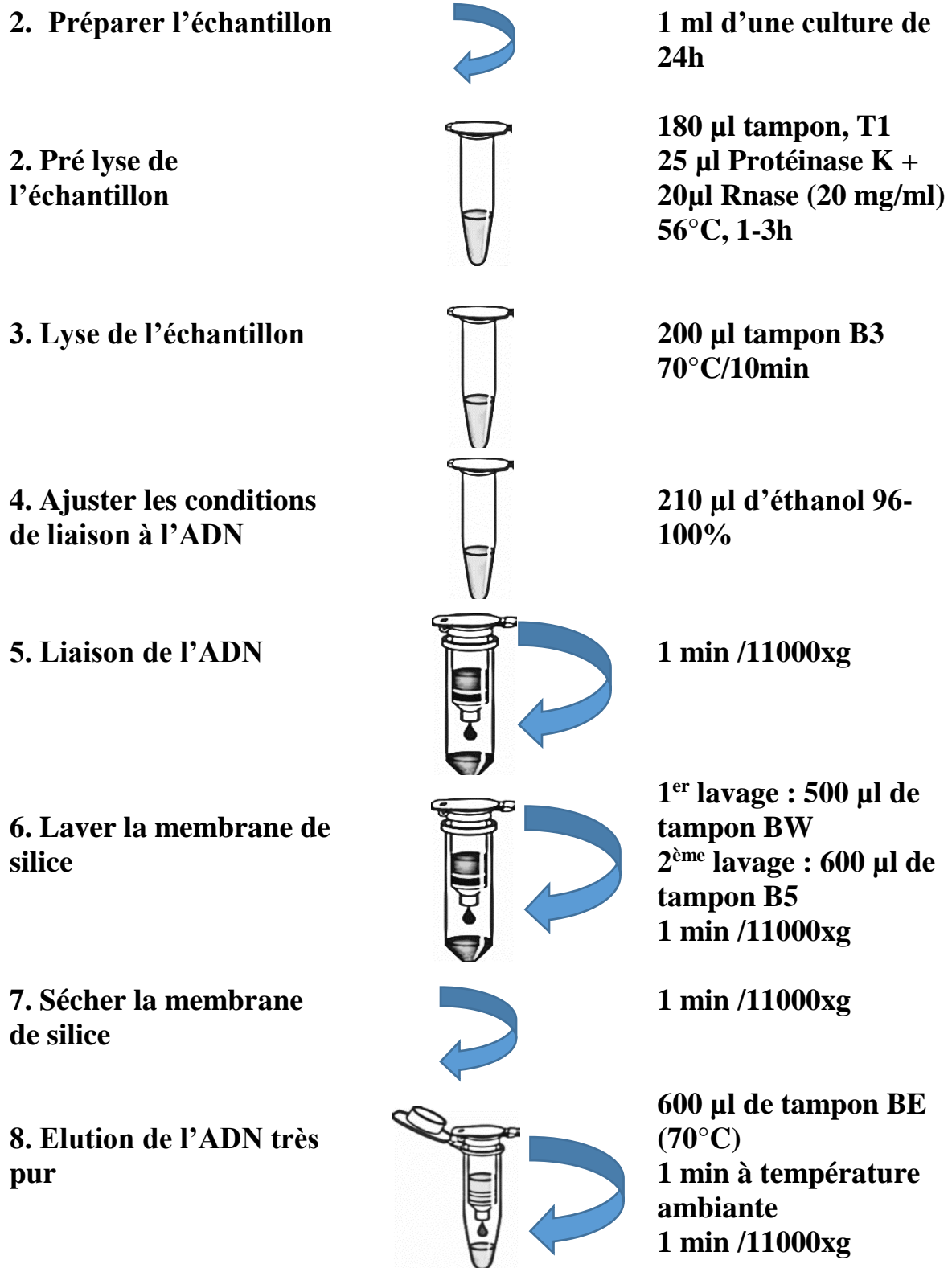


Figure 10. Protocole pour l'extraction et la purification d'ADN génomique NucleoSpin Tissue (Macherey-Nigel)

8.2. Recherche des gènes de résistance aux glycopeptides : gène *VanA* et *VanB*

Pour la recherche des gènes de résistance à la vancomycine, deux couples d'amorces ont été utilisés (Tableau 8) : *vanA* et *vanB*,

Tableau 8. Propriétés des couples d'amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance à la vancomycine

Amorce	Séquence	Gène	Taille (pb)
EA1s	GGGAAAACGACAATTGC	<i>vanA</i>	732
EA2as	GTACAATGCGGCCGTTA	<i>vanA</i>	
EB3s	ACGGAATGGGAAGCCGA	<i>vanB</i>	647
EB4as	TGCACCCGATTTTCGTTC	<i>vanB</i>	

8.2.1. Amplification des gènes *vanA* chez les souches témoins

Deux souches d'*Enterococcus faecium* *VanA* et *VanB* fournies par le laboratoire d'immunogénétique moléculaire (Université Montpellier 2), ont été utilisées pour le contrôle et la recherche du gène Van. La préparation du mix pour les deux souches est décrite dans le (Tableau 9).

Tableau 9 : Préparation du mix pour l'amplification des deux souches contrôle

Produit	Volume pour un tube (µL)	Mix pour 3 tubes (µL)
TP 10X taq	5	15
dNTP	6	18
MgCl ₂	3	9
Amorce EA1s	2,5	7,5
Amorce EA2as	2,5	7,5
Taq polymérase	0,5	1,5
EQ	28,5	85,5
Volume total	48	144

A partir du mélange mix, 48 μL sont réparties dans chaque tube, auquel 2 μL de chaque extrait génomique est ajoutée dans chacun des 2 tubes. Mettre dans l'appareil PCR (la taille du fragment amplifié par le couple EA1s-EA2as doit être de **732 pb**). Enfin, réaliser 35 cycles PCR.

Les amorces utilisées pour la détection du gène *vanB* sont EB3s et EB4as, et le même protocole que celui du *VanA* a été suivi. La taille du fragment amplifié par le couple EB3s-EB4as doit être de **647 pb**.

8.2.2. Recherche des gènes *vanA* chez les souches *d'Enterococcus faecium*

La détection du gène *vanA* été réalisée par PCR chez les souches *d'Enterococcus*. A cet effet, un mix a été préparé selon le nombre de souches testées (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Préparation du mix pour les souches *d'Enterococcus faecium*

Réactifs	Volume pour un tube (μL)	Concentration finale
TP10X	2,5	1X
dNTP	3	0,4mM
MgCl ₂	1,5	25mM
Amorce EA1s	1,25	0,5mM
Amorce EA2as	1,25	0,5mM
<i>Taq polymérase</i>	0,25	1,25 U
EQ	14,25	-
ADN	1	-

A partir du mélange mix, répartir dans chaque tube 25 μL , puis ajouter 1 μL de chaque extrait génomique dans chaque tube. Mettre dans l'appareil thermocycleur (Bio-Rad) selon le programme représenté dans la **Figure 11**. La taille du fragment amplifié par le couple EA1s-EA2as est **732 pb**.

8.4. Recherche des gènes *VanA* et *VanB* par le laboratoire Genoscreen (Lille-France) (compte rendu en annexe III)

8.4.1. Extraction des ADN

Les échantillons 1 et 2 ont été extraits avec le kit « Nucleospin Tissue » de chez Macherey Nagel (Protocole déjà décrit).

8.4.2. Conditions PCR

Les conditions PCR ainsi que la séquence des amorces et la composition des mix PCR ont été comme suit (Tableau 11).

Tableau 11. Conditions PCR suivies par le laboratoire Genoscreen (Lille)

	Concentration finale
Tampon	1X
dNTP	0,24mM
MgCl ₂	1,5mM
Primer F	10pmol
Primer R	10pmol
H ₂ O	
Taq polymerase	1U
ADN	5ng

Les amorces utilisées sont :

VanA Forward : GGGAAAACGACAATTGC

Reverse : GTACAATGCGGCCGTTA

VanB Forward : ACGGAATGGGAAGCCGA

Reverse : TGCACCCGATTTTCGTTTC

Programme bloc PCR:

94°C 3mins

94°C 1min

54°C 1min

72°C 1min

72°C 7mins

4°C

} 35 Cycles

9. Séquençage des gènes *Van*

Le séquençage de l'ADN a été réalisé par le laboratoire Genoscreen (Lille, France) en utilisant la méthode de séquençage Sanger (ABI3730), le protocole de réaction de séquence était le terminateur Big Dye V3.1. La succession des bases nucléotidiques a été analysée à l'aide de la base de données disponible sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

***RESULTATS ET
DISCUSSION***

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Epidémiologie

La présente contribution est une étude prospective qui a été menée sur une période de deux années (avril 2016-mars 2018), au niveau de différents services du Centre Hospitalier Universitaire de Tlemcen (Algérie). 270 prélèvements ont été effectués, ceux-ci ont concerné des patients hospitalisés depuis au moins 48h et admis dans les services suivants (service de chirurgie A et B, service de Pédiatrie, Urologie, Néphrologie et le service de Maternité).

Tableau 12 : Nombre de prélèvements effectués dans chaque service

Service	Nombre de prélèvements
Pédiatrie	58
Chirurgie A + B	96
Néphrologie	13
Maternité	28
Urologie	75

L'ensemble des patients étaient principalement des adultes (84%) et (16%) des enfants ; le nombre de femmes (137, (60%) était supérieur à celui des hommes (90, (40%) ; le groupe d'âge des adultes se situait entre 17 et 80 ans pour les hommes avec une moyenne d'âge de 46,3 ans, et entre 15 et 74 ans pour les femmes (moyenne d'âge 48,6 ans). Les enfants du service de pédiatrie étaient âgés de 4 jours à 13 ans.

La majorité des patients suivaient une antibiothérapie, en particulier des bêta-lactamines et des aminosides avant ou pendant le prélèvement d'échantillons (urine, cathéter, sang, plaie ou liquide de dialyse).

Sur les 270 prélèvements effectués, quatre-vingt-seize (96) ont été réalisés dans les services de chirurgie A et B et ont concerné des patients ayant subi une intervention chirurgicale et présentant des signes cliniques d'une infection (fièvre, plaies infectées, douleur à la palpation, rougeur, et écoulement anormal). Dix-neuf pour cent (19%) d'entre eux avaient moins de 40 ans (**Figure 12**) et 45% étaient âgés de plus de 60 ans ; le sexe homme étant dominant. Effectivement, le risque d'infection nosocomiale s'accroîtrait avec l'âge, les raisons et les facteurs sont complexes et probablement multifactorielles, et peuvent être dominés par une perte d'autonomie, suivie de la poly médication et des poly pathologies [(**Simon et al., 2002**) ; (**Raschilas et al., 2006**) ; (**Boushab et al., 2019**)].

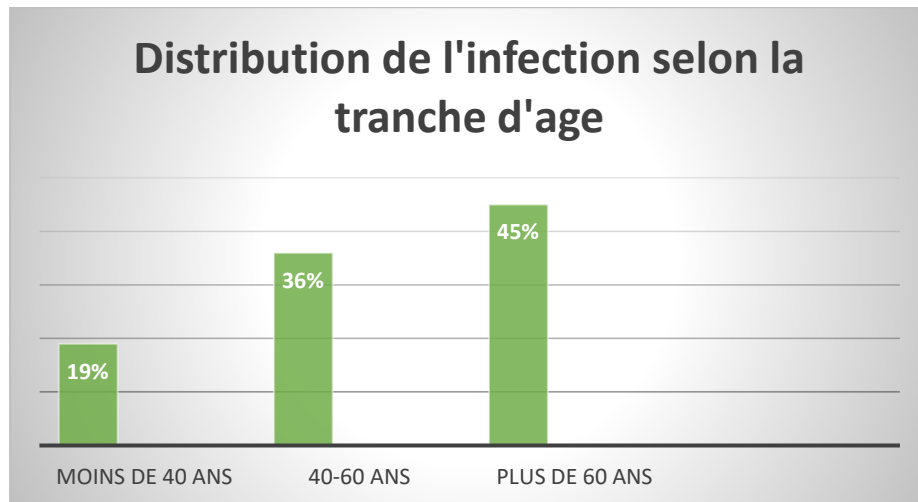


Figure 12. Distribution de l'infection selon la tranche d'âge chez les patients hospitalisés en service de chirurgie – CHU TLEMCEM

La durée d'hospitalisation chez tous les patients était supérieure à 4 jours pouvant aller jusqu'à 12 jours. Le premier facteur de risque d'infection est la durée du séjour préopératoire. Ainsi, on assiste à une augmentation du taux d'infection pariétale en chirurgie propre allant de 1% en cas de séjour préopératoire inférieur à 1 jour, et à 4% en cas de séjour préopératoire supérieur à 14 jours (Migaud *et al.*, 2005).

Des conditions médicales chroniques sous-jacentes ont été signalées pour 73 patients (32,1 %). Les maladies cardiovasculaires étaient la comorbidité la plus fréquemment identifiée chez (26 %) de nos participants, suivies par l'hypertension artérielle (21%) et le diabète sucré (14 %). D'autres patients ont été diagnostiqués et hospitalisés pour différentes formes de cancer (7 %).

Les prélèvements effectués dans le service de pédiatrie ont concerné Cinquante-huit enfants (58) avec un âge allant de 4 jours à 13 ans. Les nouveau-nés étaient souvent prématurés (moins de 37 semaines) et de faible poids de naissance, ce qui peut être considéré comme un facteur de risque d'infection néonatale. Rameshwarnath et Naidoo en (2018), estiment que l'augmentation de l'infection nosocomiale chez les nouveau-nés de faible poids à la naissance et l'âge gestationnel inférieur à 36 semaines, la prématurité et les thérapies multiples sont des facteurs de risque importants chez les nouveau-nés car ils sont immunodéprimés. La détresse respiratoire et l'asphyxie à la naissance ont été identifiées comme facteurs de risque significatif associés à une infection nosocomiale.

Les prélèvements réalisés dans le service de maternité ont concerné (28) femmes d'âge fluctuant entre 20 et 60 ans, qui étaient soit césarisées ou opérées pour une ablation mammaire ou utérine, toutes ont présenté une surinfection de la plaie. L'hygiène des mains et le non-respect de l'utilisation des gants représentent des facteurs de risque importants de non-conformité, contribuant à la complication de beaucoup de cas dans le service qui recrute un nombre considérable de patientes chaque jour (**Ji et al., 2005**).

75 prélèvements effectués chez les patients du service d'urologie provenaient des urines de patients présentant une infection urinaire confirmée par les cliniciens. Les femmes étaient doublement infectées (66.66%) par rapport aux patients homme (33.33%) (**Figure 13**). Avec une moyenne d'âge de 59 ans et une durée d'hospitalisation qui s'étalait de 5 à 20 jours chez tous les patients, le prolongement de la durée d'hospitalisation expose les patients à un risque plus important d'infection (**Eliakim-Raz et al., 2019**).

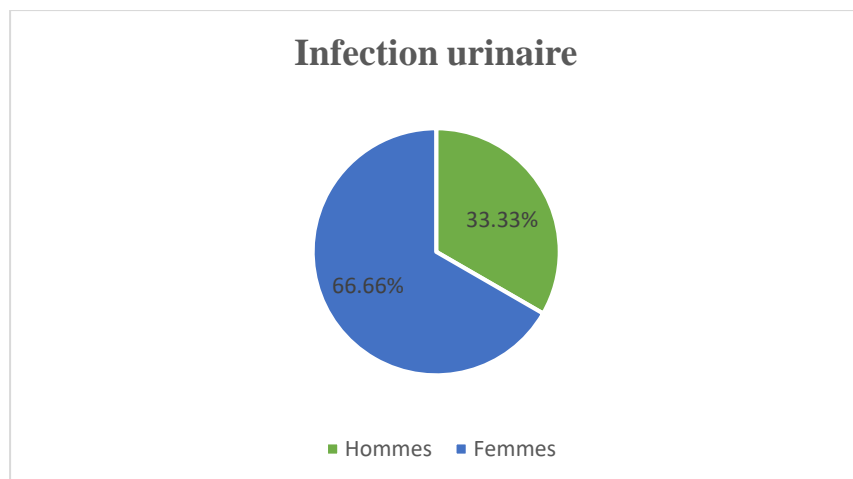


Figure 13. Répartition des infections urinaires chez les patients hospitalisés plus de 48H dans le service d'urologie– CHU TLEMEN

Selon une étude réalisée par **Bischoff et al., en (2018)**, le facteur de risque majeur en relation avec une infection urinaire est le sexe. Ainsi, les patients de sexe masculin sont susceptibles de développer une infection urinaire, en plus de ces facteurs :

- La résidence en maison de retraite,
- Une hospitalisation préalable dans les 30 jours,
- L'utilisation d'antibiotiques 30 jours avant l'admission,
- La sonde urinaire,
- Une infection urinaire récente ou récurrente,

Le facteur de risque d'infection urinaire chez les femmes est la ménopause, ajouté à quelques caractères importants (**Medina et Castillo-Pino, 2019**), soit :

- Leur état de santé,
- Leur statut résidentiel (institutionnalisée ou non),
- L'âge,
- La présence de diabète sucré,
- Les antécédents de cathétérisme,
- Un dysfonctionnement de la moelle épinière et,
- L'utilisation d'antibiotiques.

L'échec thérapeutique lors d'un traitement d'une infection urinaire survient généralement chez le sujet âgé hospitalisé, et conduit à un séjour prolongé de plus de 30 jours, associé à d'autres facteurs comme : un cancer métastatique, une ventilation mécanique, un poids élevé, une corticothérapie, causant souvent un taux de mortalité de 9% (**Eliakim-Raz et al., 2019**).

2. Identification

Sur les 270 prélèvements à visée diagnostique, 111 souches ont été identifiées et se sont avérées des cocci à Gram positif, aéro-anaérobies facultatives avec tolérance au NaCl, ne possédant pas une catalase, et ayant ou pas une hémolyse β , donnant des petites colonies sur le milieu bile esculine entourées d'un halo produisant un noircissement du milieu dû à l'assimilation de l'esculine qui donne de l'esculétine + fer ; permettant de les assigner au genre *Enterococcus*.

Cette identification a été complétée par le système Api Strep, qui a révélé quatre biotypes différents, soit : 59 souches (53%) d'*E. faecalis* au biotype 5143711, 47 souches (42%) d'*E. faecium* au biotype 5157510 suivis de 2 espèces d'*E. durans* 7156311 et 2 espèces d'*E. avium* 7371016 avec des taux respectifs de et 6%. 8% (**Figure 14**).

