



THESE DE DOCTORAT

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présentée par

Boussouar Naceur

Intitulé du Thème

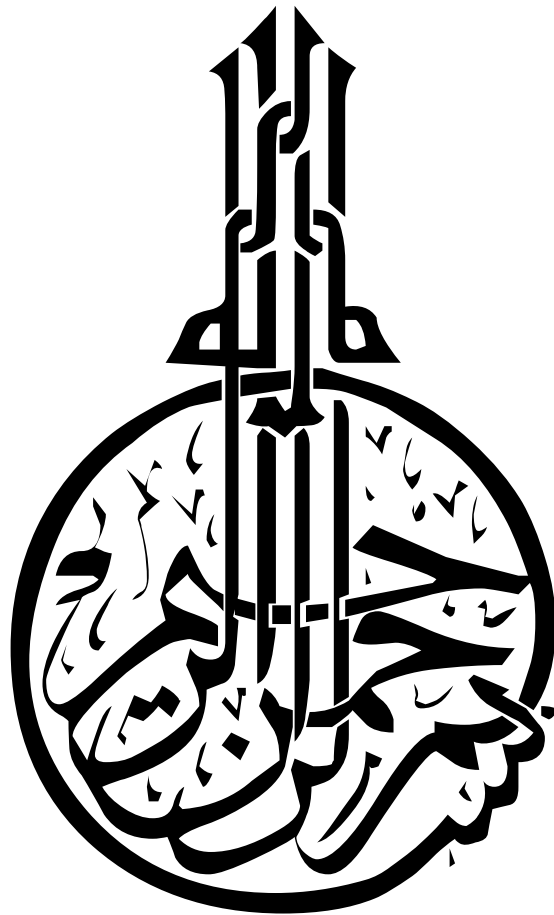
CARACTERISATION TECHNOLOGIQUE ET SANITAIRE DES ENTEROCOQUES ISOLES A PARTIR DE LAIT DE CHAMELLE DU SUD-OUEST ALGERIEN

Soutenu le

Devant le Jury composé de :

Pr. HASSAINE. H	Université /Tlemcen	Présidente
Pr. MOUSSABOUDJEMAA. B	Université /Tlemcen	Directeur de thèse
Pr. ABDELOUAHED. DE	Université /Tlemcen	Membre
Pr. BADIS. A	Université /Blida	Membre
Pr. BELLAHCENE. M	CU /Ain-Temouchent	Membre
Dr. IDOUI. T	Université /Jijel	Membre

Année Universitaire : 2016-2017



إهداء

إلهتى لا يطيب الليل الا بشكرك ولا البهار الا بطاعتك ... ولا تطيب الحياة الا بذكرك ... ولا تطيب
الآخرة الا بعفوك ... ولا الجنة الا برؤيتك.

الى من بلغ الرسالي وأدى الامانة ... الى سيدبا محمد صلى الله عليه وسلم.

الى من كلفه الله بالهبة والوقار ... الى من علمتى العطاء بدون انتظار ... الى من احمل اسمه بكل افتخار

... ارجوا من الله ان يمد في عمرك ليرى يمارا قد حان قطافها بعد طول انتظار ... والذي العزم

الى معي الحب والتفاني والحنان ... الى من كان دعائها سر بجاحتي وحنانها بلسم جراحتي ... والديتي

الغالية

الى رفيقة دربي وسندي...الى التي صحت من أجلتي بصبرها ودعت لتي في سرها... الى الروح التي

سكنت روحي ... زوجتي الغالية "خبره"

الى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة ... الى رياحين حياتي...ابنتي رجاء...و نورالإيمان...

الى من يخلو بالإخاء ويمبروا بالعطاء ... الى ينابيع الصدق الصافي والذس معهم سعدت ورفقيهم في

دروب الحياة الحلوة والحزينة سرت ... اخويتي الاعزاء واخواتي الفضليات...

الى كل عائلتي وعائلته زوجتي...

اليكم جميعاأهدي هذا العمل

Remerciements

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله والشكر لله الواحد الاحد الفرد الصمد، الذي وفقنا لهذا العمل، أما بعد :

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ، قَالَ: قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ " مِنْ لَا يَشْكُرُ النَّاسَ لَا يَشْكُرُ اللَّهَ "

(جامع اليرمذي ح 1954)

Abu Hurayrā a rapporté que le Prophète, qu'Allah le bénisse et lui accorde la paix, a dit:

« Celui qui n'est pas reconnaissant au gens, il n'est pas reconnaissant à Allah. »

[Jami` at-Tirmidhi 1954]

Je voudrais remercier généreusement mon directeur de thèse le Professeur BOUMEDIENNE MOUSSA BOUDJEMAA, pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse et pour m'avoir soutenu tout au long de ce travail. Merci d'avoir eu confiance en moi et d'avoir permis de me rendre où je suis.

Je remercie chaleureusement madame le Professeur HAFIDA HASSAINE de l'université de Tlemcen, de l'honneur qu'elle me fait de siéger à ce jury de cette thèse, et en acceptant de présider cette thèse et de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je suis également reconnaissant auprès des messieurs, le Professeur ABDELOUAHID D. de l'université de Tlemcen, le Professeur BADIS A, de l'université de Blida, et le Professeur BELLAHCENE M, du centre universitaire d'Ain-Temouchent. C'est pour moi un bien grand honneur que de vous voir siéger à ce jury. Je vous suis profondément reconnaissant.

J'adresse également mes remerciements au Docteur IDOUI TAYEB, Maître de conférences à l'université de Jijel. Je vous sais gré de l'honneur que vous me fait en acceptant d'examiner ce travail et d'être parmi nous.

Je réitère Madame et Messieurs les membres de jury, mes plus vifs remerciements, et mes considérations les plus distinguées.

Je souhaite remercier mes collègues qui m'ont côtoyé en réalisant ce travail, pour leurs soutiens et leurs conseils précieux. Je pense particulièrement à ABDELILLAH AMROUCHE Maître de conférences au centre universitaire de Naâma, à GOURIS SAÏF, et FELLAH HAMZA enseignants à l'université de Bechar, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance entière et l'assurance de mon amitié sincère.

Je tiens aussi à remercier mes collègues, BOULENOUAR ALI, MAKHLOFI AHMED, et MEBARKI LAKHDER pour m'avoir aidé et me fournir les échantillons provenant de la région d'Igli et d'Abadla.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à l'université de Bechar qui m'a accueilli, et favoriser un environnement de travail idéal, et que tous le staff de l'université retrouve ici mes sincères remerciements (Enseignants, Etudiants, et Fonctionnaires).

تعتبر المكورات المعوية في غالب الأحيان عنصرا طبيعيا مكون للفلورا المعوية للإنسان والحيوانات، وقد حظيت في السنوات الأخيرة باهتمام معتبر في علم الجراثيم الطبى نظرا لدورها المتنامي في عدوى المستشفيات. ومن المفارقات مساهمة هذه البكتيريا لعدة قرون في تحويل الأغذية، وهي تصنف من بكتيريا حمض اللبن. المكورات المعوية المعزولة من حليب النوق لم يتأتى لها أن كانت يوما ما موضوع دراسة معمقة لخصائصها التكنولوجية والصحية، وهذا ما دعانا لاختيارها هدفا لدراسنا هاته.

تم عزل ما مجموعه 123 عزلة بكتيرية من حليب النوق الذي تم جلبه من مواقع مختلفة في الجنوب الغربي للجزائر، في منطقة بشار بالتحديد.

سمحت لنا نتائج التعريف والتحديد بواسطة شرائح API 20 STREP بتجميع العزلات في سبعة أنواع

منها:

(ع = 78) *E. faecium* %63.4 (ع = 18) *E. galliratum* %14.6 (ع = 14) *E. faecalis* %11.4 (ع = 7) *L. lactis ssp lactis* %0.8 (ع = 1) *S. uberis* %1.6 (ع = 2) *A. viridans* %2.4 (ع = 3) *E. avium* %5.7. كما قمنا باستغلال تقنية جزيئية لتحديد العزلات جينياً، حيث تعتمد على التفخيم باستعمال طريقة البلمرة الجزيئية ERIC-PCR. وقد مكنت من التمييز بين ثلاث مجموعات، اثنين منها تم تحديدها بدقة الى نوعين من المكورات المعوية وهي *E. faecium* (ع = 52) و *E. faecalis* (ع = 22)، أما المجموعة الثالثة *Enterococcus spp* فهي غير متجانسة وتحتاج الى تحليل معمق.