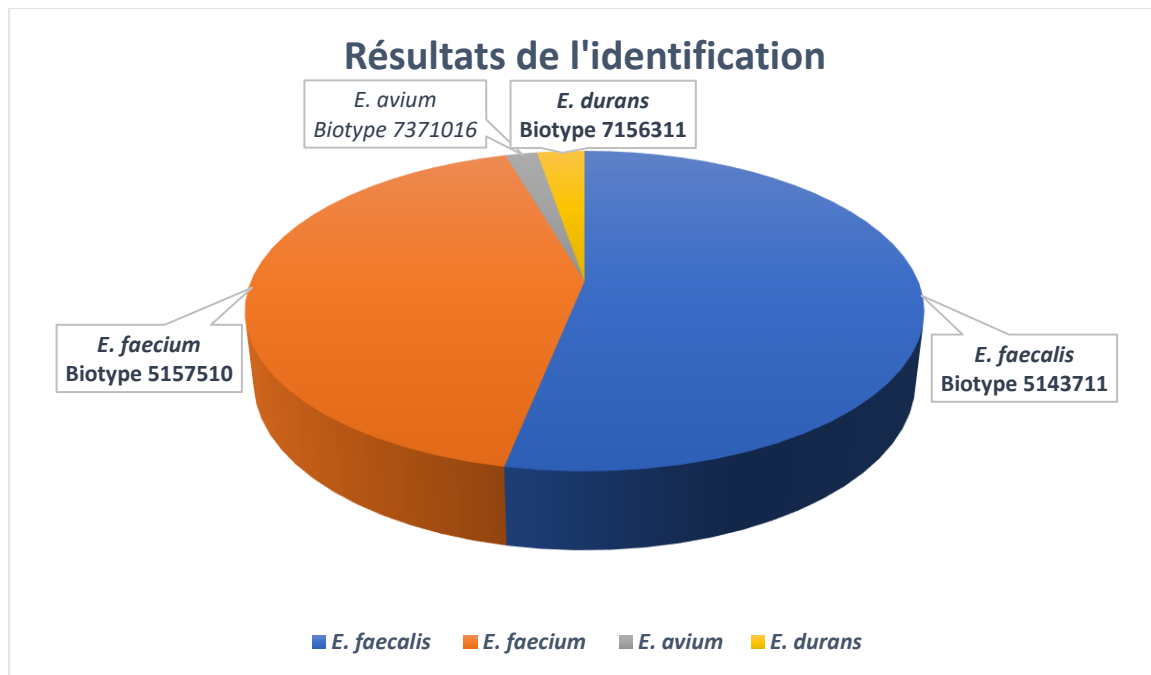


Figure 14. Résultats de l'identification selon les espèces par le système API Strep

L'identification à l'espèce a été confirmée par la technique moléculaire de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à la recherche du gène 'tuf', les bandes correspondant à 803 pb (Figure 15), représentent le genre *Enterococcus*.

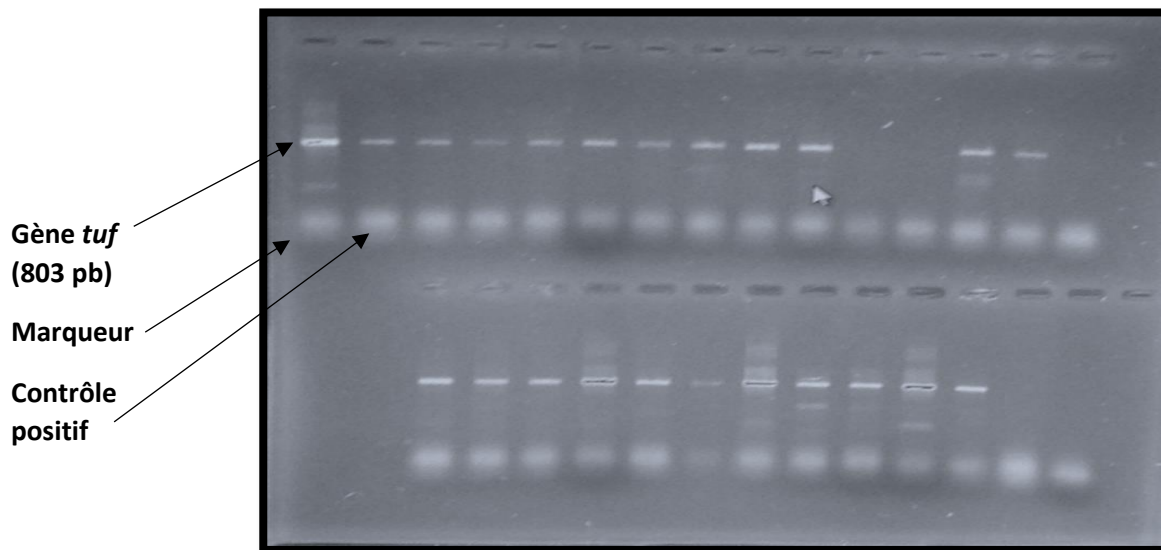


Figure 15. Résultat de l'identification par PCR du gène 'tuf'

Tous les produits amplifiés obtenus correspondant à 803 pb ont été séquencés pour valider leur identification, puis comparés aux séquences disponibles déposées dans la GenBank à la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant le programme BLAST.

2.1. Répartition des souches d'entérocoques selon les services et le type de prélèvements

Les résultats de la **Figure 16** montrent que les espèces *d'Enterococcus* sp étaient plus isolées du service de chirurgie avec 33% et plus spécialement des plaies suppurées ; et du service de pédiatrie avec 32%- Suivi par le service d'urologie avec 22,5% suite à des infections urinaires, 10% des souches provenaient du service de maternité et seulement deux pour cent du service de néphrologie.

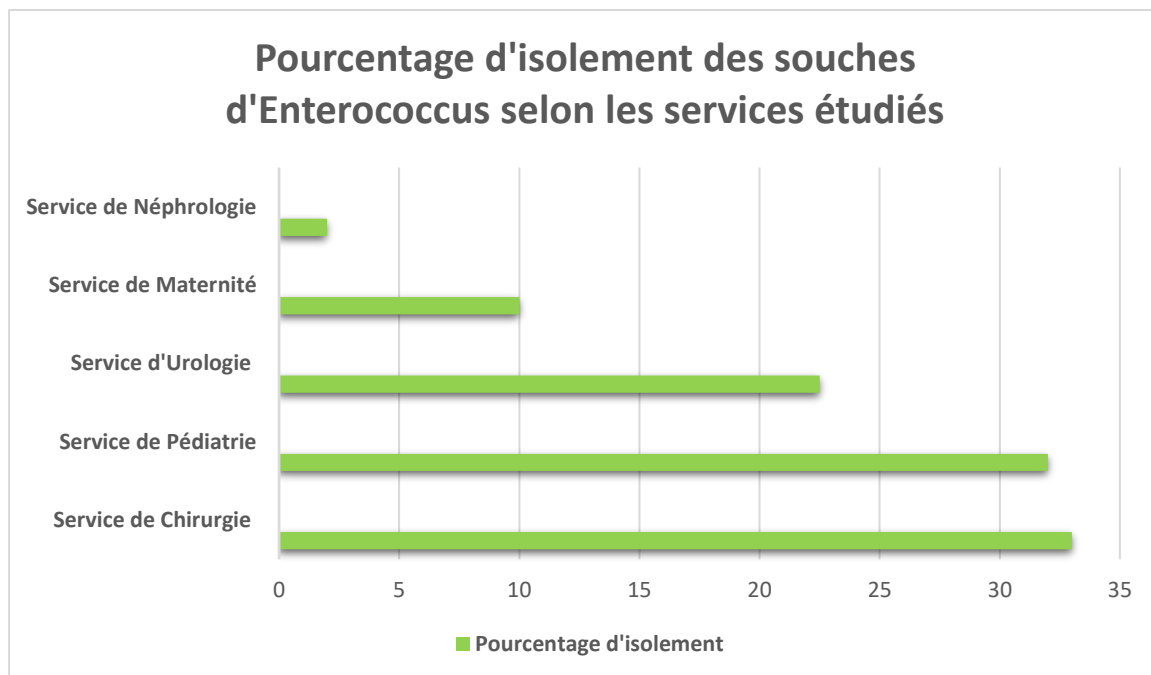


Figure 16. Répartition des souches selon les services

Suite à notre identification et selon la **Figure 17**, quatre espèces d'entérocoque ont été isolées, avec une nette dominance des espèces *E. faecalis* et *E. faecium* responsables le plus souvent d'infections du site opératoire (49%) et d'infections urinaires (40%). Ces deux espèces ont été également retrouvées dans des hémocultures (10%), une souche d'*E. faecium* a été retrouvée dans du liquide de dialyse. Les souches *E. avium* et *E. durans* avec 1% seulement ont été isolées des infections du site opératoire.

Celik et al., (2014), avaient signalé la présence d'*E. faecalis* dans les urines et dans les plaies opératoires avec une fréquence plus élevée que celle d'*E. faecium*, et l'absence d'*E. avium* et d'*E. durans* dans les urines et dans le sang. De même, **Yilema et al., en (2017)** ont pu isoler 41.6% des souches *d'Enterococcus* de prélèvements urinaires, 25% des plaies et 20.8% d'hémocultures.

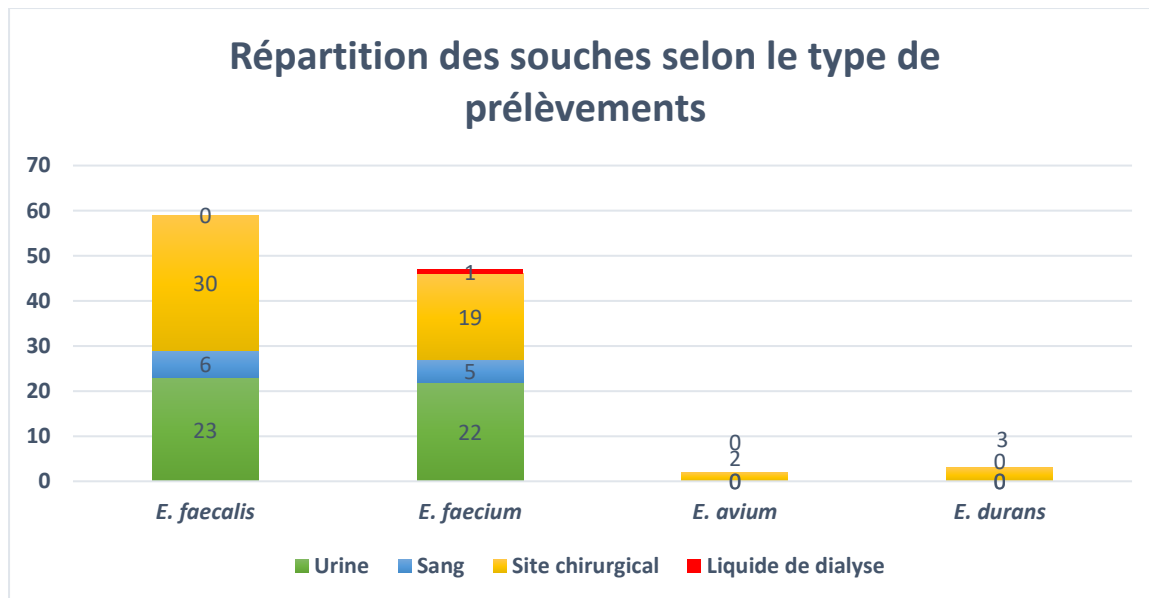


Figure 17. Répartition des souches selon le type de prélèvements

Avec une probabilité de 0.62, l'étude statistique a révélé globalement qu'il n'y a pas de différence significative entre les fréquences d'isolement des deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium*.

3. Résultats de l'état de résistance des souches de *E. faecalis* et *E. fecacium* vis-a-vis des familles d'antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des deux espèces dominantes (Figure 18) a révélé une inefficacité de certaines molécules. À l'exception de l'imipénème, qui était actif sur 83% des *E. faecalis*, toutes les β -lactamines testées ont montré des taux d'inefficacité allant de 51% pour l'ampicilline à 100% pour les céphalosporines. La situation reste relativement la même pour *E. faecium*, qui s'est caractérisé par une résistance totale aux céphalosporines, plus prononcée vis-à-vis de l'imipénème.

Rice *et al.*, (2012) estiment que les souches d'*E. faecalis* peuvent exprimer des enzymes β -lactamases qui confèrent une résistance de haut niveau contre toutes les pénicillines, à l'exception de celles associées aux inhibiteurs de la β -lactamases (sulbactame ou clavulanate). Le gène de la pénicillinase entérococcique se trouve souvent sur un plasmide transférable.

Le taux de résistance à l'ampicilline enregistré dans ce travail reste relativement similaire à celui rapporté au Cameroun et en Éthiopie avec des taux d'environ 60% et 66,7% respectivement (Kamga *et al.*, 2015). Cependant, il est plus important que celui rapporté par Komiyama *et al.*,(2016) au Brésil.

La résistance des entérocoques **aux β -lactamines** est généralement due à deux mécanismes distincts : une surproduction de Penicillin-Binding Protein 5 (PLP5) avec une faible affinité pour les β -lactamines ou une synthèse de β -lactamases, qui apparaît beaucoup plus prononcée chez *E. faecium* que chez *E. faecalis* (**O'Driscoll et al., 2015**). En Turquie, une étude a montré une différence de réaction à l'ampicilline entre *E. faecalis* et *E. faecium*, avec respectivement des taux de résistance de 2% et de 71%, (**Celik et al., 2014**). Cette résistance s'exprime par la production d'un plasmide PLP5 seul ou en association avec des mutations ponctuelles, en particulier PLP5 M485A avec insertion Ser en position 466 chez *E. faecium* (**Kristich et al., 2014**).

L'activité **des aminosides** sur *E. faecalis* était différente selon les molécules testées, et bien que ces isolats développent des taux de résistance élevés à la néomycine (100%) et à l'amikacine (98%), ils étaient plus sensibles à la gentamicine (56%) qu'à la tobramycine (46%).

Les entérocoques présentent une tolérance intrinsèque (se manifestant par le manque d'activité bactéricide) aux aminosides. Ce phénomène semble être médié par deux facteurs principaux : une mauvaise absorption de l'antibiotique nécessitant des concentrations plus élevées pour favoriser l'entrée dans l'espace intracellulaire et l'inactivation par modification covalente des groupes hydroxyle ou amino de la molécule d'aminoside réalisée par des enzymes entérocoquiques naturelles, créant une entrave stérique et une diminution de la liaison à la cible ribosomale. Chez *E. faecalis*, la résistance intrinsèque est causée par l'incapacité de l'antibiotique à pénétrer dans le cytoplasme et à inhiber la synthèse des protéines ribosomales (**Aslangul et al., 2006**).

Chez *E. faecium*, deux gènes chromosomiques : une 6 β -N-aminoglycoside acétyltransférase (aac (6) - Ii) (**Costa et al., 1993**) et une ARNr méthyltransférase (*efmM*), ont été associées à une résistance intrinsèque à la tobramycine, la kanamycine, la sisomicine et la nétilmicine (**Galimand et al., 2011**).

De nombreux isolats cliniques possèdent également l'enzyme APH (3') - IIIa, qui se traduit par une résistance à la kanamycine et à l'amikacine grâce à sa capacité de phosphotransférase (**Miller et al., 2014**).

L'activité des aminosides sur *E. faecalis* diffère vis-à-vis des molécules testées. Ainsi, la gentamycine et la tobramycine semblent être plus efficaces que l'amikacine et la néomycine. Le taux de résistance à la gentamycine se rapproche de celui enregistré par **Santella et al., (2019)**, qui est de 47%, contrairement aux résultats révélés par **Kamga et al., (2015)** où le taux de résistance était de 16% pour la gentamycine et de 20% pour la kanamycine.

En revanche, **les fluoroquinolones** semblent être relativement plus actives contre *E. faecalis* (ofloxacin 36%, ciprofloxacine 30%), que contre *E. faecium* (66% et 44% respectivement).

Ce taux reste inférieur à celui rapporté par **Saeidi et al., en (2017)** (43%). Contrairement à l'espèce *E. faecium* qui a été plus résistante (44%), **Santella et al.,(2019)**, ont signalé un taux élevé de résistance à la ciprofloxacine (88,6%) pour *E. faecium*, contrairement à *E. faecalis* qui a été plus sensible à la même molécule (38,3%), ce qui concorde avec nos résultats. Cette résistance est souvent due au système d'efflux actif codé par le gène *emeA*, qui affecte plusieurs molécules et qui est à l'origine du phénomène de multirésistance (**Jia et al., 2014**).

La rifampicine n'a pas été très active vis-à-vis de nos souches où un taux avoisinant les 75% de résistance pour *E. faecalis* *E. faecium* a été signalé. Des taux similaires ont été signalés dans les études de **Celik et al., en (2014)** et de **Jia et al., (2014)**.

La résistance à la rifampicine provient d'une variété de mutations dans le gène *rpoB* qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase (**Kristich et al., 2014**).

Notons tout de même qu'en **2007**, **Rand et al.**, ont décrit un isolat d'*E. faecium* qui a développé une résistance à la rifampicine sans aucune preuve de mutations dans le gène *rpoB*, d'inactivation enzymatique ou de pompes d'efflux. Le mécanisme exact de la résistance n'a pas été élucidé, mais il est intéressant de noter que le phénotype résistant était réversible après incubation avec des concentrations sous-inhibitrices de daptomycine.

Selon **Andrews et al., (2000)**, les entérocoques sont souvent résistants à la rifampicine, même si cet antibiotique n'est pas couramment utilisé dans les infections à entérocoques.

Avec des taux de résistance respectifs de 81 % et 85% de **l'érythromycine** vis-à-vis d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* ; deux mécanismes sont considérés comme responsables de la résistance aux **macrolides** chez les entérocoques, soit la modification du site cible de l'érythromycine médiée par le gène *erm* ou l'efflux antimicrobien médié par le gène *mef* [(**Portillo et al., 2000**) ; (**Leclercq, 2002**)].

Des taux similaires (88% et de 71%) ont été signalé par **Kamga et al., (2015)** et par **Saeidi et al., (2017)** en Arabie Saoudite.

En Italie, dans une étude de **Santella et al., en (2019)**, la résistance à l'érythromycine était de 100% pour *E. faecalis* contre 54% pour *E. faecium*, contrairement à notre étude où *E. faecium* était moins sensible (**Tableau 14**).

Les tétracyclines sont inactives vis-à-vis de nos souches où des taux de résistance de 90 % ont été constatés, ces fortes résistances avaient déjà été retrouvées dans une étude similaire en Turquie de **Celik et al., 2014**.