أظهرت نتائج البحث عن الخصائص التكنولوجية للعزلات أن 61 بالمائة منها تتميز بقدرات تكنولوجية هامة غير أنه من بين هذه العزلات 54.5 بالمائة تحتوي على الأقل على عامل ممرض أو مقاومة أو كليهما. أعطى التحليل المظهري لمقاومة المضادات الحيوية النتائج التالية: 8%، 5%، 4%، 4%، 3%، 2%، 2% لكل من البنيسلين، الأمبسيلين، الإريثروميسين، الفنكومييسين، التيتراسكلين، الجنتاميسين، والريفامبين على التوالي، حتى وان كانت هاته النسب ضئيلة يبقى السؤال دو ما مطروح عن مصدر هذه المقاومة، كما سجلنا من بين هاته العزلات ست عزلات متعددة المقاومة لأكثر من اثنين من المضادات الحيوية. ثم قمنا بمعاينة هاته الحوصلة بالطرق الجزيئية والتي تعتمد على التفخيم الجيني باستعمال طريقة البلمرة الجزيئية المتعددة Multiplex-PCR وقد تم اكتشاف الجينات التالية: *vanA*، *vanB*، *vanC2-vanC3* في 12، 7، و 8 عزلات من بين 33 عزلة منتخبة من المكورات المعوية. الجين *vanC1* لم يتم اكتشافه في أي عزلة.

بالنسبة للمحددات الجينية الممرضة، فقد أظهر البحث أن 17 (65.4%) عزلة من العزلات المنتخبة تحتوي على الأقل على عامل جيني، ويبدو أيضاً أن المحدد الجيني الممرض *asaI* متواجد بنسبة 46% هو العامل السائد بين العوامل الخمسة التي تمت دراستها، يليه *gelE* (42.3%)، ثم *hly* (30.8%)، *esp* (15.4%)، وبنسبة أقل *cylA* (7.7%).

وفي الختام، فقد أظهرت المكورات المعوية المعزولة من حليب النوق تنوعاً في خصائصها التكنولوجية وصفاتها الممرضة، لحسن الحظ هذه الصفات لها ارتباط بالسلالة وليس بالنوع. ومع ذلك، اليقظة ومراقبة مقاومة المضادات الحيوية ضرورية، حتى ولو كانت هذه المقاومة ليست كبيرة، فقد تبين أن المكورات المعوية لها قدرة غير عادية على التكيف وتبادل المادة الوراثية عن طريق التحويل الأفقي والعمودي.

كلمات مفتاحية: المكورات المعوية، حليب النوق، مقاومة المضادات الحيوية، الممرضة، الجزائر

Abstract

Enterococci often considered as components of the intestinal flora of humans and animals have received in recent years' considerable attention in medical bacteriology because of their growing role in nosocomial infections. But, paradoxically, these bacteria have contributed for centuries in food processing, and are considered as lactic acid bacteria. *Enterococci* isolated from camel milk (*Camelus dromedarius*) have never been subject to a comprehensive study, which characterizes their technological and sanitary aspects. This led us to adopt as an essential objective the study of the enterococci of camel's milk.

A total of 123 isolates of enterococci were isolated from camel milk taken from various sites in south-western of Algeria, specifically from the region of Bechar.

The results of the identification by API 20 STREP allowed us to group the isolates into seven species: *E. faecium* 63,4 % (n=78), *E. gallinarum* 14,6 % (n=18), *E. faecalis* 11,4 % (n=14), *E. avium* 5,7 % (n=7), *Aerococcus viridans* 2,41 % (n=3), *Streptococcus uberis* 1,6 % (n=2), *L. lactis ssp lactis* 0,8 % (n=1). A second molecular method (ERIC-PCR) was used to identify these isolates genotypically, by this method we could distinguish three distinct phylogenetic groups. Two of which are well identified as *E faecium* (52 isolates) and *E faecalis* (22 isolates), and the third group which is very heterogeneous *Enterococcus spp* requires in-depth analysis.

Technological characterization of the isolates showed that 61% of the selected isolates had interesting technological performances, while 54.5% of these isolates contain at least one virulence or resistance factor.

The phenotypic analysis of antibiotic resistance yielded 8%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 2% for penicillin, ampicillin, erythromycin, vancomycin, Tetracycline, gentamicin, and rifampicin, respectively. Even though these rates are very low, it still raises a question about the origin of this resistance. There were six multidrug-resistant isolates for more than two antibiotics. This finding was then verified by genotypic analysis using multiplex PCR. The *vanA*, *vanB*, and *vanC2-vanC3* genes were detected in 8, 7, and 12 of the 33 selected enterococci isolates, respectively. None of the isolates contained the *vanC1* gene.

The search for virulence factors resulted in 17 (65.4%) isolates from the selected isolates possessing at least one virulence factor. It also appears that the genetic determinant of virulence *asa1* with a frequency of 46% is the predominant factor among the five factors studied, followed by *gelE* (42.3%), then *hyl* (30.8%), *esp* (15.4%), and at a lower frequency *cyfA* (7.7%).

Finally, camel milk enterococci show a certain diversity in their technological and sanitary characteristics, fortunately these traits depend on the strain and not on the species. Nevertheless, vigilance and surveillance of antibiotic resistance are necessary, even if the resistance is not significant, as it has been shown that enterococci have an extraordinary ability to adapt and exchange genetic material by horizontal and vertical transfer.

Keywords : Enterococci., Camel milk., Antibiotic resistance., Virulence., Algeria.

Les entérocoques souvent considérés comme des composants de la flore intestinale des humains et des animaux ont reçu ces dernières années une attention considérable dans la bactériologie médicale en raison de leur rôle croissant dans les infections nosocomiales. Mais, paradoxalement, ces bactéries ont contribué depuis des siècles à la transformation des aliments, et sont considérées comme des bactéries lactiques. Les entérocoques isolés du lait de chamelle (*Camelus dromedarius*) n'ont jamais été sujets d'une étude approfondie, qui les caractérise du point de vue technologique et sanitaire. Ce qui nous a conduits à adopter comme objectif essentiel l'étude des entérocoques de lait de chamelle.

Un total de 123 isolats d'entérocoques a été isolé à partir de lait de chamelle prélevé de différents sites dans le Sud-Ouest algérien, précisément la région de Bechar.

Les résultats de l'identification par API 20 STREP nous ont permis de regrouper les isolats en sept espèces à savoir : *E. faecium* 63,4 % (n=78), *E. gallinarum* 14,6 % (n=18), *E. faecalis* 11,4 % (n=14), *E. avium* 5,7 % (n=7), *Aerococcus viridans* 2,41 % (n=3), *Streptococcus uberis* 1,6 % (n=2), *L. lactis ssp lactis* 0,8 % (n=1). Une deuxième méthode moléculaire (ERIC-PCR) a été exploitée pour identifier génotypiquement ces isolats, par cette méthode nous avons pu distinguer trois groupes phylogénétiques distincts. Dont deux sont bien identifiés en tant que *E. faecium* (52 isolats) et *E. faecalis* (22 isolats), et le troisième groupe *Enterococcus spp* très hétérogène, nécessite des analyses approfondies.

La caractérisation technologique des isolats a montré que 61 % des isolats sélectionnés avaient des performances technologiques intéressantes, tandis que 54,5 % de ces isolats contiennent au moins un facteur de virulence ou de résistance.

L'analyse phénotypique de la résistance aux antibiotiques a donné les taux suivants : 8 %, 5 %, 4 %, 4 %, 3 %, 2 %, 2 % pour la pénicilline, l'ampicilline, l'érythromycine, la vancomycine, la tétracycline, la gentamicine, et la rifampicine respectivement. En dépit que ces taux soient très faibles, mais ça pose toujours une question sur l'origine de cette résistance. Comme on a observé la présence de six isolats multirésistants à plus de deux antibiotiques. Cette constatation a été ensuite vérifiée par une analyse génotypique en utilisant une PCR multiplex. Les gènes *vanA*, *vanB*, et *vanC2-vanC3* ont été détectés respectivement dans 8, 7, et 12 des 33 isolats d'entérocoques sélectionnés. Aucun des isolats ne contenait le gène *vanC1*.