Dans une étude réalisée par **Tian et al., en (2019)**, 100% des isolats cliniques d'*Enterococcus* résistants à la tétracycline portaient le gène *tetM*, ce qui confirme que la résistance acquise aux tétracyclines chez les entérocoques est souvent due à des éléments génétiques mobiles.

La **Clindamycine** a été totalement inactive sur nos souches avec un taux de résistance de 100% pour les deux espèces étudiées, ce qui est contraire aux résultats signalés par **Jia et al., en (2014)**, où cette molécule a été très active contre *E. faecalis* pour les quels seulement 9,1% ont été résistants, mais l'espèce *E. faecium* a été résistante à 25%.

E. faecalis possède une résistance intrinsèque à la clindamycine, grâce à l'activité conférée par l'expression du gène *lsa*. Ce dernier est lié structurellement aux pompes à efflux ABC (ATP Binding cassette) (**Singh et al., 2002**).

Le **Tableau 14** montre une inefficacité totale de la **Fosfomycine** pour les deux espèces étudiées. **Farina et al., 2011** ont démontré que la fosfomycine était plus active en association avec le céftriaxone contre 81,5% des souches d'*E. faecalis* isolées d'endocardite infectieuse, que si elle était testée seule.

La fosfomycine est un antibiotique à effet bactéricide puissant car elle interfère avec la synthèse de la paroi cellulaire en inhibant l'UDP-N-acétylglucosamine énoypyruvyl transférase (*MurA*), une enzyme qui catalyse la formation de l'acide N-acétyl-muramique. Ce mode d'action de la fosfomycine (affectant la synthèse du peptidoglycane) confère une moindre résistance croisée avec d'autres antibiotiques et offre un large spectre d'activité contre les principaux genres à Gram positif (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.) [(**Ou et al., 2017 ; Candell et al., 2019**)].

Les mécanismes de résistance de la fosfomycine comprennent la réduction du transport intracellulaire de l'antibiotique (mutation dans les gènes transporteurs, les gènes régulateurs ou *ampC* pour *glpT*), le changement de cible dû à des changements dans l'expression de *murA* et l'inactivation directe de l'antibiotique par les métalloenzymes (*fosA*, *fosB* et *fosX*) ou par des kinases (*formA* et *formB*) (**Dijkmans et al., 2017**).

Quant aux **glycopeptides**, le **Tableau 13** montre une sensibilité totale d'*E. faecalis* vis-a-vis de la vancomycine, et seulement 4% des souches d'*E. faecium*.

Le risque de colonisation par les ERV dans les infections subséquentes est fréquemment observé lors d'un traitement antimicrobien antérieur chez des patients à risque accru présentant des maladies sous-jacentes sévères ou une immunosuppression avec un long séjour à l'hôpital, dans des établissements de soins de longue durée, et la proximité avec d'autres patients atteints d'entérocoque résistant à la vancomycine [(**McDermott et al., 2018**) ; (**Lee et al., 2019**)].

Différents résultats publiés montrent que l'espèce *E. faecium* est plus résistante à la vancomycine par rapport à *E. faecalis*, en Chine (0,7% contre 0.0) (**Jia et al., 2014**), en Turquie (51% contre 0.0) (**Celik et al., 2014**), au Maroc 23, 6% d'*E. faecium* contre 17, 8% d'*E. faecalis* (**Hannaoui et al., 2016**), en Italie (7,3% contre 1,9%) (**Santella et al., 2019**).

Selon **Garrido et al., 2014**, *E. faecium* serait le réservoir de gène du type *VanA* transférable (et en partie le type *VanB*) de la résistance en médecine humaine et dans d'autres habitats.

La résistance des entérocoques aux glycopeptides n'a pas cessé d'évoluer depuis l'apparition des premiers cas d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) dans les années 1980 en Europe, puis en Amérique et partout dans le monde (**Leclercq et al., 1988**).

La résistance est due à des changements dans la formation du peptidoglycane qui constitue la paroi cellulaire bactérienne. Normalement, la vancomycine se lie à l'extrémité D-Ala-D-Ala des précurseurs protéiques du peptidoglycane. La résistance se développe lorsque cette extrémité est changée en D-Ala-D-lactate de sorte que la vancomycine se lie avec moins d'affinité. Ceci est codé par des génotypes identifiés par ordre alphabétique de *VanA* à *VanG* (**Levitus et al., 2020**).

En comparant les résultats entre les deux espèces étudiées, l'analyse statistique a révélé que les deux espèces semblent avoir relativement le même profil de résistance aux antimicrobiens (**Figure 18**).

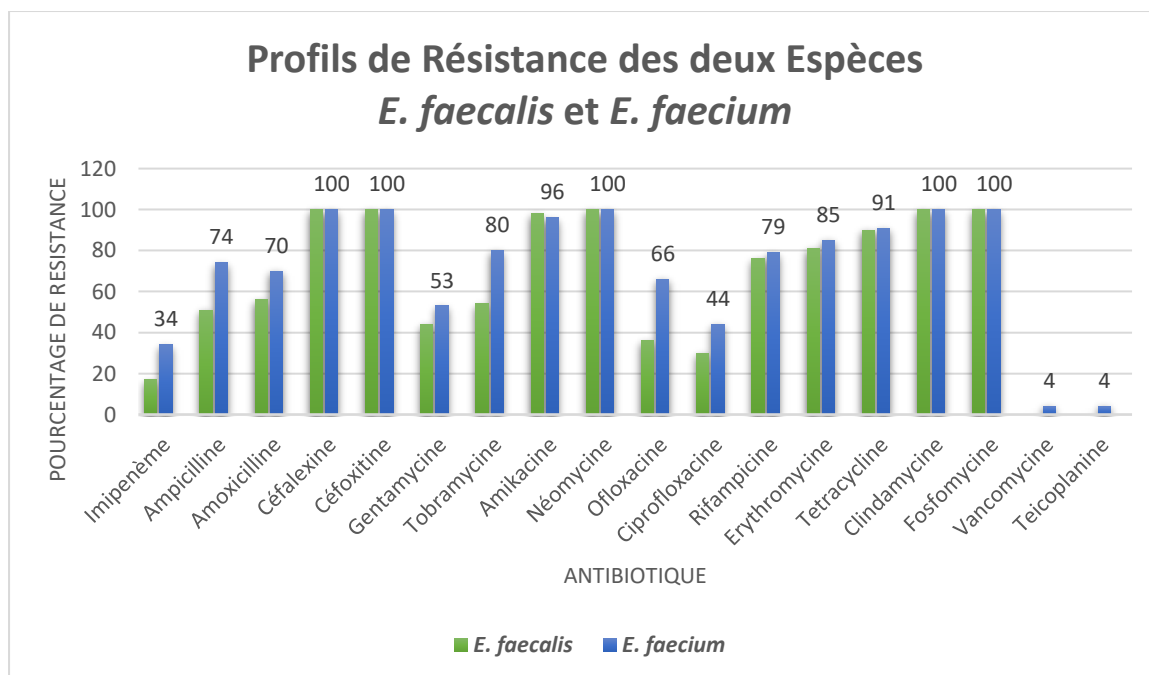


Figure 18. Profils de résistance des deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium*

Il faut tout de même signaler que *E. faecium* présente une différence significative avec *E. faecalis* pour la résistance aux molécules suivantes : l'imipénème, l'ampicilline, la tobramycine et l'ofloxacine ($p < 0,05$) (**Tableau 13**).

Ce résultat concorde avec un travail réalisé en Italie par **Santella *et al.*, en (2019)**, où *E. faecalis* avait moins de pourcentage de résistance aux différents antibiotiques testés comme l'ampicilline, l'imipénème, la ciprofloxacine, l'érythromycine et la tétracycline par rapport à *E. faecium*.

Tableau 13. Pourcentage et profils de résistance des deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium*

Antibiotique	<i>E. faecalis</i> (N= 59)		<i>E. faecium</i> (N= 47)		Probabilité P
	Résistance	%	Résistance	%	
<i>Imipenème</i>	10	17	16	34	0.042
<i>Ampicilline</i>	30	51	35	74	0.013
<i>Amoxicilline</i>	33	56	33	70	0.131
<i>Céfalexine</i>	5	100	47	100	/
<i>Céfoxitine</i>	59	100	47	100	/
<i>Gentamycine</i>	26	44	25	53	0.350
<i>Tobramycine</i>	32	54	38	80	0.004
<i>Amikacine</i>	58	98	45	96	0.429
<i>Néomycine</i>	59	100	47	100	/
<i>Ofloxacine</i>	21	36	31	66	0.001
<i>Ciprofloxacine</i>	18	30	21	44	0.132
<i>Rifampicine</i>	45	76	37	79	0.764
<i>Erythromycine</i>	48	81	40	85	0.609
<i>Tétracycline</i>	53	90	43	91	0.771
<i>Clindamycine</i>	59	100	47	100	/
<i>Fosfomycine</i>	59	100	47	100	/
<i>Vancomycine</i>	0	0	2	4	0.109
<i>Teicoplanine</i>	0	0	2	4	0.109

(p <0,05)

4. Etat de multirésistance chez les souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* isolées

Les données enregistrées dans ce travail confirment l'état de multirésistance qui affecte la majorité des isolats testés ; en effet, l'ampleur du phénomène est telle qu'un isolat a montré une résistance à tous les antibiotiques testés, et qu'en moyenne huit souches d'*E. faecium* ont été résistantes à 11 antibiotiques, ce qui limite considérablement les traitements thérapeutiques. Cette situation semble refléter les pratiques de soins et les choix thérapeutiques propres à chaque service. Aussi, selon une enquête personnelle d'observance réalisée dans le service de chirurgie de l'hôpital de Tlemcen, les antibiotiques les plus utilisés en 2017 étaient représentés par les céphalosporines (Céfazoline 35%, Céfotaxime 17%, et Céftrizoxime 14%), ces molécules générant une pression de sélection pourraient être responsables de l'émergence de ces résistances.

La **Figure 19**, illustre le caractère multirésistant de toutes nos souches *d'Enterococcus* sélectionnées qui présentent une résistance croisée aux β -lactamines et qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques réduisant ainsi l'éventail des molécules thérapeutiques actives. En effet, l'espèce *E. faecium* a été la plus résistante, puisque deux souches ont pu résister à plus de 16 molécules d'antibiotiques.

La multirésistance peut prolonger le temps d'hospitalisation, augmenter le coût du traitement, et le nombre de décès (**García-Solache et Rice, 2019**).

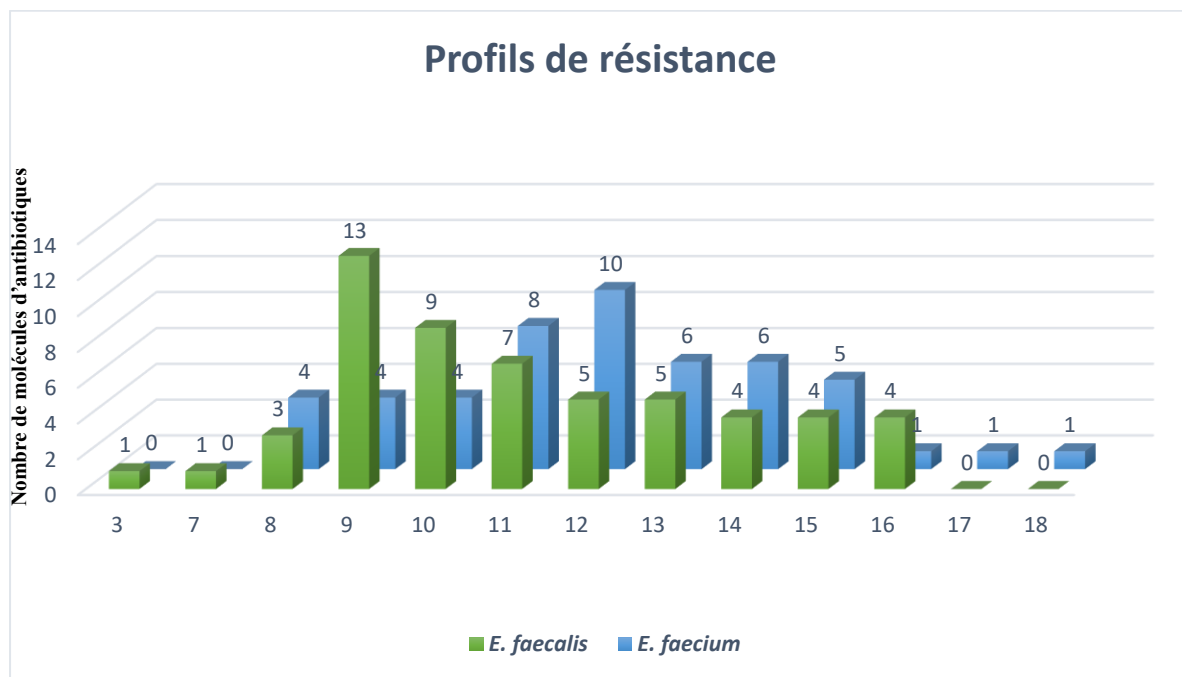


Figure 19. Etat de multirésistance *d'Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*

5. Concentrations minimales inhibitrices

Le caractère résistant des souches *d'E.feacalis* et *d'E.feacium* testées a été confirmé par la détermination des CMI afin de connaître le niveau réel de ces résistances.

Cette concordance avec les profils de l'antibiogramme s'est traduite par une fluctuation des niveaux de résistance dépassant parfois les 512 μ g/mL (**Tableau 14**).

La combinaison de l'acide clavulanique associé à l'amoxicilline n'a pas amélioré l'activité de ce dernier, alors que l'imipénème a été caractérisé par une efficacité relative avec un taux de résistance de seulement 23%. Le taux de résistance à l'amikacine a été plus élevé que celui de la gentamicine.

L'efficacité des glycopeptides a été totale (100%) pour *E. faecalis*, mais pour *E. faecium* deux souches se sont distinguées avec des CMI de l'ordre de 256 µg/mL pour la vancomycine et de (48 et 64 µg/mL) pour la teicoplanine.

Tableau 14. Concentrations minimales inhibitrices (µg / mL) des entérocoques testés

ATB	VA		TEC		CIP		IPM		AMC		AMP		GEN	AMK
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
CMI	4	4	2	2	4	4	4	8	4	8	4	8	128	128
CMI < 1	69		73		20		44		32		33		36	0
1 ≤ CMI ≤ 2	29		25		45		15		4		7		8	0
2 < CMI < 8	0		0		4		18		6		0		4	0
8 ≤ CMI < 64	0		1		4		13		16		14		6	4
64 ≤ CMI < 256	0		1		7		7		16		12		21	8
CMI = 256	0		0		10		2		8		4		16	6
CMI ≥ 512	2		0		10		1		18		30		09	82

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice, VA : vancomycine, TEC : Teicoplanine, CIP : Ciprofloxacine, IPM : Imipénème, AMC : Amoxicilline/Acide clavulanique, AMP : Ampicilline, GM : Gentamycine, AMK : Amikacine.

5.1. Résultats des CMI des glycopeptides : Cas de la vancomycine

Les glycopeptides ont conservé leur efficacité sur les souches isolées dans ce travail, mais nous assistons tout de même à l'émergence de deux souches d'*E. faecium* présentant des concentrations minimales inhibitrices de l'ordre de 256µg/mL pour la vancomycine, mais le niveau de cette résistance a diminué vis-à-vis de la teicoplanine (48 et 64 µg/mL). Cette résistance a été rapportée pour la première fois en Algérie en (2008) chez *E. faecalis*, et bien que cette souche ait présenté des CMI de vancomycine et de Teicoplanine supérieures à 256µg/mL, elle fut sensible à l'ampicilline et à la pénicilline (**Hamidi et al., 2008**). Un autre cas a été signalé dans un hôpital à Alger en 2013, rapportant une résistance à la vancomycine d'une souche d'*E. faecium*. À l'exception de la pristinamycine, cette résistance a touché toutes les molécules testées (**Aggoune et al., 2013**).

La Sensibilité des entérocoques à la vancomycine semble être importante au vue des CMI retrouvées, puisque 70% de nos souches possèdent des CMI inférieures à 0.5 µg/mL.

Dans une étude réalisée en Inde par **Purohit et al., (2017)**, la CMI de la vancomycine variait de 0,25 à 1 µg/mL dans la majorité des isolats, (74,8%) et (22,8%) avaient une résistance élevée à la vancomycine (CMI > 256 µg /mL) et à la teicoplanine (CMI= 64 µg / mL) représentant le phénotype *VanA*. Ces résultats restent supérieurs à ceux signalés par **Zhang et al., en (2018)** où la sensibilité était respectivement de l'ordre de 71,6% et 70,7% chez *E. faecium* et *E. faecalis*.

Dans une étude iranienne, le profil de résistance n'était pas différent de nos résultats, où les isolats étaient résistants à la teicoplanine (3%) et à la vancomycine (9%), ainsi qu'à quelques autres antibiotiques (**Praharaj et al., 2013**).

Karna et al., (2019), ont rapporté que (42) souches d'*E. faecalis* testées dans leur travail, avaient une CMI comprise entre 2 et 8 µg/mL ; alors que (37) souches d'*E. faecium*, avaient une CMI entre 2 -16 µg/mL, et (4) souches résistaient jusqu'à 256 µg/mL. Signalant ainsi la différence de virulence entre les deux espèces.

Sur une période de quatre ans (de 2015 à 2018), l'augmentation de la résistance pour plusieurs pays a été considérable ; Par exemple, en Italie, la résistance à la vancomycine chez *E. faecalis* diminue avec un faible pourcentage mais sans différence significative. En revanche, pour *E. faecium*, le taux de résistance à la vancomycine en 2018 a augmenté, avec un pourcentage de 12,2%. À ce jour, la résistance à la vancomycine chez *E. faecium* était de 17,3%, par rapport à 2015, où elle était de 10,5% (**Santello et al., 2019**).

Dans une synthèse réalisée par **Osei Sekyere & Mensah (2019)** sur la fréquence de distribution des espèces d'*Enterococcus* en Afrique entre 2007 et 2019, à partir d'échantillons différents (humains, animaux et environnement), la prévalence du gène *vanA* était relativement élevée dans des échantillons environnementaux, (10,6%) (Tunisie) et 29,4–74,0% (Afrique du Sud), tandis que 5,7–8,3% (Tanzanie), 46,2% (Égypte), 65% (Nigéria) et 100% (Afrique du Sud) étaient d'origine animale. Chez l'homme, 2,5% (Afrique du Sud), 3,0 à 3,5% (Égypte), 7,0% (Algérie), 20,8% (Tunisie) et 31,5 à 44,3% (Tanzanie) ont été signalés. Ces taux montrent une prévalence des ERV chez les animaux et les humains posant de graves menaces sanitaires.