La recherche des facteurs de virulence a abouti à ce que 17 (65,4 %) isolats parmi les isolats sélectionnés possèdent au moins un facteur de virulence. Il semble aussi que le déterminant génétique de virulence *asa1* avec une fréquence de 46 % soit le facteur prédominant parmi les cinq facteurs étudiés., suivi par le facteur *gelE* (42,3 %), puis *hyl* (30,8 %), *esp* (15,4 %), et d'une moindre fréquence *cylA* (7,7 %).

Enfin, les entérocoques de lait de chamelle présentent une certaine diversité dans leurs caractéristiques technologiques et sanitaires, heureusement ces traits dépendent de la souche et pas de l'espèce. Néanmoins, une vigilance et une surveillance de la résistance aux antibiotiques sont nécessaires, même si la résistance n'est pas significative, car il a été prouvé que les entérocoques ont une capacité extraordinaire à s'adapter et échanger du matériel génétique par transfert horizontal et vertical.

Mots clés : Entérocoques, Lait de chamelle, Antibiorésistance, Virulence, Algérie.

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr	Acide Désoxyribonucléique ribosomique
ALT (LTA)	Acide lipotéichoïque (lipoteichoic acid)
AMP	Ampécilline
API	Analytical Index Profil
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BET	Bromure d'Ethidium
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CATC	Citrate Azide Tween Carbonate Agar
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
dNTPs	Désoxynucléotides triphosphates
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EPS	Exopolysaccharides
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR
ERV/VRE	Entérocoques Résistants à la Vancomycine
ERY	Erythromycine
FAO	Food and agriculture organisation
GEN	Gentamicine
GES	Guanidium EDTA SDS
HIV	Virus immunodéficience Humain
ISO	International Standardisation Organisation
KDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharides
LPXTG	Motif d'acides aminés (leucine, proline, X, thréonine, glycine) d'ancrage à la paroi cellulaire
MRS	Gélose de Man Rogosa et Sharpe
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules ou composantes microbiennes de surface reconnaissant les molécules de la matrice extracellulaire
NF	Norme française
pb	Paire de base
PBP/PLP	Protein Binding Penicillin « PLP protéines de liaison aux pénicillines »

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN	Pénicilline
pH	Potentiel d'Hydrogène
RIF	Rifampicine
TBE	Tris Borate EDTA
TET	Tétracycline
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
UF	Unité fongique
UFC	Unité formant colonie
UPGMA	Unweighted Pair Group Method With Arimetic Mean
UV	Ultra-violet
VAN	Vancomycine
VP	Vogues Proskauer
YMA	Yeast Milk Agar

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
Tableau 1	Classification zoologique du dromadaire	7
Tableau 2	Les concentrations moyennes des minéraux dans le lait de chamelle, de la vache, et de la femme. (mg /100g)	11
Tableau 3	Les concentrations moyennes des vitamines dans le lait de chamelle, de la vache, et de la femme. (mg /kg)	12
Tableau 4	Différentes études entreprises sur les effets thérapeutiques du lait de chamelle.	13
Tableau 5	Bactéries lactiques isolées à partir du lait cru et du lait fermenté de dromadaire.	14
Tableau 6	Groupes phylogénétiques des espèces du genre <i>Enterococcus</i> selon les analyses génétiques de l'ARNr 16S et de l'espace intergénique 16S-23S	18
Tableau 7	Classification des entérocoques	34
Tableau 8	Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques	53
Tableau 9	Répartition de l'effectif camelin sur les communes de la wilaya de Béchar	60
Tableau 10	Echantillons du lait de chamelle prélevés de différents sites de la région sud-ouest (Bechar)	62
Tableau 11	Séquences nucléotidiques et caractéristiques des amorces ERIC	79
Tableau 12	Composition du milieu réactionnel utilisé pour amplification par ERIC-PCR.	80
Tableau 13	Les étapes d'amplification utilisées pour la méthode ERIC-PCR.	80
Tableau 14	Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance ;	86
Tableau 15	Composition du milieu réactionnel pour la recherche des gènes de résistance par la PCR Multiplex	87
Tableau 16	Les étapes d'amplification pour la recherche des gènes de résistance par PCR Multiplex.	87
Tableau 17	Séquences et caractéristiques des amorces pour la détection des gènes de virulence.	88
Tableau 18	Composition du milieu réactionnel pour la recherche des gènes de virulence par la PCR Multiplex	89
Tableau 19	Les étapes d'amplification pour la recherche des gènes de virulence par PCR Multiplex.	89
Tableau 20	Valeurs moyennes des paramètres physicochimiques du lait de chamelle	91
Tableau 21	Valeurs moyennes des attributs microbiologiques du lait de chamelle	93
Tableau 22	Représentation globale du résultat de l'API 20 STREP	97
Tableau 23	Les souches sélectionnées pour effectuer la recherche des aptitudes technologiques.	105
Tableau 24	Aspects rhéologiques des coagulums obtenus par les souches sélectionnées	111