L'incidence du phénotype *VanA* dans les autres continents varie entre les deux espèces *E. faecalis* et *E. faecium*, il a été respectivement signalé à 0.2% et 20.8% en Asie ; à 19% et 1% en Europe, et à 64.7% contre 2.5% en Amérique du nord (**Pfaller et al., 2019**).

Six gènes différents qui sont à l'origine de la résistance à la vancomycine ont été décrits jusqu'à présent chez les entérocoques, à savoir *vanA*, *VanB*, *vanC*, *vanD*, *VanG*, *VanE* et *vanL* (**Tableau 15**). Ils peuvent être constitutifs ou inductibles, de localisation chromosomique ou plasmidique, et sont distribués selon les espèces d'*Enterococcus* (**Werner et al., 2008**).

Le type *VanA* se caractérise par une résistance élevée et inductible à la vancomycine (CMI 64- 1024 µg/mL) et a été directement facilité par le transport du transposon Tn 1546, un transposon qui a largement diffusé chez les humains, les animaux et l'environnement (**Makinen et al., 1989**).

Tableau 15. Résistance à la vancomycine chez les entérocoques (Werner et al., 2008).

Phénotype	Résistance acquise						Résistance intrinsèque
	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	<i>VanD</i>	<i>VanE</i>	<i>VanG</i>	<i>VanL</i>	<i>VanC</i>
Gène ligase	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	<i>VanD</i>	<i>VanE</i>	<i>VanG</i>	<i>VanL</i>	<i>VanC</i>
CMI vancomycine (mg/l)	16 - 1000	4 - 32 (- 1000)	64 - 128	8 - 32	16	8	2-32
CMI Teicoplanine (Mg/l)	(4-) 16 - 512	0.5-1	4 - 64	0.5	0.5	S	0.5-1
Expression	inductible	inductible	constitutive	inductible	inductible	inductible	Constitutive/inductible
Localisation	plasmide/chromosome	plasmide/chromosome	chromosome	chromosome	chromosome	chromosome	chromosome
Transférable par conjugaison	+/-	+/-	-	-	+	-	-
Distribution chez les espèces d'Enterococcus	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum: vanC1</i> <i>E. casseliflavus: vanC2/3</i>

Il existe de nombreuses variantes phénotypiques de base, la plupart semblent résulter de la présence de ligases bactériennes modifiées qui remplacent les séquences terminales de la D-alanyl-D-alanine par du D-alanyl-D-lactate ou de la D-alanyl-D-sérine avec une affinité de liaison réduite pour les glycopeptides (**Cetinkaya et al., 2000**).

5.2. Résultats des CMI des β -lactamines

Nos résultats montrent que les souches d'entérocoques testées présentent un taux de résistance relativement moyen (54%) vis-à-vis de l'amoxicilline/acide clavulanique, ce taux qui reste comparable à celui exprimé envers l'ampicilline (52%) diminue pour atteindre les (40%) envers l'imipenème. De très rares souches productrices de pénicillinases ont été décrites (**Arias et Muray, 2012**) ; Nos résultats semblent montrer une sensibilité à l'ampicilline plus importante que celle signalé par **Zhang en 2018**, 98% pour *d'E. faecalis* et 11,9% pour *E. faecium*.

En Grèce, toutes les souches *d'E. faecalis* isolées sur une période de six années (2002-2007) étaient sensibles à l'ampicilline, tandis que pour les isolats *d'E. faecium*, des taux constamment élevés de résistance à l'ampicilline ont été détectés au cours de la période d'étude allant de 76,5% en 2003 à 89,9% en 2005 (**Protonotariou et al., 2010**).

5.3. Résultats des CMI des Fluoroquinolones (Ciprofloxacin)

Nos résultats montrent que (35%) des souches sont résistantes à la ciprofloxacin, ce taux est nettement inférieur à celui signalé par Salem-Bekhit qui montrent que (49.9%) des isolats étaient résistants à la ciprofloxacin (**Salem-Bekhit et al., 2012**). Il en est de même pour les résultats signalés par **Udo et al., en (2003)** qui ont travaillé sur 415 souches et ont montré que 40% présentaient une résistance à la ciprofloxacin. L'action antibactérienne des quinolones est une inhibition de l'ADN gyrase et de l'ADN topoisomérase IV (enzymes qui agissent pour enrouler et dérouler l'ADN complémentaire) (**Rice, 2012**).

Lopez et al., en (2011) ont montré que les souches avec une CMI de ciprofloxacin ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, présentaient des changements d'acides aminés dans les protéines GyrA et ParC. Néanmoins, une souche d'origine humaine clinique à CMI inférieure pour ce fluoroquinolone (CMI ≤ 16 $\mu\text{g/mL}$), a présenté la séquence sauvage pour ces deux protéines. Les souches présentaient un changement d'acide aminé en GyrA (la sérine en position 83 a été changée en isoleucine, tyrosine ou arginine (s83i, s83Y Ou s83R), et un changement d'acide aminé en ParC (la sérine en position 80 est devenue isoleucine ou arginine : s80i ou s8OR) dans cinq combinaisons différentes. Une souche supplémentaire à une CMI de 128 $\mu\text{g/mL}$ de la ciprofloxacin a présenté deux changements dans la GyrA (s83i et E87G) et un changement dans la ParC (s80i) (**Lopez et al., 2011**).

Les deux enzymes sont composées de deux sous-unités, les sous-unités GyrA et GyrB de l'ADN gyrase et les sous-unités ParC et ParE de la topoisomérase IV (**Schmitz et al., 1998**).

Des mutations uniques similaires dans les locus ser83 et Glu87 de la GyrA ont été associées à une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la ciprofloxacin chez les souches *d'E. faecalis* [(**Korten et al., 1994**) ; (**Tankovic et al., 1996**)].

Des mutations de la *gyrA* et de la *parC* ont été observées chez *Enterococcus faecium* résistants à la quinolone à un niveau élevé (El Amin *et al.*, 1999).

Chez *E. faecalis*, une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine à 8 µg/mL ou plus est associée à une double modification des acides aminés du codon 80 dans ParC (sérine à isoleucine) et dans GyrA soit dans le codon 83 (Sérine à Tyrosine ou Sérine à isoleucine) ou le codon 87 (acide glutamine à Glycine). Chez *E. faecium*, une CMI de ciprofloxacine de 4µg/mL n'est pas associée à des changements d'acides aminés dans les zones séquencées de mutations ponctuelles [(Korten *et al.*, 1994) ; (Kanematsu *et al.*, 1998)].

Selon les résultats observés par Jia *et al.*, (2014), chez les entérocoques, l'association d'un inhibiteur de la pompe à efflux actifs « la réserpine », avec une fluoroquinolone, réduit significativement les CMI de différentes molécules telles que la ciprofloxacine, la gatifloxacine et la lévofloxacine.

5.4. Résultats des CMI des Aminosides (Gentamicine, Amikacine)

Dans notre étude, 46% des souches ont présenté une résistance à la gentamicine dont 9 avaient une CMI >512 µg/mL et sont considérées hautement résistantes, ces résultats restent supérieurs à ceux trouvés par Salem-Bekhit *et al.*, en (2012) qui ont signalé une résistance élevée chez 20.9% des isolats, mais sont inférieurs à ceux signalés par Padmasini *et al.*, (2014) qui étaient de 46.7%.

La résistance de haut niveau à la gentamicine (CMI ≥ 500 µg/mL) chez les entérocoques est principalement médiée par l'enzyme *aac* (6')-Ie-aph (2'')- Ia, qui code pour l'enzyme bifonctionnelle de modification des aminosides AAC (6')-APH (2''). L'action de cette enzyme chez les entérocoques élimine l'activité synergique de la gentamicine lorsqu'elle est associée à un agent actif de la paroi cellulaire, comme l'ampicilline ou la vancomycine. D'autres gènes *AME* ont été découverts plus tard tels que *aph* (2'')-Ib, *aph* (2'') - Ic, et *aph* (2'') – Id (Padmasini *et al.*, 2014).

Nos résultats montrent que 96% de souches présentent une résistance à l'amikacine avec une CMI ≥512 µg/mL, des auteurs ont signalé les mêmes résultats chez 22.8% d'entérocoques (Salem-Bekhit *et al.*, 2012). De nombreux isolats cliniques possèdent également l'enzyme APH(3)-IIIa, qui entraîne une résistance à l'amikacine par sa capacité de phosphotransférase (Chow, 2000).

Le gène acquis APH (2')-Ic codant pour des phosphotransférases a une activité contre la gentamicine, mais pas contre l'amikacine ; et *aph* (2'')-Ib est un gène qui a été décrit chez *E. faecium* et sa présence entraîne une résistance à tous les aminosides à l'exception de l'amikacine (Chow, 2000).

6. Concentration minimales inhibitrices par E-test

Suite aux importantes CMI retrouvées chez les deux souches d'*E. faecium* vis-a-vis de la vancomycine (CMI \geq 512 μ g/mL) et la teicoplanine (64 μ g/mL), une confirmation a été réalisée par E-test (**Figure 20**) qui montre une résistance totale. Ces taux restent relativement élevés par rapport à ceux signalés par **Benammar et al., (2018)** qui étaient >256 μ g/mL pour la vancomycine et entre 16-24 μ g/mL pour la teicoplanine.

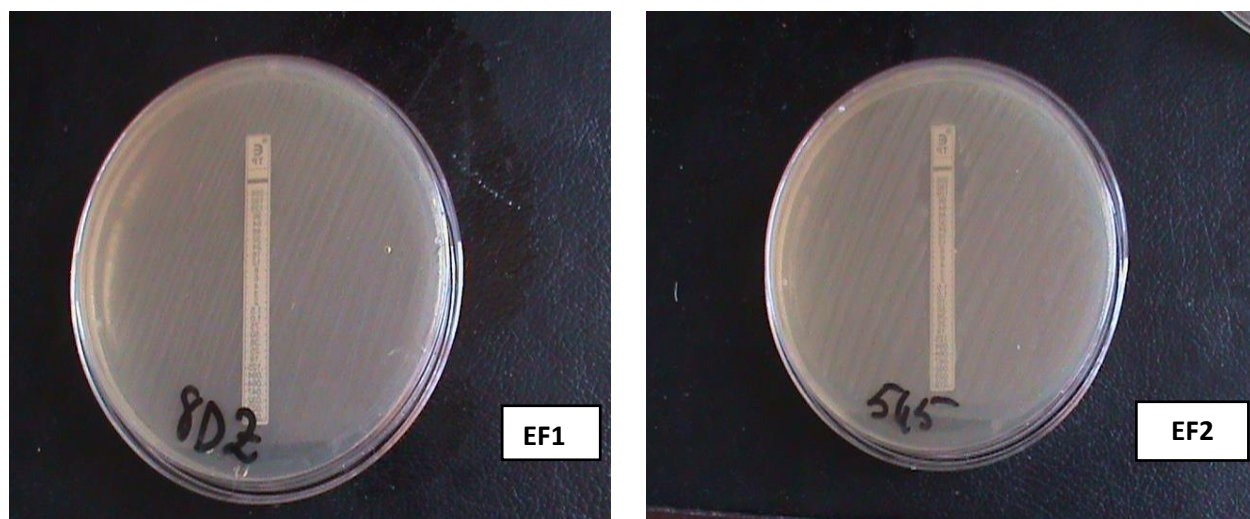


Figure 20. Résultats des CMI par E-test vis-à-vis des glycopeptides pour les deux souches d'*E. faecium* isolées

Ces deux souches d'*Enterococcus faecium* isolées dans ce travail proviennent de deux prélèvements différents, le premier à partir de liquide de dialyse (EF1), et le second d'une hémoculture (EF2). Leur résistance aux antibiotiques demeure inquiétante car sur l'ensemble des molécules testées, seule la pristinaamycine s'est caractérisée par une efficacité sur la deuxième souche. Ces souches ont résisté à la gentamicine, ce qui est en accord avec les travaux réalisés à Cuba par **Quinones et al., en 2017** qui ont signalé une résistance de haut niveau à cette molécule. Cette résistance n'a pas épargné les β -lactamines telles que l'ampiciline et l'imipénème (**Tableau 13**), ce qui concorde avec le résultat de **Celik et al., (2014)**.

La résistance de nos deux souches semble concerner plusieurs familles d'antibiotiques, comme les fluoroquinolones, ce qui suggère l'acquisition concomitante de plusieurs mécanismes de résistances.

Une étude réalisée dans un centre de soins en Inde, a révélé que 44% de souches d'*E. faecium* étaient résistantes à la vancomycine avec des CMI >256 μ g/mL par la méthode E-test contre seulement 4 % d'espèces d'*E. faecalis* (**Bhatt et al., 2014**).

Plusieurs études ont également signalé que *E. faecalis* représente beaucoup moins d'isolats d'entérocoques cliniques résistants à la vancomycine par rapport à *E. faecium* (Werner *et al.*, 2008).

Dans une étude menée par Deshpande *et al.*, (2013), moins de 2% d'*E. faecalis* étaient résistants à vancomycine, alors que 52% des isolats d'*E. faecium* étaient résistants à la vancomycine.

La résistance acquise aux glycopeptides est médiée par divers mécanismes (types *VanA / B / D / E / G / L*; cités précédemment (Tableau 15); les génotypes de résistance *vanA* et *vanB* sont de loin les plus répandus en Europe. Le réservoir de résistance de type *vanA* et *vanB* chez l'homme est *E. faecium*. Par conséquent, l'augmentation des taux d'ERV dans plusieurs pays européens sont dus à une prévalence croissante d'*E. faecium* résistants à la vancomycine (VREfm) (Werner *et al.*, 2008).

7. Recherche des gènes *VanA* et *VanB*

Afin de confirmer cette résistance, des réactions d'amplification par PCR ont été réalisées chez les deux souches d'*E. faecium* isolées de liquide de dialyse et d'hémoculture, ce qui a permis de confirmer la présence du gène *VanA* et l'absence du gène *VanB* (Figure 21).

Ce résultat est en accord avec celui enregistré au Maroc confirmant la présence exclusive du gène *VanA* chez 21 souches d'Entérocoques quel que soit leur origine communautaire ou hospitalière (Hannaoui *et al.*, 2016). Un résultat similaire a été rapporté en Tunisie en (2014) chez 13 souches d'*E. faecium* exprimant l'origine de la résistance à la vancomycine par la caractérisation du gène *VanA* (Elhani *et al.*, 2014).

En Amérique du Nord, en Europe, en Asie et dans les pays d'Extrême-Orient, le *vanA* est le type de résistance phénotypique et génotypique aux glycopeptides le plus répandu parmi les isolats d'*E. faecium* (EARSS, 2001).

Bien que la présence du gène *VanA* soit synonyme d'une résistance à la vancomycine, certains auteurs ont identifié une discordance entre le génotype et le phénotype en caractérisant des souches à la fois sensibles à la vancomycine tout en hébergeant le gène *VanA*, la présence discrète de ce support génétique pourrait être à l'origine d'une diminution de vigilance vis-à-vis de ces souches, permettant ainsi une diffusion silencieuse de ce gène (Szakacs *et al.*, 2014).

Des souches d'*E. faecium* phénotype *VanB*-génotype *vanA* présentant une sensibilité à la teicoplanine ont été rapportés dans plusieurs pays du monde comme le Brésil (Zanella *et al.*, 2006) ; Des rapports similaires ont également été signalées dans certaines régions d'Asie de l'Est comme la Chine, le Japon et la Corée du Sud (Gu *et al.*, 2009).

Park et al., en (2008), ont signalé une émergence dans un hôpital de soins en Corée du Sud de six isolats d'*E. faecium* phénotype *VanB*-génotype *vanA* avec une expression hétérogène de la résistance à la teicoplanine. Le mécanisme responsable d'une telle hétérorésistance à la teicoplanine dans les isolats d'*Enterococcus* portant le gène *vanA* n'est pas encore clair.

Certains auteurs suggèrent qu'une telle hétérogénéité est due à la présence de mutations, soit dans le groupe de gènes *vanA*, soit dans l'élément régulateur *vanS* (**Lee et al., 2004**).

Dans une étude menée en Corée du Sud, la présence d'une séquence d'insertion IS1216V dans la région codante du gène *vanS* a été suggérée comme mécanisme possible de cette hétérogénéité (**Park et al., 2008**).

Ces derniers sont la résultante de différents réarrangements. Ce polymorphisme génétique a été signalé par plusieurs auteurs. En effet, vingt-cinq variantes *VanA* ont été identifiées dans vingt-sept pays différents, et bien que le variant contenant la séquence d'insertion IS 1216 dans le couple *VanX-VanY* et *VanS-VanH* demeure le plus prédominant dans le monde, d'autres variants ont vu leur apparition en Amérique et en Europe portant la séquence IS 1251 dans la région *VanS* et *VanH*. Ces deux séquences d'insertion, en l'occurrence, IS 1216 et IS 1251 ont pu coexister ensembles dans les régions *VanS-VanH*, *VanX-VanY* chez deux isolats en Amériques du Sud (**Freitas et al., 2016**).

En Arabie Saoudite, deux nouvelles lignées ont été caractérisées par **Khan et al., en (2008)**, ayant respectivement IS 1485 dans la région ORf1 (lignée III) et IS 1216 entre *VanS* et *VanH* (lignée IV). Au Portugal, vingt-quatre variants du transposon Tn 1546 ont été identifiées (**Novais et al., 2008**), cette variabilité ne cesse de s'étendre pour toucher des pays comme la Pologne où 26 nouveaux variants ont été signalés (**Wardal et al., 2017**).

Le gène *vanA* a été retrouvé également sur une portion du chromosome dans une souche d'*E. faecium* isolée en Allemagne (**Freitas et al., 2016**), ce qui suggère que la limite entre le chromosome et le plasmide est éphémère et que par conséquent la résistance à la vancomycine pourrait être disséminée dans les deux sens : vertical et horizontal (**Handwerger et al., 1995**).

Plusieurs plasmides ont été signalés comme porteur du transposon Tn1546 ; la première souche d'*Enterococcus faecium* présentant une résistance à la vancomycine découverte en France en 1986, portait le plasmide pIP816, qui s'est propagé ces dernières années pour atteindre l'Europe et les Etats Unis avec une fréquence croissante (**Sletvold et al., 2010**).

Une autre étude réalisée en Pologne a révélé la présence de mégaplasmines appartenant à différentes familles : Inc18-, pRUM- et pMG1 / Plasmides de type pHT Illustrant une grande flexibilité génétique, et permettant à d'autres microorganismes de compléter leur patrimoine génétique en acquérant la résistance à la vancomycine (Wardal *et al.*, 2017).

Ce transfert pourrait être intraspécifique (Jung *et al.*, 2014), comme il peut être interspécifique en touchant des espèces comme *E. faecalis* (Bourgeois-Nicolaos *et al.*, 2006), *S. aureus* (Rebiahi *et al.*, 2011) ou bien *Clostridium difficile* (Sletvold *et al.*, 2010).

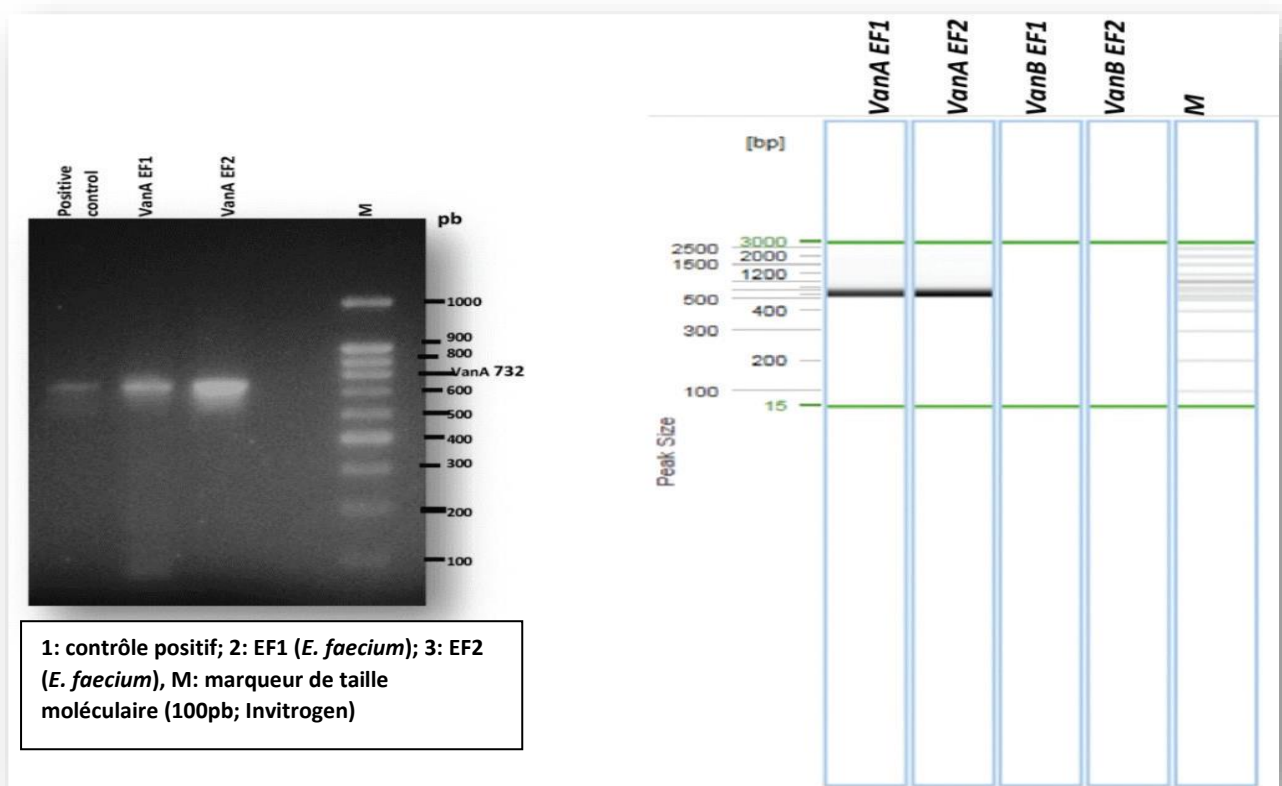


Figure 21. Analyse par amplification en chaine (PCR) de l'ADN des deux souches d'*Enterococcus faecium* et recherche des gènes *Van* selon les deux techniques utilisées

8. Résultat du séquençage des gènes *Van* des ADN des souches *d'Enterococcus faecium*

Suite à la confirmation des gènes *VanA* chez deux souches *d'Enterococcus faecium* (EF1 et EF2), un séquençage a été réalisé à la fois dans le laboratoire GenoScreen (Lille, France), et dans le laboratoire du Professeur Antonio Gálvez (Département des sciences de la santé, Faculté des sciences expérimentales, Université de Jaén, 23071 Jaén, Espagne).

La séquence obtenue dans ce travail correspondant au gène *VanA* a été enregistrée le 28/07/2018 (Annexe IV) sous le le numéro d'accès **GenBank : MH414912.1 (*Enterococcus faecium* strain EF8RM D-alanine : D-lactate ligase (*vanA*) gene, partial cds) (Figure 22)**, elle est composée de 613 pb, il s'agit d'une molécule d'ADN linéaire à l'origine d'une protéine enzymatique portant le nombre EC [6.3.2.4](#), dont la traduction exprime la séquence suivante de 204 acides aminés :

```
>AXF50411.1 D-alanine: D-lactate ligase, partial [Enterococcus faecium]
AFSALHGKSGEDGSIQGLFELSGIPFVGCDIQSSAICMDKSLTYIVAKNAGIATPAFWVINKDDRPVAAT
FTYPVFEVKPARSGSSFVGVKVNSADELDYAIESARQYDSKILIEQAVSGCEVGC AVLGNSAALAVGEVDQ
IRLQYGI FRIHQEVEPEKGS ENAVITVPADLSAEERGRIQETAKKIYKALGCRGLARVDMFLQD
```

Après comparaison aux données disponibles dans NCBI (GenBank), notre séquence présente des homologies significatives de (100%) avec *Enterococcus faecium* représentée par la souche référencée CU710 portant le numéro d'accès (GenBank : MG460318.1) du gène *VanA* D-alanine-D-lactate ligase, celle-ci se positionne exactement entre 224 et 905 pb.

Une autre séquence similaire retrouvée à New Delhi (Inde) isolée des urines appelée *Enterococcus faecalis* strain L *VanA* ligase gene, partial cds (numéro d'accès MK452235.1) composée de 675 paires de base est aussi homologue de notre séquence à 100%.

Ces séquences retrouvées dans plusieurs pays augurent soit, d'un transfert génétique interspécifique, soit d'une circulation de la même souche clonale à travers le monde, ou d'une évolution identique qui caractérise cette espèce dans plusieurs pays.

Il faut tout de même signaler que l'opéron *VanA* est porté sur des transposons de type Tn1546, qui présentent un degré élevé d'hétérogénéité. Des mutations ponctuelles, des délétions et diverses séquences d'insertion ont toutes été associées à des transposons de type Tn1546 (Freitas *et al.*, 2016).

Le Tn1546 se trouve sur les plasmides de type pRUM (prédominant aux États-Unis) et les plasmides Inc18 (prédominant en Europe). Cependant, beaucoup restent inconnus et l'épidémiologie moléculaire des plasmides contenant *VanA* peut différer significativement entre les régions.

En plus de contribuer à la propagation de la résistance à la vancomycine, les plasmides Inc18 et de type pRUM peuvent également héberger des gènes de résistance pour plusieurs autres antibiotiques, Ce qui cristallise de manière significative le phénomène de multirésistance (**Partridge et al., 2018**).

L'ensemble des souches séquencées sont des isolats cliniques humains, avec une majorité d'isolats d'Europe et d'Amérique du Nord, mais ceux-ci ne représentent que la partie visible de l'iceberg, formant qu'une petite partie de la population totale d'*E. faecium* (**Palmer et al., 2014**). Une comparaison de 100 gènes de base dans tous les génomes disponibles d'*E. faecium* a initialement révélé que la plupart des gènes se divisaient en 2 groupes, différant de 3,5 à 4,2% de divergence nucléotidique (**Galloway-Peña et al., 2012**).

Les deux groupes distincts et très divergents sur le plan génétique peuvent être regroupés par origine : le groupe A (associé à l'hôpital ; constitué principalement d'isolats cliniques communs et de certains isolats d'origine communautaire) et le groupe B (associé à la communauté ; consistant presque entièrement en isolats communautaires humains et animaux. La majorité des souches ERVfm hospitalières font partie du complexe clonal 17 (CC17), et les ST courantes au sein du CC17 comprennent ST17, ST18, ST80 et ST203 (**Gorrie et al., 2019**).

Des études génomiques sur les populations mondiales d'*E. faecium*, y compris ERVfm, ont révélé que dans certains cas, des relations génétiques étroites existent entre les isolats de *vanB* VREfm et *E. faecium* sensible à la vancomycine (ESV) provenant des mêmes institutions, suggérant une possible génération fréquente de nouveaux clones *vanB* ERVfm au sein d'isolats sensibles, tandis que d'autres études indiquent une propagation intra-régionale et inter-régionale fréquente des clones d'ERVfm (**Gorrie et al., 2019**).

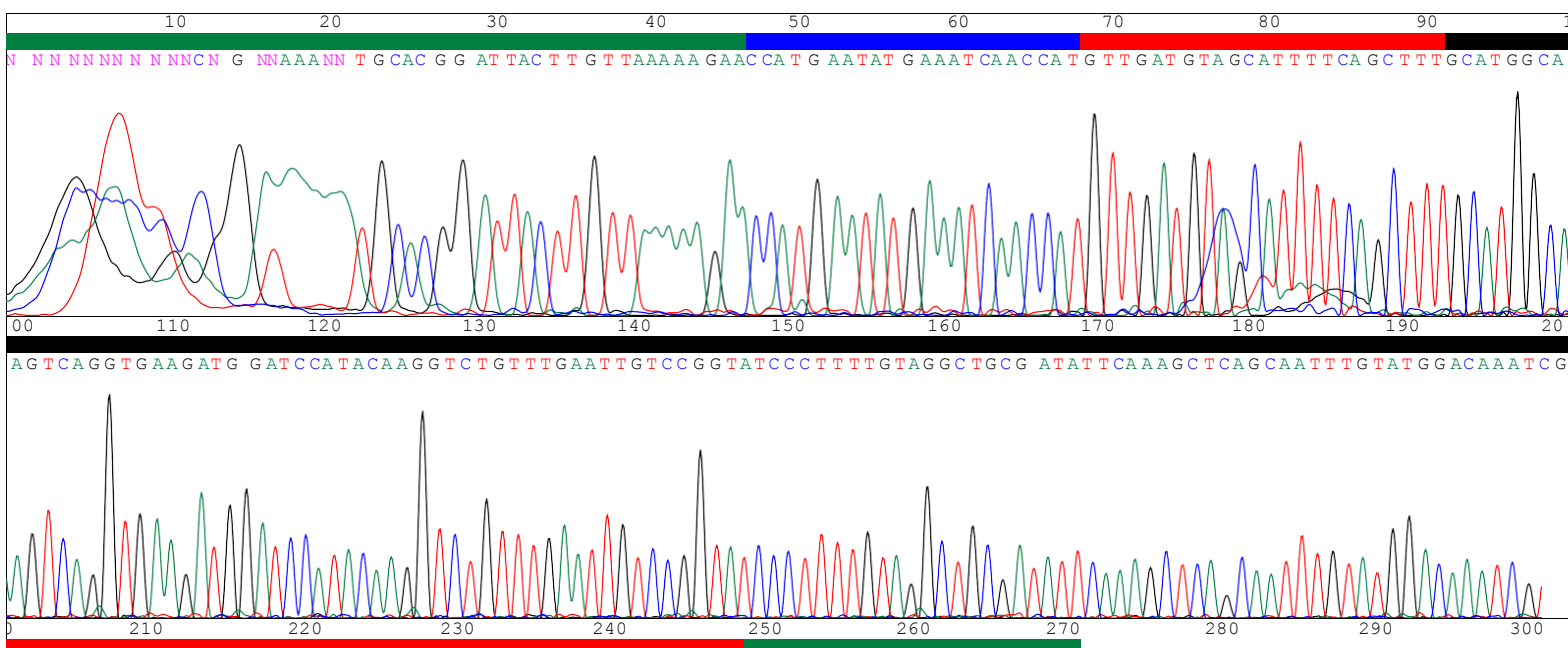
Le « *Whole genome sequencing* : WGS » a révélé que le transfert horizontal de gènes, impliquant des plasmides, des prophages, des îlots génomiques, une recombinaison homologe et la cassette chromosomique d'entérocoque, est un moteur important de la diversité et de l'évolution adaptative du génome dynamique d'*E. faecium* (**Sivertsen et al., 2018**). Le séquençage complet des génomes ERVfm a révélé un grand nombre de ces éléments accessoires, ainsi que de nombreuses séquences d'insertion dans les génomes du groupe A (ERVfm).

La capacité d'*E. faecium* à acquérir de l'ADN étranger a joué un rôle central dans l'évolution de la résistance aux antibiotiques et de l'adaptation à l'hôpital chez cette espèce. Au niveau du génome central, des régions chromosomiques ont été identifiées qui se recombinent principalement dans des souches spécifiques d'*E. faecium* hospitalières ; ces régions comprennent celles impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire et dans l'absorption et le métabolisme des glucides [(**Van Schaik et al., 2010**) ; (**Sivertsen et al., 2018**)].

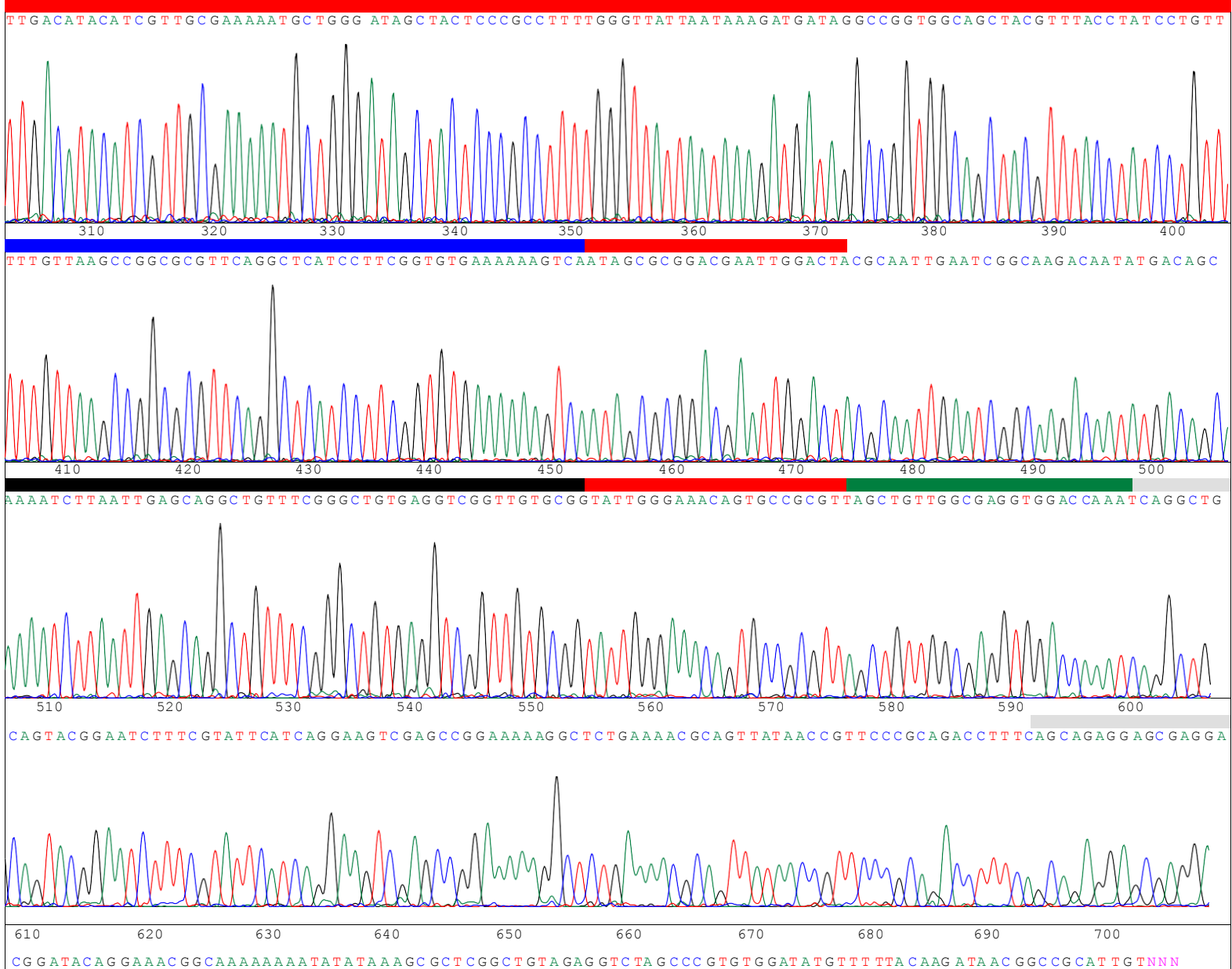
L'utilisation du WGS fournit maintenant de nouvelles informations importantes sur les mécanismes génétiques sous-jacents à l'évolution et à l'adaptation de ce pathogène nosocomial. Les études mettant en œuvre le WGS ont permis de définir à la fois la propagation locale et à grande échelle des clones, ainsi que d'élucider les aspects génomiques liés à la spécificité de l'hôte, à la résistance et à l'adaptation à l'hôpital. Ces études ont également mis en évidence l'importance d'*E. faecium* sensible à la vancomycine (ESV) en tant que pathogène nosocomial qui soutient l'évolution et la propagation de l'ERVfm. Elles ont également aidé à identifier les facteurs de risque, les adaptations et les mécanismes de transmission et d'échec du traitement qui doivent maintenant être exploités pour informer et orienter les efforts visant à limiter l'évolution et la propagation de l'ERVfm (Gorrie *et al.*, 2019).

```
>MH414912.1 Enterococcus faecium strain EF8RM D-alanine: D-lactate
ligase (vanA) gene, partial cds
GCATTTTCAGCTTTGCATGGCAAGTCAGGTGAAGATGGATCCATACAAGGTCTGTTTGAATTGTCGGGTA
TCCCTTTTGTAGGCTGCGATATTCAAAGCTCAGCAATTTGTATGGACAAATCGTTGACATACATCGTTGC
GAAAAATGCTGGGATAGCTACTCCCGCCTTTTGGGTTATTAATAAAGATGATAGGCCGGTGGCAGCTACG
TTTACCTATCCTGTTTTTGTAAAGCCGGCGCGTTCAGGCTCATCCTTCGGTGTGAAAAAAGTCAATAGCG
CGGACGAATTGGACTACGCAATTGAATCGGCAAGACAATATGACAGCAAAATCTTAATTGAGCAGGCTGT
TTCGGGCTGTGAGGTCGGTTGTGCGGTATTGGGAAACAGTGCCGCGTTAGCTGTTGGCGAGGTGGACCAA
ATCAGGCTGCAGTACGGAATCTTTCGTATTTCATCAGGAAGTCGAGCCGGAAAAAGGCTCTGAAAACGCAG
TTATAACCGTTCCCGCAGACCTTTCAGCAGAGGAGCGAGGACGGATACAGGAAACGGCAAAAAAATATA
TAAAGCGCTCGGCTGTAGAGGTCTAGCCCGTGTGGATATGTTTTTACAAGATA
```

Figure 22: Séquence de la souche EF1. *VanA* soumise à Genbank



RESULTATS ET DISCUSSION



File: 8DZ.VANA.ab1
Lane: 84 Base spacing: 14.54

Run Ended: Jul 27, 2017,
16:36:28
706 bases in 8528 scans

Signal G : 542 A:444 T:714
C:481
Page 1 of 1

Sample: 8DZ.VANA

CONCLUSION

CONCLUSION

Le présent travail confirme l'état de multirésistance des deux espèces *d'E. faecalis* et *d'E. faecium* touchant plusieurs familles d'antibiotiques comme les β -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones et les glycopeptides. Ce phénomène semble être lié à l'utilisation d'antibiotiques spécifiques à chaque service induisant une adaptation grandissante à ces drogues qui ne cessera probablement pas de s'étendre.