Tableau 25	Activité protéolytique sur gélose YMA des souches sélectionnées calculée en mm du diamètre de la zone de protéolyse.	112
Tableau 26	Résultat de l'activité lipolytique et amylolytique des souches sélectionnées	113
Tableau 27	Résultats du pouvoir texturant des souches sélectionnées	114
Tableau 28	Résultats de test de pouvoir épaississant	115
Tableau 29	Activité autolytique des isolats sélectionnés	116
Tableau 30	Résultat global de l'antibiogramme des isolats	118
Tableau 31	Résultats de l'antibiogramme pour chaque groupe d'espèces identifiées	120
Tableau 32	Les isolats phénotypiquement multi-résistantes	121
Tableau 33	Les tailles des bandes détectées après analyse des produits de la PCR multiplex du gel 1	122
Tableau 34	Les tailles des bandes détectées après analyse des produits de la PCR multiplex du gel 2	123
Tableau 35	Résultats de la recherche des gènes de virulence	124
Tableau 36	Les tailles en paires de base des différentes bandes détectées dans le gel 1	126
Tableau 37	Les tailles en paires de base des différentes bandes détectées dans le gel 2	127
Tableau 38	Les tailles en paires de bases des différentes bandes détectées dans le gel 3	129
Tableau 39	Les tailles en paires de bases des différentes bandes détectées dans le gel 4	130
Tableau 40	Détermination des génotypes de résistance à la vancomycine et de l'identification des souches par les gènes ddl.	131

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
Figure 1	Répartition mondiale de l'effectif camelin	8
Figure 2	Aire de dispersion du genre <i>Camelus</i> , la couleur foncée indique une grande population cameline	9
Figure 3	Répartition du dromadaire en Algérie	10
Figure 4	Dendrogramme du genre <i>Enterococcus</i> .	19
Figure 5	Répartition dans la nature des espèces du genre <i>Enterococcus</i>	23
Figure 6	Les mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques	52
Figure 7	Profils électrophorétiques des extraits cellulaires des protéines totales des isolats d' <i>Enterococcus</i>	98
Figure 8	Un exemple de visualisation de l'ADN génomique des isolats d'entérocoques sur gel d'agarose à 0.8%	99
Figure 9	Amplicons des isolats générés par la méthode ERIC- PCR et visualisés sur gel d'agarose (Photos visualisées par le Transilluminateur-UV BioPrint TX4)	100
Figure 10	Dendrogramme d'identification des isolats des entérocoques par la méthode ERIC-PCR (calculé par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de similarité « Dice »)	101
Figure 11	Distribution des isolats d'entérocoques en fonction de leur pH mesuré après 72 h d'incubation dans le lait écrémé stérile	103
Figure 12	Comparaison des moyennes de pH mesurés après 72h entre les différentes souches identifiées	104
Figure 13	Courbes moyennes d'acidification et de la cinétique de croissance des différents isolats d'entérocoques sélectionnés.	110
Figure 14	Résultat de test d'hydrolyse de la gélatine	117
Figure 15	Distribution des fréquences de sensibilité et de résistance de tous les isolats (n=123).	119
Figure 16	Profils électrophorétiques des produits de la PCR multiplex des 26 isolats d'entérocoques pour la recherche des facteurs de virulence.	122
Figure 17	Analyse des profils électrophorétiques des produits de la PCR multiplex par logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, et détection des bandes correspondantes aux facteurs de virulence (gel 1)	122