Aujourd'hui, nous assistons à l'émergence en Algérie, de deux nouvelles souches *d'E. faecium* qui se sont distinguées par leur résistance à la vancomycine avec des CMI > 256 $\mu\text{g/mL}$. A l'origine de cette résistance, le gène *vanA* a été caractérisé et séquencé ; la séquence obtenue a été introduite dans la base de données du Genbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) sous le numéro d'accès MH414912 (*Enterococcus faecium* souche EF8RM D-alanine: gène D-lactate ligase (*vanA*), cds partiel). Cette même séquence a été retrouvée dans d'autres pays, ce qui pourrait augurer soit d'une circulation de la même souche clonale à travers le monde, soit d'une même évolution qui caractérise cette espèce dans plusieurs pays.

Cette résistance constitue un réservoir potentiel de gènes de résistance comme le gène *VanA* qui pourrait facilement accéder à d'autres espèces, limitant ainsi considérablement l'éventail de molécules possédant une activité stable et durable. Cette faculté extraordinaire d'adaptabilité et de pathogénicité pourrait être contrôlée par certaines mesures de prévention :

- Une utilisation prudente des antibiotiques, en particulier la vancomycine (réduire l'émergence des ERV) et le métronidazole (réduire la croissance des ERV).
- Mise en place de mesures de contrôle des infections pour prévenir la transmission de l'ERV, y compris les précautions d'isolement de patients positifs à l'ERV.
- Surveillance et contrôle du transport ERV dans les hôpitaux et dans les services.
- Cultures de surveillance active pour détecter le portage des ERV chez les patients dans des unités à haut risque et les patients transférés des pays étrangers à forte prévalence d'ERV.
- Acquérir des connaissances sur l'épidémiologie locale des ERV et les CMI de vancomycine dans son propre hôpital.
- Détection précoce et précise et signalement des ERV par laboratoires de microbiologie clinique.
- Conscience et surveillance continues pour détecter la résistance aux nouveaux antibiotiques et désinfectants.

- Programmes de formation pour le personnel hospitalier, y compris l'hygiène des mains pour empêcher une nouvelle transmission.
- Contrôle de l'hygiène hospitalière au niveau des différents services.
- Et enfin, une poursuite dans la recherche et du développement de nouveaux antimicrobiens cibles serait souhaitable pour le traitement d'*E. faecium* multirésistant.

Les réarrangements génétiques permanents semblent être un frein à la lumière sur l'évolution de la résistance. Afin de comprendre comment ce type de souche circule en Afrique, il serait intéressant d'explorer le polymorphisme génétique afin d'établir une stratégie à la fois efficace et adaptée à chaque situation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB (2000).** Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 37: 127-37.
2. **Abt MC, Buffie CG, Susac B, Becattini S, Carter RA, Leiner I, Keith JW, Artis D, Osborne LC, Pamer EG. (2016).** TLR-7 activation enhances IL-22-mediated colonization resistance against vancomycin-resistant *enterococcus*. *Sci Transl Med*; 8:327 ra 25; PMID: 26912904; doi.org/10.1126/scitranslmed.aad6663
3. **Aggoune N, Chabani A, Tiouit D, Naim M, Rahal K (2008).** Premier cas d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine en Algérie. Vol. 38, *Medecine et Maladies Infectieuses.* p. 557–8.
4. **Agudelo Higueta NI, Huycke MM (2014).** Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; PMID: 24649504.
5. **Aguilar-Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain J, Campos D, Thonart P. (2012).** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16: (1), 67-76.
6. **Ahmed MO, Baptiste KE (2018).** Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance*; 24 (5), 590-606.
7. **Aladarose BE, Said HS, and Abdelmegeed ES (2019).** Incidence of Virulence Determinants Among Enterococcal Clinical Isolates in Egypt and Its Association with Biofilm Formation. *Microbial Drug Resistance.* 00 : 00, 1-20. DOI: 10.1089/mdr.2018.0320
8. **Alotaibi FE, Bukhari EE (2017).** Emergence of Vancomycin-resistant Enterococci at a Teaching Hospital, Saudi Arabia. *Chin Med J.* 130:340-6.
9. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
10. **Anderson DJ, Podgorny K, Berrios-Torres SI, Bratzler DW, Dellinger EP, Greene L, Nyquist AC, Saiman L, Yokoe DS, and Maragakis LL, et al (2014).** Strategies to prevent surgical site infections in acute care hospitals: 2014 update. *Infect Control Hospital Epidemiol*; 35 Suppl 2: S66-88; PMID: 25376070; http://dx.doi.org/10.1017/S0899823X00193869.
11. **Andrewes F. W., Horder T. J (1906).** A study of streptococci pathogenic for man. *The Lancet.* 168 (4335):852–855.
12. **Andrews J, Ashby J, Jevons G, Marshall T, Lines N, et al (2000).** A comparison of antimicrobial resistance rates in Gram-positive pathogens isolated in the UK from October 1996 to January 1997 and October 1997 to January 1998. *J Antimicrob Chemother*; 45: 285–293.
13. **Arduino RC, Jacques-Palaz K, Murray BE, Rakita RM (1994).** Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis. *Infect Immun*; 62: 5587–5594.
14. **Arduino RC, Murray BE, Rakita RM (1994).** Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci. *Infect Immun*: 62: 987–993.
15. **Arias CA, and Murray BE (2012).** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* ; 10(4) : 266–278. doi: 10.1038/nrmicro2761.
16. **Arias CA, Contreras GA, Murray BE (2010).** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. Vol. 16, *Clinical Microbiology and Infection.* p. 555–62.
17. **Arsène S, Leclercq R (2007).** Role of a qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:3254–8

B

18. **Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. (2015).** Infective endocarditis in adults: Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: A scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association, *Circulation*. 132: 1435-1486.
19. **Barna JCJ, Williams DH. (1984).** The structure and mode of action of glycopeptides antibiotics of the vancomycin group. *Annu Rev Microbiol*. 38: 339-357.
20. **Begashaw TA. (2019).** Vancomycin Resistance *Enterococcus* in Africa in One health approach: A systematic review and meta-analysis. *Hawassa University College of Medicine and Health Sciences*; DOI: 10.21203/rs.2.16259/v1.
21. **Benammar S, Pantel A, Aujoulat F, Benmehidi M, Courcol R, Lavigne JP, et al. (2018).** First molecular characterization of related cases of healthcare-associated infections involving multidrug-resistant *enterococcus faecium vana* in Algeria. *Infect Drug Resist*. 11:1483–90.
22. **Bentorcha F, De Cespédès G, Horaud T. (1991).** Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 35:808–12.
23. **Bhatt MP, Patel A, Sahni BAK, Praharaj SC, Grover CN, Chaudhari SC, Das NK, Kulkarni M. (2014).** Emergence of multidrug resistant enterococci at a tertiary care centre. *Medical journal armed forces India*. xxx 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.08.007>.
24. **Bischoff S, Walter T, Gerigk M, Ebert M and Vogelmann R. (2018).** Empiric antibiotic therapy in urinary tract infection in patients with risk factors for antibiotic resistance in a German emergency department. *BMC Infectious Diseases* 18:56 DOI 10.1186/s12879-018-2960-9.
25. **Bonazzetti C, Morena V, Giacomelli A, Oreni L, Casalini G, Galimberti RL, and Bolis M. (2021).** Unexpectedly High Frequency of Enterococcal Bloodstream Infections in Coronavirus Disease 2019 Patients Admitted to an Italian ICU: An Observational Study. *Critical Care Medicine*. 49 (1), e31-e40. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004748.
26. **Booth MC, Bogie CP, Sahl HG, Siezen RJ, Hatter KL, Gilmore MS. (1996).** Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol*. 21: 1175–1184.
27. **Bourgeois-Nicolaos N, Moubareck C, Mangeney N, Butel MJ, Doucet-Populaire F. (2006).** Comparative study of vanA gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice. *FEMS Microbiol Lett*. 254(1) :27–33.
28. **Bourgogne A, Garsin DA, Qin X et al. (2008).** Large-scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol*. 9: R110. 17.
29. **Boushab MB, Savadogo M, Ould Cheikh Melainine ML, Darnycka BM, Traore AM, Fall-Malick FZ. (2019).** Evaluation des facteurs de risque susceptibles de produire des infections nosocomiales chez le sujet âgé hospitalisé dans les services de médecine interne et maladie infectieuse du centre hospitalier de Kiffa Mauritanie. *Rev Mali Infect Microbiol*, Tome 14, p 22-26.
30. **Brossard H, Leyral G, Terry O. (2002).** Activités technologiques en microbiologie 2 – Bactériologie systématique. CNDP RESEAU. ISSN: 1254-731X. ISBN 2-86617-325-2, p35.
31. **Buetti N, Atkinson A, Marschall J, Kronenberg A (2017).** Incidence of bloodstream infections: a nationwide surveillance of acute care hospitals in Switzerland 2008–2014. *BMJ Open* 7, e013665. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013665.

C

32. **Campos CA, Rodriguez O, Calo-Mata P, Prado M, Barros-Velazquez J. (2006).** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res Int* 39. 356–364.
33. **Candel FJ, Matesanz David M, Barberán J. (2019).** New perspectives for reassessing fosfomycin: applicability in current clinical practice. *Rev Esp Quimioter*; 32(Suppl 1):1–7.
34. **Cattoir V, Leclercq R. (2013).** Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant Enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother*. 68:731-42.

35. Celik S, Cakirlar FK, Torun MM. (2014). Presence of vancomycin, aminoglycosides, and erythromycin resistance genes in *Enterococci* isolated from clinical samples in Turkey. *Clin Lab.* 60 (11):1801–6.
36. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 13(4):686-707. doi: 10.1128/cmr.13.4.686-707.2000.
37. Chopra I, Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:232–60.
38. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ. (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 2474–2477.
39. Chow JW (2000). Aminoglycoside Resistance in Enterococci. Source: *Clinical Infectious Diseases.* 31 (2): pp. 586-589 Published by Oxford University Press.
40. Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. (2010). Acceleration of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation by Aggregation Substance Expression in an Ex Vivo Model of Cardiac Valve Colonization. *PLoS One.* 5:e15798.
41. Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, Coque TM, Francia MV, Hayes F. (2014). Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. p 309–420. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (ed), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection.* Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
42. Clewell DB. (1981). Plasmids, Drug Resistance, and Gene Transfer in the Genus *Streptococcus*. *Microbiological Reviews.* 45(3), p. 409-436. Doi: 0146-0749/81/030409-28\$02.00/0.
43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015). M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; *Twenty-Fifth Informational Supplement.* 1-240 p.
44. Coburn PS, Gilmore MS. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol.* 5: 661–669. 11.
45. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommendations (2018). V.2.0 Septembre 2018.
46. Contreras GA, Munita JM, Cesar A. Arias. (2019). Novel Strategies for the Management of Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *Current Infectious Disease Reports.* 21: 22. doi.org/10.1007/s11908-019-0680-y.
47. Costa Y, Galimand M, Leclercq R, et al. (1993). Characterization of the chromosomal aac (6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1896–903.
48. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322.
49. Coudron PE, Markowitz SM, Wong ES. (1992). Isolation of a betalactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:1125–6.
50. Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J. (1985). L'antibiogramme. Paris : Mpc vidéo, pp. 199–218.
51. Cupáková S, Pospířilová M, Kolářková I, Karpířková R. (2005). Genus-specific identification of enterococci by PCR method. *Acta Vet BRNO.* 74:633-37.

D

52. Darvishi M, Forootan M, Nazer MR, Karimi E, Noori M. (2020). Nosocomial Infections, Challenges and Threats: A Review Article. *Iran J Med Microbiol.* 14 (2):162 181
53. Data from the ECDC Surveillance Atlas- Antimicrobial resistance http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/table_reports.aspx. Accessed 8 Sep 2017.
54. De Fatima Silva Lopes M, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Crespo MT. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 191–198.
55. De Kwaadsteniet M, Todorov S, Knoetze H, and Dicks L. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 433–444. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.021

56. **Deshpande VR, Karmarkar MG, Mehta PR (2013)**. Prevalence of multidrug resistant enterococci in a tertiary care hospital in Mumbai, India. *J Infect Dev Ctries*. 7(2):155-158.
57. **Diekema DJ, Jones RN (2001)**. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*; 358: 1975-1982.
58. **Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ (2002)**. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*; 28:689-693.
59. **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(9):656-662. doi:10.3109/00365548.2012.673232.
60. **Dijkmans AC, Zacarias NVO, Burggraaf J et al. (2017)**. Fosfomycin: pharmacological, clinical and future perspectives. *Antibiotics*; 6: 24. DOI: 10.3390/antibiotics6040024.
61. **Domann E, Hain T, Ghai R et al. (2007)**. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int J Med Microbiol*; 297: 533–539. 16.
62. **Domig K J, Mayer H K, Kneifel W. (2003)**. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.*: 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. 88 (2): 147-164.

E

63. **EARSS (2001)**. Annual report. www.earss.rivm.nl. European Antimicrobial Resistance Surveillance System, Bilthoven, Holland, 61-70.
64. **Elhani D, Klibi N, Dziri R, Ben Hassan M, Asli MS, Ben Said L, Mahjoub A, Ben Slama K, Jemli B, Bellaj R, Barguellig F and Torres C (2014)**. *VanA*-containing *E. faecium* isolates of clonal complex CC17 in clinical and environmental samples in a Tunisian hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.011.
65. **Eliakim-Raz N, Babitch T, Shaw E, Addy I, Wiegand I, Vank C, Torre-Vallejo L, et al. (2019)**. Risk Factors for Treatment Failure and Mortality Among Hospitalized Patients With Complicated Urinary Tract Infection: A Multicenter Retrospective Cohort Study (RESCUING Study Group). *Clinical Infectious Diseases*. 68(1):29–36.
66. **European Centre for Disease Prevention and Control (2013)**. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. ECDC, Stockholm. doi:10.2900/86011
67. **European Centre for Disease Prevention Control (ECDC)**. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.

F

68. **Falcone M, Russo A, Iraci F, Carfagna P, Goldoni P, Vullo V. (2016)**. Risk Factors and Outcomes for Bloodstream Infections Secondary to Clostridium difficile Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 60:252–257. doi:10.1128/AAC.01927-15.
69. **Farina C, Russello G, Chinello P, Pasticci MB, Raglio A, Ravasio V and al. (2011)**. In vitro Activity Effects of Twelve Antibiotics Alone and in Association against Twenty-Seven Enterococcus faecalis Strains Isolated from Italian Patients with Infective Endocarditis: High in vitro Synergistic Effect of the Association Ceftriaxone-Fosfomycin. *Chemotherapy*. 57:426–433. DOI: 10.1159/000330458.
70. **Fernandez-Guerrero ML, Herrero L, Bellver M, Gadea I, Roblas RF, de Gorgolas M. (2002)**. Nosocomial enterococcal endocarditis: a serious hazard for hospitalized patients with enterococcal bacteraemia. *J Intern Med*. 252: 510–515.
71. **Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. (2019)**. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectrum*. 7(4): GPP3-0053-2018. Doi:10.1128/microbiolspec. GPP3-0053-2018.
72. **Flahaut S, Frere J, Boutibonnes P, Auffray Y. (1996)**. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol*. 62: 2416–2420.
73. **Foulquie MMR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst, L. (2006)**. The role and application of *Enterococci* in food and health. *Int J Food Microbiol*; 106, 1–24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026

74. Fox J (2000). DOE joint genome institute feat: one-day sequencing of *E. faecium*. *ASM News*; 66: 388-18.
75. Franz CMAP, Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., and Galvez A. (2011). “Enterococci as probiotics and their implications in food safety” *International Journal of Food Microbiology*. 151 (2) pp. 125–140.
76. Freitas AR, Tedim AP, Francia M V., Jensen LB, Novais C, Peixe L, et al. (2016). Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *J Antimicrob Chemother*. 71(12):3351–66.
77. Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, et al. (2001). Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) Project; The National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Hospitals. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 US adult intensive care units. *Ann Intern Med*. 135(3):175–183.

G

78. Galimand M, Schmitt E, Panvert M, et al. (2011). Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA*. 17:251–62.
79. Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE. (2012). Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One*; 7:e30187.
80. García-Solache M, Rice LB. (2019). The *enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev* 32: e00058-18. doi.org/10.1128/CMR.00058-18.
81. Garneau S, Martin NI and Vederas JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 84(5-6): p. 577-92.
82. Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. (2014). Antimicrobial Resistance in *Enterococci*. *J Infect Dis Ther* 2: 150. doi: 10.4172/2332-0877.1000150.
83. Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, and Murray BE. (2014). Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; PMID: 24649504.
84. Gastmeier P, Schroder C, Behnke M, Meyer E and Geffers C. (2014). Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 69: 1660–1664 doi:10.1093/jac/dku035.
85. Gawryszewska I, Żabicka D, Bojarska K, Malinowska K, Hryniewicz W, Sadowy E. (2016). Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 35:847–856 DOI 10.1007/s10096-016-2607-y.
86. Ghanem G, Hachem R, Jiang Y, Chemaly RF, Raad I. (2007). Outcomes for and risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 28(9):1054–1059.
87. Gilmore M.S., Lebreton F, and Schaik W. (2014). Genomic Transition of Enterococci from Gut Commensals to Leading Causes of Multidrug-resistant Hospital Infection in the Antibiotic Era. *Curr Opin Microbiol*. 16(1): 10–16. doi:10.1016/j.mib.2013.01.006.
88. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC. (1990). An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus Portenier et al. faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infect Immun*. 58: 3914–3923.
89. Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, Thornsberry C, Jarvis WR, Tenover FC. (1992). Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *J Clin Microbiol*. 30(9):2373–2378.
90. Gorrie C, Higgs C, Carter G, Stinear T.P, Howden B. (2019). Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microbial Genomics*. 5: 1-8. DOI 10.1099/mgen.0.000283
91. Gouba N, Yimagou EK, Hassani Y, Drancourt M, Fellag M, Mbogning Fonkou MD. (2020). *Enterococcus burkinafasensis* sp. nov. Isolated from human gut microbiota. *New Microbes New Infect* ; 36:100702.

92. Gu L, Cao B, Liu Y, Guo P, Song S, Li R. (2009). A new Tn1546 type of *VanB* phenotype-*vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 63:70–5.
93. Guiton PS, Hung CS, Hancock LE, Caparon MG, Hultgren SJ. (2010). Enterococcal biofilm formation and virulence in an optimized murine model of foreign body-associated urinary tract infections. *Infection and immunity.* 78(10):4166-4175.

H

94. Haas W, Gilmore MS. (1999). Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Med Microbiol Immunol.* 187:183-190.
95. Hackbarth CJ, Chambers HF. (1993). *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1144–9.
96. Hamidi M, Ammari H, Ghaffor M, Benamrouche N, Tali-Maamar H, Tala-Khir F, et al. (2013). Emergence of glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* in Algeria: A case report. *Ann Biol Clin (Paris).* 71(1):104–6.
97. Hanchi H, Mottawea W, Sebei K and Hammami R. (2018). The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Front. Microbiol.* 9:1791. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791.
98. Handwerker S, Skoble J. (1995). Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(11):2446–53.
99. Hannaoui I, Barguigua A, Serray B, El Mdaghri N, Timinouni M, Ait Chaoui A, et al. (2016). Intestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci in a community setting in Casablanca, Morocco. *J Glob Antimicrob Resist.*;6:84–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.03.008>
100. Hawkey P. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother.* 51(Suppl 1):29–35.
101. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 29:996-1011; PMID:18947320; <http://dx.doi.org/10.1086/591861>.
102. Hollenbeck BL, Rice LB. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. *Virulence.* 3: 421-569.
103. Hooton TM. (2012). Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *The New England journal of medicine* 366(11):1028-1037.
104. Hu F, Zhu D, Wang F, and Wang M. (2018). Current Status and Trends of Antibacterial Resistance in China. *CID*; 67(S2):S128–34.
105. Huycke MM, Abrams V, Moore DR. (2002). *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis.* 23: 529–536.

J

106. Jabbari Shiadeh SM., Pormohammad A, Hashemi A, Lak P. (2019). Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist.* 12 2713-2725.
107. Jackson SS, Harris AD, Magder LS, Stafford KA, Johnson JK, Miller LG, et al. (2019). Bacterial burden is associated with increased transmission to health care workers from patients colonized with vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Am J Infect Control.* 47(1):13-7.
108. Jaglic Z, Vlkova H, Bardon J, Michu E, Cervinkova D, et al. (2012). Distribution, characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and *Enterococci* originating from livestock. *Zoon Publ Health*; 59: 202–211.
109. Jahansepas A, Aghazadeh M, Rezaee MA, Hasani A, Sharifi Y, Aghazadeh T and Mardaneh J. (2017). Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Various Clinical Infections:

- Detection of Their Drug Resistance and Virulence Determinants. *Microbial Drug Resistance*; 1-7. DOI: 10.1089/mdr.2017.0049
110. **Jensen LB, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. (1999).** Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett*; 170: 151-158.
111. **Ji G, Yin H, Chen Y. (2005).** Prevalence of and risk factors for non-compliance with glove utilization and hand hygiene among obstetrics and gynaecology workers in rural China. *Journal of Hospital Infection*. 59 (3), 235-241.
112. **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(3):3424–42.
113. **Joffin JN, Leyral G. (2001).** Microbiologie technique : 1 'Dictionnaire des techniques'. 3ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine,; 320 p.
114. **Johnson J. R., Clabots C., Hirt H., Waters C., Dunny G. (2004).** Enterococcal aggregation substance and binding substance are not major contributors to urinary tract colonization by *Enterococcus faecalis* in a mouse model of ascending unobstructed urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 72(4):2445–2448.
115. **Jomha MY, Hoda Y, and Hanafy H. (2014).** “Antimicrobial and Biocide Resistance of Bacteria in a Lebanese Tertiary Care Hospital.” *Journal of Global Antimicrobial Resistance*; 2 (4): 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.09.001>.
116. **Jones RN, Della-Latta P, Lee LV, Biedenbach DJ. (2002).** Linezolid resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 42: 137-139.
117. **Jung YH, Lee YS, Lee SY, Yoo JS, Yoo J Il, Kim HS, et al. (2014).** Structure and transfer of the vanA cluster in vanA-positive, vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium*, and its revertant mutant. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 80(2):148–50.
- ## K
118. **Kamga HG, Gueye MJS, Toukam M, Mbassi AA, Kengne M, Adiogo D. (2015).** Résistance aux antibiotiques des entérocoques responsables des infections urinaires au Centre Hospitalier et Universitaire et à l'Hôpital Central de Yaoundé (Cameroun). *African J Pathol Microbiol*. 4:1–5.
119. **Kampmeier S, Tönnies H, Correa-Martinez CL, Mellmann A and Schwierzeck V. (2020).** A nosocomial cluster of vancomycin resistant enterococci among COVID-19 patients in an intensive care unit. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 9 :154 <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00820-8>
120. **Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Nishino Y, et al. (1998).** Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 433-435.
121. **Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M. (2001).** Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Meth*. 47: 11–16.
122. **Karna A, Baral R, Khanal B. (2019).** Characterization of Clinical Isolates of *Enterococci* with Special Reference to Glycopeptide Susceptibility at a Tertiary Care Center of Eastern Nepal. *Hindawi International Journal of Microbiology*, Article ID 7936156, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2019/7936156>.
123. **Ke D, Picard Fj, Martineau F, Menard C, Roy Ph, Ouellette M, Bergeron Mg. (1999).** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*. 37(11):3497–3503.
124. **Khan MA, van der wal M, Farrell DJ, Cossins L, van Belkum A, Alaidan A, et al. (2008).** Analysis of VanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn 1546 lineage types. *J Antimicrob Chemother*. 62(2):279–83.
125. **Kiruthiga A, Padmavathy K. (2020).** Mechanisms of intrinsic antibiotic resistance in enterococci. *Drug Invention Today*; 13(6) : 896-902.
126. **Kollef MH, Zilberberg MD, Shorr AF, Vo L, Schein J, Micek ST, Kim M. (2011).** Epidemiology, microbiology and outcomes of healthcare-associated and community-acquired

- bacteremia: a multicenter cohort study. *Journal of Infection*. 62, 130–135. doi: 10.1016/j.jinf.2010.12.009.
127. **Komiyama EY, Lepesqueur LSS, Yassuda CG, Samaranayake LP, Parahitiyawa NB, Balducci I, et al. (2016).** *Enterococcus* Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PLoS One*. 11(9):e0163001. 12 (10): 1221–1236. doi:10.1586/14787210.2014.956092.
128. **Kramer A, Schwebke I, Kampf G. (2006).** How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces ? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 6:130.
129. **Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. (1992).** Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*. 60: 25–30.
130. **Kristich C, Little J. (2012).** Mutations in the β subunit of RNA polymerase alter intrinsic cephalosporin resistance in *Enterococci*. *Antimicrob Agents Chemother*. 56 :2022–7.
131. **Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. (2014).** Enterococcal Infection — Treatment and Antibiotic Resistance Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Enterococci*. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 6 : 1–31.
- L**
132. **Laplace JM, Boutibonnes P, Auffray Y. (1996).** Unusual resistance and acquired tolerance to cadmium chloride in *Enterococcus faecalis*. *J Basic Microbiol*. 36: 311–317.
133. **LeBlanc D (2006).** *Enterococcus*. *Prokaryotes*. 4: 175-204.
134. **Lebreton F, Manson A.L., Saavedra J.T., Straub T.J., Earl A. M., and Gilmore M.S. (2017).** Tracing the *Enterococci* from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell*. 169 (5): 849–861.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.04.027.
135. **Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. (2014).** *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
136. **Leclercq R. (1997).** *Enterococci* acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*; 24:S80-S84.
137. **Leclercq R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis*. 34, 482–492.
138. **Leclercq R, Derlot E, Duval J, and Courvalin P. (1988).** Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.*; 319: 157–161.
139. **Lee WG, Huh JY, Cho SR, Lim YA. (2004).** Reduction in glycopeptide resistance in vancomycin-resistant *enterococci* as a result of *vanA* cluster rearrangements. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:1379–81.
140. **Lee T, Pang S, Abraham S, Coombs GW. (2019).** Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J Glob Antimicrob Resist*. Mar; 16:36-47.
141. **Levitus M, Rewane A, Perera TB. (2020).** **Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)**. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>
142. **Leyral G et Joffin JN. (1998).** Microbiologie technique : 2 ‘Documentation technique’. 2ème Edition, Bordeaux: CRDP d’Aquitaine, 299 p.
143. **Li X, Xing J, Li B, Wang P, Liu J. (2012).** Use of “*tuf*” as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 11(1):31.
144. **Lin E, Bhusal Y, Horwitz D, Shelburne SA, 3rd, Trautner BW. (2012).** Overtreatment of enterococcal bacteriuria. *Archives of internal medicine*, 172(1):33-38.
145. **López MC, Del Campo TR, Zarazaga M. & Torres C. (2011).** Characterization of the Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Vancomycin-Resistant *Enterococci* of Different Origins. *Antimicrobial Chemotherapy*. 23 (2): 87-91. doi.org/10.1179/joc.2011.23.2.87.

M

146. **Makinen PL, Clewell DB, An F, Makinen KK. (1989).** Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metallo-endopeptidase (“gelatinase”) from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J. Biol. Chem.* 264:3325–3334.
147. **Makinen PL, Makinen KK. (1994).** The *Enterococcus faecalis* extra-cellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:981–985
148. **Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS. (2010).** Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* Pathogenicity Island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Nat Acad Sci USA.* 107:12269–12274.
149. **McDermott H, Skally M, O'Rourke J, Humphreys H, Fitzgerald-Hughes D. (2018).** Near-patient environmental contamination of an intensive care unit with Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) before and after the introduction of chlorhexidine bathing for patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 39(9):1131–1132.
150. **Medina M, and Castillo-Pino E. (2019).** An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther Adv Urol,* 11: 3–7; DOI: 10.1177/ 1756287219832172.
151. **Megran DW. (1992).** Enterococcal Endocarditis. *Clin Infect Dis.* 15 (1) :63-71 DOI : 10.1093/clinids/15.1.63
152. **Melese A, Genet C and Andualem T. (2020).** Prevalence of Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases.* 20 (124): 2-12. doi.org/10.1186/s12879-020-4833-2
153. **Migaud H, Senneville E, Gougeon F, Marchetti E, Amzallag M, Laffargue P. (2005).** Risque infectieux en chirurgie orthopédique. The risk of infection in orthopaedic surgery. *EMC-Rhumatologie Orthopédie.* (2): 151–172.
154. **Miller WR, Munita JM, and Arias CA. (2014).** Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12(10): 1221–1236. doi:10.1586/14787210.2014.956092.
155. **Mohamed JA, Huang DB. (2007).** Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology.* 56, 1581–1588. DOI 10.1099/jmm.0.47331-0.
156. **Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. (2000).** Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 13: 513–522.
157. **Munita JM, Arias CA, Murray BE. (2012).** Enterococcal endocarditis: Can we win the war? *Curr Infect Dis Rep;* 14:339–349.
158. **Murdoch DR, Corey RG, Hoen B, Miró M, Fowler VG, Bayer AS, et al. (2009).** Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century. The international collaboration on Endocarditis-prospective cohort study. *Arch Intern Med;* 169:463–473.

N

159. **Nagao M. (2013).** A multicenter analysis of epidemiology of the nosocomial bloodstream infections in Japanese university hospitals. *Clinical Microbiology and Infection.* 19, 852–858. doi: 10.1111/1469-0691.12083.
160. **Noskin GA, Siddiqui F, Stosor V, Kruzynski J, Peterson LR. (1999).** Successful treatment of persistent vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid and gentamicin. *Clin Infect Dis.* 28(3): 689–690.
161. **Novais C, Freitas AR, Sousa JC, Baquero F, Coque TM, Peixe L V. (2008).** Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(3):1001–8.

O

162. O'Driscoll T, Crank CW. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*. 8 217–230.
163. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. (2000). Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma*; 48:932–7.
164. Olmsted SB, Dunny GM, Erlandsen SL, Wells CL. (1994). A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*. 170: 1549–1556.
165. Osei Sekyere J, Mensah E. (2019). Molecular epidemiology and mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. in Africa: a systematic review from a One Health perspective. *Annals Of The New York Academy Of Sciences Special Issue: Annals Reports*. 1465(1):29-58. doi: 10.1111/nyas.14254.
166. Ou LB, Nadeau L. (2017). Fosfomycin Susceptibility in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* Species and Vancomycin-Resistant Enterococci Urinary Isolates. *Can J Hosp Pharm*; 70(5):368–74.

P

167. Padmasini E, Padmaraj R, Ramesh SS. (2014). High Level Aminoglycoside Resistance and Distribution of Aminoglycoside Resistant Genes among Clinical Isolates of *Enterococcus* Species in Chennai, India. *The ScientificWorld Journal*, 2014 vol. , Article ID 329157, 5, pages. <https://doi.org/10.1155/2014/329157>
168. Palmer KL, Van Schaik W, Willems RJL, Gilmore MS. (2014). Enterococcal Genomics. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y and Shankar N (editors). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
169. Park IJ, Lee WG, Shin JH, Lee KW, Woo GJ. (2008). *VanB* phenotype-*vanA* genotype *Enterococcus faecium* with heterogeneous expression of teicoplanin resistance. *J Clin Microbiol*. 46:3091–3.
170. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*; 31:e00088–17.
171. Paulsen T., Banerjee L., Myers G.S.A., Nelson K.E., Seshadri R., Read T.D., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill and al. (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. (299); 2071-2074.
172. Pechère JC. (2001). Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents*. 18: S25-S28.
173. Pfaller MA., Cormican M, Flamm RK, Mendes RE., and Jones RN. (2019). Temporal and Geographic Variation in Antimicrobial Susceptibility and Resistance Patterns of Enterococci: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6 (Suppl 1) ; S54-S62.
174. Portenier I, Waltimo T.M.T., Haapasalo M. (2003). *Enterococcus faecalis*– the root canal survivor and ‘star’ in post- treatment disease. *Endodontic Topics* (6), 135–159.
175. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martínez J.L, Torres C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44, 967–971.
176. Praharaj I, Sujatha S, and Parija SC. (2013). Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical specimens. *Indian J Med Res*. 138(4): 549–556.
177. Protonotariou E, Dimitroulia E, Pournaras S, Pitiriga V, Sofianou D, Tsakris A. (2010). Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *J Hosp Infect*. 75(3):225-7. doi: 10.1016/j.jhin.2009.12.007.

178. Purohit G, Gaiind R, Dawar R, Verma P.K, Aggarwal K.C, Sardana R, Deb M. (2017). Characterization of Vancomycin Resistant *Enterococci* in Hospitalized Patients and Role of Gut Colonization. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol-11(9): DC01-DC05. DOI: 10.7860/JCDR/2017/25988.10548.

Q

179. Quiñones D, Aung MS, Sousa Martins JP, Urushibara N, Kobayashi N. (2017). Genetic characteristics of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Cuba. *New Microbes New Infect*. 21:125–7.

R

180. Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, Snuggs M, Van Winkle WB, Simon SI. (1999). *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun*. 67: 6067–6075.

181. Rameshwarnath S, Naidoo S. (2018). Risk factors associated with nosocomial infection in the Neonatal intensive care unit at Mahatma Gandhi Memorial hospital between 2014 and 2015, *Southern African Journal of Infectious Diseases*; 33(4):93–100. doi.org/10.1080/23120053.2018.1453641

182. Rand K, Houck H, Silverman J, et al. (2007). Daptomycin-reversible rifampicin resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*. 59:1017–20.

183. Raschilas H, Blain C, Jeandel. (2006). Infection et sujet âgé. *Traité de Méd*. 3-1129.

184. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. (2003). A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis*. 187:508–12.

185. Rice LB, Bellais S, Carias LL, Hutton-Thomas R, Bonomo RA, Caspers P, Page MGP, Gutmann L. (2004). Impact of specific pbp5 mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:3028–3032. doi:10.1128/AAC.48.8.3028-3032.2004.

186. Rice LB. (2012). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria, *American J Infect Cont*. 34: S11-S19.

187. Roberts M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS. Microbiol. Rev*. 19, 1–24.

S

188. Saeidi S, Mirnejad R, Zavaryani SM, Rostamzadeh S. (2017). Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* isolates from hospitals in Tehran. *Infez Med*. 25(2):116-22.

189. Salem-Bekhit MM, Moussa IMI, Muharram MM, Alanazy FK, Hefni HM. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of multidrug-resistant enterococci isolated from clinical specimens. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 30 (1): 44-51.

190. Şanlıbaba P. (2018). Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Enterococci. Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research 9 (Enrique Torres-Hergueta and A. Méndez-Vilas, Eds.), pp 9-18.

191. Santella B, Folliero V, Della Rocca MT, Zannella C, Pignataro D, Montella F, Folgore A, Greco G, Galdiero M, Galdiero M, Franci G. (2019). Distribution of antibiotic resistance among *Enterococcus spp.* Isolated from 2017 to 2018 at the University Hospital "Luigi Vanvitelli" of Naples, Italy. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 9(2) 1197-1204.