Figure 18	Analyse des profils électrophorétiques des produits de la PCR multiplex par logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, et detection des bandes correspondantes aux facteurs de virulence (gel 2).	123
Figure 19	Profils génotypiques de la résistance à la vancomycine et identification par <i>ddl</i> des souches sélectionnées (gel1) supérieur et (gel2) inférieur	125
Figure 20	Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, (gel1).	126
Figure 21	Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, (gel 2).	127
Figure 22	Profils génotypiques de la résistance à la vancomycine et identification par <i>ddl</i> des souches sélectionnées (gel 3) supérieur et (gel 4) inférieur	128
Figure 23	Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, (gel 3).	129
Figure 24	Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, (gel 4).	130
Figure 25	Courbe de dispersion de l'activité protéolytique en fonction du pH calculé après 72 h d'incubation	138

Sommaire

إهداء	I
Remerciements	II
ملخص	III
Abstract	IV
Résumé	V
Liste des sigles et abréviations	VI
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	X
Sommaire	XII
Introduction générale	1
Partie I	
Synthèse bibliographique	
Chapitre I	5
Aperçu sur le dromadaire	
I.1. Taxonomie et évolution du dromadaire	6
I.2 Répartition géographique et effectif camelin	7
a) Répartition mondiale	7
b) Répartition du dromadaire en Algérie	8
I.3 Importance socioéconomique du dromadaire	8
I.3.1 Le lait de chamelle	9
I.3.1.1. Propriétés organoleptiques et physico-chimiques	11
I.3.1.2. Propriétés thérapeutiques du lait de chamelle	12
I.3.2. Flore microbienne du lait de chamelle	13
Chapitre II	15
Les entérocoques	
II. Les entérocoques	16
II.1 Taxonomie	16
II.2 Description du genre <i>Enterococcus</i>	20
II.3 Habitat	21
II.4. Rôles et applications des entérocoques	24
II.4.1. Indicateurs de contamination fécale	24
II.4.2. Applications des entérocoques dans les produits laitiers	24
a) Comme culture starter	24
b) Les entérocoques en tant qu'adjuvants	25
c) Les entérocoques en tant que probiotiques	26
II. 5. Propriétés biochimiques des entérocoques d'intérêt technologique	27
II.5.1. Le pouvoir acidifiant	27
II.5.2. Activités protéolytiques	28
II.5.3. Activité lipolytique et estérasique	28
II.5.4. Métabolisme du citrate et du pyruvate	31
II.5.5. Production des bactériocines	32
II.6. Virulence et pathogénèse des entérocoques	37
II.6.1. Facteurs de virulence secrétés	38

II.6.1.1. Cytolysine	38
II.6.1.2. Gélatinase	40
II.6.1.3. Hyaluronidase	41
II.6.1.4. Les phéromones sexuelles	41
II.6.1.5. Production de superoxyde extracellulaire et de peroxyde d'hydrogène	42
II.6.2. Facteurs de virulence liés à la membrane	42
II.6.2.1. Substances agrégatives	42
II.6.2.2. Protéines de surface extracellulaire	44
II.6.2.3. Protéines de liaison au collagène	45
II.6.2.4. Antigène A d' <i>E. faecalis</i> (EfaA)	46
II.6.2.5. Les pili associés au biofilm et à l'endocardite (Ebp)	47
II.6.2.6. Acide lipotéichoïque	48
II.6.2.7. Capsule (hydrate de carbone variable)	49
II.6.2.8. Polysaccharide commune de la paroi cellulaire (Epa)	50
II.7. Antibiorésistance chez les entérocoques	51
II.7.1. Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques	51
II.7.1.1. La résistance intrinsèque	52
II.7.1.2. Résistance aux β -lactamines	53
II.7.1.2.1. La résistance à l'Ampicilline	54
II.7.1.3. La résistance aux aminoglycosides	55
II.7.1.4. La résistance aux glycopeptides	56
II.7.1.5. La résistance à la daptomycine	57
Partie II	58
Matériels et Méthodes	
III.1. Etude physicochimique et microbiologique du lait de chamelle	60
III.1.1. Description de la zone d'étude	61
III.1.2. Echantillonnage	61
III.1.3. Analyses Physico-chimiques	63
III.1.3.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)	63
III.1.3.2. Détermination de l'acidité titrable (Dornic)	63
III.1.3.3. Détermination de la densité	63
III.1.3.4. Détermination de l'extrait sec total (EST)	64
III.1.3.5. Détermination du taux de cendre	64
III.1.3.6. Détermination de l'azote total et la teneur en protéines totales (méthodes de Kjeldahl)	64
III.1.3.7. Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode GERBER	65
III.1.4 Analyses microbiologiques	65
III.1.4.1. Préparation des dilutions décimales	66
III.1.4.2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale à 30 °C (FAMT)	66
III.1.4.3. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants	67
III.1.4.4. Dénombrement des Streptocoques du groupe D	67
III.1.4.5. Recherche des Salmonelles et des Shigelles	68
III.1.4.6. Recherche des Staphylocoques	69
III.1.4.7. Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs	69
III.1.4.8. Dénombrement des moisissures et levures	69
III.2. Isolement et identification des entérocoques	70
III.2.1. Isolement des entérocoques	70