192. Schleifer K., Kilpper-Bälz R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 34 (1), 31-34.

193. Schmitz FJ, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Lückefahr M, Klootwijk M, Verhoef J, Fluit A, Heinz HP, Köhrer K, Jones ME. (1998). Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin,

- levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*; 41(4):481-4. Doi: 10.1093/jac/41.4.481
194. **Seno Y, Kariyama R, Mitsuhata R, Monden K, Kumon H. (2005).** Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta medica Okayama*, 59(3):79-87.
195. **Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. (2002).** Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*; 417: 746–750.
196. **Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. (2001).** Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*; 69:4366-4372.
197. **Shankar N, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. (1999).** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 67:193-200.
198. **Sherman J. M. (1937).** The streptococci. *Bacteriological Reviews*. 1:3–97.
199. **Simner PJ, Adam H, Baxter M, McCracken M, Golding G, Karlowky JA, Nichol K, Lagace-Wiens P, Gilmour MW, et al. (2015).** Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). *Antimicrob Agents Chemother*. 59(7):4315–7.
200. **Simon I, Cocquelin A, Cassou B. (2002).** L'infection nosocomiale en contexte gériatrique. *Presse Med*, 31, 1506-11.
201. **Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. (2002).** An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother*; 46:1845-50; PMID: 12019099; doi.org/10.1128/AAC.46.6.1845-1850.2002.
202. **Sivertsen A, Janice J, Pedersen T, Wagner TM, Hegstad J et al. (2018).** The Enterococcus cassette chromosome, a genomic variation Enabler in enterococci. *mSphere*; 3:e00402–00418.
203. **Sletvold H, Johnsen PJ, Wikmark OG, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM. (2010).** Tn1546 is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages. *J Antimicrob Chemother*. 65(9):1894–906.
204. **Snyder GM, Thom KA, Furuno JP, et al. (2008).** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on the gowns and gloves of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 29(7) :583–589.
205. **Stucki K, Harbarth S, Nendaz M. (2014).** Infections à Entérocoques : Du plus simple au plus complexe... *Rev Med Suisse*. 10(446):1918–23.
206. **Svec PM, Vancanneyt J, Koort SM, Naser B, Hoste E, Vihavainen P, Vandamme J, Swings and J. Björkroth. (2005).** *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 55:2479-84.
207. **Szakacs TA, Kalan L, McConnell MJ, Eshaghi A, Shahinas D, McGeer A, et al. (2014).** Outbreak of vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* containing the wild-type *vanA* gene. *J Clin Microbiol*. 52(5):1682–6.
- T**
208. **Tannock GW, Cook GM. (2002).** Enterococci as Members of the Intestinal Microflora of Humans, in *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*, M.S. Gilmore, Editor, ASM Press: Washington, D.C. p. 101-132.
209. **Techo S, Shiwa Y, Tanaka N, Fujita N, Miyashita M, Shibata C, Booncharoen A, Tanasupawat S. (2019).** *Enterococcus florum* sp. nov., isolated from a cotton flower (*Gossypium hirsutum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* ; 69:2506-2513.
210. **Tian Y, Yu H and Wang Z. (2019).** Distribution of acquired antibiotic resistance genes among *Enterococcus spp.* isolated from a hospital in Baotou, China. *BMC Res Notes*, 12:27; p 1-5. doi.org/10.1186/s13104-019-4064-z
211. **Thiercelin ME, Jouhaud L. (1899).** Sur un diplococque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *CR Soc. Biol*. 5:269–271.

212. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 67:4538-4545.
213. Tornieporth NG, Roberts RB, John J, Hafner A, Riley LW. (1996). Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis.* 23(4):767-772.
214. Tran J, Jacoby G, Hooper D. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:118-25
215. Trautner BW. (2010). Management of catheter-associated urinary tract infection. *Current opinion in infectious diseases,* 23(1):76-82.

U

216. Udo EE, Al-Sweih N, Phillips O A, Chugh TD. (2003). Species prevalence and antibacterial resistance of enterococci isolated in Kuwait hospitals. *J Med Microbiol.* 52(Pt 2):163-168. doi: 10.1099/jmm.0.04949-0.

V

217. Van Schaik W, Top J, Riley DR, Boekhorst J, Vrijenhoek JEP et al. (2010). Pyrosequencing-Based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics;* 11:239.
218. Van der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray BE, Leclercq R. (1996). Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. *J Infect Dis.;* 173(5):1129-1136.
219. Van Tyne D, Gilmore MS. (2014). Evolution of Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance. *Annu Rev Microbiol.* 68: 337-356. doi : 10.1146/annurev-micro-091213-113003.
220. Vergis EN, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, Wagener MM, Schmitt B, Muder RR. (2001). Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. A prospective multicenter study. *Ann Intern Med:* 135: 484-492.

W

221. Wardal E, Kuch A, Gawryszewska I, Żabicka D, Hryniewicz W, Sadowy E. (2017). Diversity of plasmids and Tn1546-type transposons among VanA *Enterococcus faecium* in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(2):313-28.
222. Wehrli W., Knüsel F., Schmid K., Staehelin M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 61(2):667-673.
223. Werner G, Coque T M, Hammerum A M, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson K G, Leclercq R, Lester C H, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, et al. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 20; 13(47):19046.
224. Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde-Gomez JA, Klare I, Witte W. (2009). High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *International Journal of Antimicrobial Agents.* 35(2), Pages 119-125.
225. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, and Sievert DM. (2016). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 37:1288- 1301 <http://dx.doi.org/10.1017/ice.2016.174>.
226. Woodford N. (2001). Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in Enterococci. *Microb Drug Resist;* 7: 229-236.

Y

227. Yamashita H, Tomita H, Inoue T, Ike Y. (2011). Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9): p. 4352-60.
228. Yilema A, Moges F, Tadele S, Endris M, Kassu A, Abebe W, et al. (2017). Isolation of enterococci, their antimicrobial susceptibility patterns and associated factors among patients attending at the University of Gondar Teaching Hospital. *BMC Infect Dis*. 17(1):1–8.

Z

229. Zanella RC, Castro Lima MJ, Tegani LS, Hitomi A, de Cunto Brandileone MC, Palazzo IC. (2006). Emergence of *VanB* phenotype-*vanA* genotype in vancomycin-resistant *Enterococci* in Brazilian hospital. *Braz J Microbiol.* ; 37:117–8.
230. Zhang Z, Chen M, Yu Y, Pan S, Liu Y. (2018). Antimicrobial susceptibility among gram positive and gram-negative blood-borne pathogens collected between 2012-2016 as part of the Tygecyclin evaluation and surveillance trial. *Antimicrob Resist Infect Control*. 7-152.
231. Zhong Z, Zhang W, Song Y, Liu W, Xu H, Xi X, Menghe B, Zhang H, Sun Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research* (196); 95–105.
232. Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA and Bathorn E. (2020). *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*; (130); 1-13. doi.org/10.1186/s13756-020-00770-1.

ANNEXES

Annexe I

TABLEAUX DES CONCENTRATIONS CRITIQUES POUR L'INTERPRETATION DES CMI ET DES DIAMÈTRES CRITIQUES DES ZONES D'INHIBITION POUR L'ESPECE *Enterococcus spp.* COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (CASFM) 2018.

Antibiotique	Concentrations critiques (µg/ml)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes
	S≤	R>		S≥	R<	
Ampicilline	4	8	2	10	8	En cas de résistance à l'ampicilline, rendre résistant aux uréidopénicillines et aux carbapénèmes
Amoxicilline	4	8		-	-	
Amoxicilline/Acide clavulanique	4	8		-	-	Pour les CMI, la concentration de l'acide clavulanique est fixe à 2 µg/ml.
Imipénème	4	8	10	21	18	
Amikacine						Les souches avec une CMI de la gentamicine ≤128 µg/ml ou une zone d'inhibition ≥8 mm sont considérées sauvages avec une résistance naturelle de bas niveau. Les souches avec une CMI de la gentamicine >128 µg/ml ou une zone d'inhibition <8 mm sont considérées hautement résistantes à la gentamicine et aux autres aminosides, excepté la streptomycine qui doit être testée séparément.
Gentamycine						
Tobramycine						
Ofloxacine	-	-		-	-	
Vancomycine	4	4	5	12	12	Les souches d'entérocoques sensibles à la vancomycine présentent des zones d'inhibition à contours nets. La lecture ne doit pas être effectuée avant 24h d'incubation.
Teicoplanine	2	2	30	16	16	
Erythromycine	0.5	4	15	23	14	
Clindamycine	-	-		-	-	
Fosfomycine	-	-		-	-	
Rifampicine	1	2	5	20	17	
Tetracycline	-	-		-	-	

Annexe II

Préparation des tampons

Tampon A	
Tris-HCl	0.05 M
EDTA	0.01 M
Ajuster à pH 8.0 avec HCl	

Tampon C	
Tris-HCl	0.05 M
EDTA	0.01 M
Ajuster à pH 12.42 avec NaOH puis ajouter du SDS à une concentration finale de 4 %	

Tampon TBE 10X	
Tris-base	108 g
Acide borique	55 g
Na ₂ EDTA	9.3 g
H ₂ O qsp	1 litre

Tampon B	
Tris-HCl	0.05 M
EDTA	0.01 M
Ajuster à pH 8.0 avec HCl	
Saccharose	25 %
Lysozyme	20 mg/ml

Tampon D	
Tris-HCl	2 M
Ajuster à pH 7.0 avec HCl	

Tampon E	
NaCl	5 M

3. Composition du Kit Nucléospin-Tissu :

- Tampon T1 : tampon de Lyse
- Tampon B1 : **Préparation de B3**
- Tampon B2 : **B1 + B2 = B3**
- Tampon BW : **Lavage**
- Tampon B5 : **Lavage**
- Tampon BE : **Elution**
- Protéinase K : **Lyse cellulaire**
- Colonnes NucleoSpin[®] tissue (tube de collecte).

Préparation des tampons :

- Le tampon de lyse B3 : transférer le volume total du tampon B1 vers le tampon B2, puis bien mélanger.
- Le tampon de lavage B5 : ajouter 28 ml d'éthanol (96-100%) au tampon B5 concentré.
- Ajouter 1.35 ml de tampon PB pour dissoudre la protéinase K lyophilisée. Conserver à -20°C.

Annexe II

Extraction de l'ADN plasmidique

(Courvalin et al., 1985)

2. Inoculer 5 ml de bouillon BHIB à partir d'une colonie isolée sur milieu gélosé.
 3. Incuber 24h à 37° C avec agitation forte.
 4. Centrifuger 1 ml de culture deux minutes à 15000xg.
 5. Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon B.
 6. Incuber 1 heure à 37°C (formation de protoplastes).
 7. Centrifuger 30 secondes à 15000xg.
 8. Resuspendre le culot dans 40 µl de tampon A.
- 4. *Lyse et purification de l'ADN plasmidique***
1. Transférer la suspension bactérienne (40 µl) en tampon A dans un tube Eppendorf contenant 600 µl de la solution de lyse (tampon C).
 2. Mélanger immédiatement en inversant doucement les tubes 2 à 3 fois.
 3. Incuber les tubes à 37°C pendant 20 minutes. A cette étape la solution doit être Claire et visqueuse.
 4. Neutraliser en ajoutant 30 µl de tampon D.
 5. Mélanger comme décrit en 2. La solution doit devenir beaucoup moins visqueuse.
 6. Ajouter 160 µL de tampon E.
 7. Mélanger comme décrit en 2. Un précipité flocculant blanc doit immédiatement apparaître.
 8. Incuber les tubes dans de la glace pendant une heure.
 9. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale.
 10. Décanter le surnageant (500 à 600 µl) dans un autre tube Eppendorf.
 11. Ajouter 550 µl d'isopropanol prérefroidi à -20°C.
 12. Mélanger comme décrit en 2.
 13. Incuber les tubes 30 min. à -20°C.
 14. Centrifuger 3 min à vitesse maximale. Un culot est généralement visible à cette étape.
 15. Décanter en inversant les tubes, les garder retournés sur un mouchoir en papier.
 16. Sécher les parois du tube avec un coton tige.
 17. Sécher le culot sous vide pendant 90 secs.
 18. Reprendre les culots dans 40 µl de tampon A.
 19. Pipetter et refouler 2 fois à l'aide d'un cone jaune coupé à 7 mm de l'extrémité inférieure.
 20. Conserver l'ADN à -20°C.

Annexe III

Compte rendu -GENOSCREEN- Prestation à façon Extraction – PCR – Séquençage

Annexe IV

**SOUMISSION GENBANK NATIONAL CENTER FOR
BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)**

***Enterococcus faecium* strain EF8RM D-
alanine:D-lactate ligase (*vanA*) gene, partial
cds**

GenBank: MH414912.1

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MH414912.1?report=genbank&to=6>

13

ABSTRACT

The *vanA* gene continues to spread throughout the world. Algeria does not seem to be spared, but the data, which remain sporadic, are also old. This has justified the overriding interest in exploring the current state of antibiotic resistance in *Enterococci*, while focusing on the presence of certain genes. To study the isolation frequency and the level of antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) isolated during two years at the Tlemcen Hospital (northwest Algeria), while investigating the possible presence of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE). The present study was a prospective study in which *Enterococcus spp* was isolated from five different departments, four species were identified and confirmed by molecular identification with 'tuf' gene: *E. faecalis* 59 (53%), *E. faecium* 47 (42%), *E. avium* 2 (1.8%) and *E. durans* 3 (2.7%). Antibiotic sensitivity was done by the agar diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. The vancomycin resistance genes (*van A*, *van B*) were researched by Polymerase Chain Reaction (PCR) and then sequenced by the Genoscreen laboratory in Lille (France). SPSS software version 20 (IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) statistics 20) was used to analyse the data obtained from the study. The PCR of the "tuf" gene revealed two predominant species *E. faecalis* and *E. faecium*. All isolates have a multidrug resistance, two *E. faecium* were distinguished by their resistance to vancomycin with MICs >256 µg/mL. At the origin of this resistance, the *vanA* gene was characterised and sequenced; the obtained sequence has been introduced into the Genbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. This work revealed alarming levels of antibiotic resistance in *Enterococci*, the *vanA* gene was found in two *E. faecium*; sequencing of this gene has revealed a total homology with another isolated in Cuba, which demonstrates a worldwide spread of this resistance gene.

Keywords: CHU, Antibiotic, Enterococci, Resistance, *vanA*.

Résumé

Le gène *vanA* continue de se propager dans le monde. L'Algérie ne semble pas être épargnée, mais les données, qui restent sporadiques, sont également anciennes. Cela a justifié l'intérêt supérieur d'explorer l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez les entérocoques, tout en se concentrant sur la présence de certains gènes. Étudier la fréquence d'isolement et le niveau de résistance aux antibiotiques d'*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) et *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) isolés pendant deux ans à l'hôpital de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie), tout en recherchant la présence éventuelle d'Entérocoques Résistants à la Vancomycine (ERV). Cette étude prospective dans laquelle *Enterococcus spp* a été isolé de cinq services différents, quatre espèces ont été identifiées et confirmées par identification moléculaire avec le gène « tuf » *E. faecalis* 59 (53%), *E. faecium* 47 (42%), *E. avium* 2 (1.8%) and *E. durans* 3 (2.7%). La sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la diffusion sur gélose et la méthode de concentration minimale inhibitrice (CMI). Les gènes de résistance à la vancomycine (*vanA*, *vanB*) ont été recherchés par Polymerase Chain Reaction (PCR) puis séquencés par le laboratoire Genoscreen à Lille (France). Le logiciel SPSS version 20 (IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) statistics 20) a été utilisé pour analyser les données issues de l'étude. La PCR du gène « tuf » a révélé deux espèces prédominantes *E. faecalis* et *E. faecium*. Tous les isolats ont une multirésistance, deux *E. faecium* ont été distingués par leur résistance à la vancomycine avec des CMI > 256 µg/mL. A l'origine de cette résistance, le gène *vanA* a été caractérisé et séquencé ; la séquence obtenue a été introduite dans la base de données du Genbank National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ces travaux ont révélé des niveaux alarmants de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques, le gène *vanA* a été trouvé dans deux *E. faecium* ; le séquençage de ce gène a révélé une homologie totale avec un autre isolat à Cuba, ce qui démontre une diffusion mondiale de ce gène de résistance.

Mots-clés : CHU, Antibiotique, *Enterococcus*, Résistance, *vanA*.

ملخص

يستمر جين *vanA* في الانتشار في جميع أنحاء العالم. لا يبدو أن الجزائر بمنأى عن ذلك، لكن البيانات، التي لا تزال متفرقة، وقديمة أيضاً. وقد برر هذا الاهتمام المهيمن في استكشاف الحالة الحالية لمقاومة المضادات الحيوية في *Enterococci*، مع التركيز على وجود جينات معينة.

دراسة تواتر العزل ومستوى مقاومة المضادات الحيوية للمكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecium* و *Enterococcus faecalis*

المعزولة خلال عامين في مستشفى تلمسان (شمال غرب الجزائر)، أثناء التحقيق في احتمال وجود المكورات المعوية (VRE) مادة مقاومة للفانكوميسين.

الدراسة الحالية عبارة عن دراسة استطلاعية تم فيها عزل *Enterococcus spp* من خمسة أقسام مختلفة تم تحديدها وتأكيدتها من خلال التعريف الجزيئي لجين "tuf"

أظهر تفاعل البوليميراز المتسلسل للجين "tuf" نوعين سائدين هما *E. faecalis* و *E. faecium* تتمتع جميع العزلات بمقاومة متعددة للأدوية، وقد تميز اثنان من *E. faecium* بمقاومتها للفانكوميسين مع MICs > 256 ميكروغرام/مل. في أصل هذه المقاومة، تم توصيف جين *van A* وتسلسله؛ تم إدخال التسلسل الذي تم الحصول عليه في قاعدة بيانات Genoscreen في ليل (فرنسا). تم استخدام الإصدار 20 من برنامج SPSS حزمة IBM الإحصائية لإحصاءات العلوم الاجتماعية (SPSS) 20 لتحليل البيانات التي تم الحصول عليها من الدراسة.

أظهر تفاعل البوليميراز المتسلسل للجين "tuf" نوعين سائدين هما *E. faecalis* و *E. faecium* تتمتع جميع العزلات بمقاومة متعددة للأدوية، وقد تميز اثنان من *E. faecium* بمقاومتها للفانكوميسين مع MICs > 256 ميكروغرام/مل. في أصل هذه المقاومة، تم توصيف جين *van A* وتسلسله؛ تم إدخال التسلسل الذي تم الحصول عليه في قاعدة بيانات Genbank for National Center Biotechnology Information (NCBI)

كشف هذا العمل عن مستويات مثيرة للقلق من مقاومة المضادات الحيوية في المكورات المعوية، تم العثور على جين *vanA* في اثنين من *E. faecium* كشف تسلسل هذا الجين عن تماثل كامل مع آخر معزول في كوبا، مما يدل على انتشار عالمي لهذا الجين المقاوم.

الكلمات الدلالية: CHU، مضاد حيوي، *Enterococci*، مقاومة، *VanA*