III.2.2. Purification des isolats	70
III.2.3. Conservation des isolats	70
III.2.4. Identifications phénotypiques des isolats	71
III.2.4.1. Identification physiologique des isolats	71
III.2.4.1.1. Croissance à différentes températures	71
III.2.4.1.2. Croissance dans des conditions hostiles	71
III.2.4.1.3. Recherche de type fermentaire	71
III.2.4.2. Identification biochimique des isolats	72
III.2.4.2.1. Recherche de la catalase	72
III.2.4.2.2. Mannitol mobilité	72
III.2.4.2.3. Hydrolyse de l'esculine	72
III.2.4.2.4. Utilisation du Citrate	72
III.2.4.2.5. Tolérance au tellurite	73
III.2.4.2.6. Test d'hémolyse	73
III.2.4.2.7. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP	73
III.2.5. Identification moléculaire des isolats	74
III.2.5.1. Analyse des profils protéiques des isolats par SDS-PAGE	74
III.2.5.1.1. Préparation des extraits protéiques	74
III.2.5.1.2. Préparation des gels	75
III.2.5.1.3. Préparation du tampon de migration pH 8.3	75
III.2.5.1.4. Dépôts des échantillons et migrations électrophorétique	76
III.2.5.1.5. Révélation des bandes protéiques	76
III.2.5.1.6. Analyse numérique des profils protéiques	76
III.2.5.2. Extraction d'ADN par la méthode de Pitcher et al, 1989	77
III.2.5.2.1 Electrophorèse et visualisation d'ADN extrait sous l'UV	78
III.2.5.3. Identification des isolats par la technique ERIC-PCR	79
III.3. Caractérisation technologique des entérocoques	82
III.3.1. Pouvoir acidifiant	82
III.3.2. Pouvoir coagulant	82
III.3.3. La cinétique de croissance	82
III.3.4. Activité protéolytique	82
III.3.5. Activité amylolytique	82
III.3.6. Activité lipolytique	83
III.3.7. Pouvoir texturant	83
III.3.8. Pouvoir épaississant	83
III.3.9. Pouvoir aromatisant	83
III.3.10. Pouvoir autolytique	84
III.4. Caractérisation sanitaire des entérocoques	85
III.4.1. Recherche de la gélatinase	85
III.4.2. Recherche du type d'hémolyse (la cytolysine)	85
III.4.3. Recherche de la résistance des entérocoques aux antibiotiques	85
III.4.4. La recherche des gènes de résistance aux antibiotiques par la méthode PCR Multiplex	86
III.4.5. La recherche des gènes de virulence par la PCR multiplex	88
Partie III	90
Résultats & Discussion	
IV.1. Etude physicochimique et microbiologique du lait de chamelle	91

IV.1.1. Résultats & Discussion	91
IV.1.1.1. Analyses physicochimiques	91
IV.1.1.2. Analyses microbiologique	93
IV.2. Isolement et identification des entérocoques	96
IV.2.1. Isolement et identification des souches étudiées	96
IV.2.1.1. Résultats d'identification morphologique	96
IV.2.1.2. Résultats de l'identification physiologique des isolats	96
IV.2.1.3. Résultats de l'identification biochimique des isolats	96
IV.2.1.4. Identification par le SDS-PAGE	97
IV.2.1.5. Identification moléculaire	98
IV.2.1.5.1. Extraction de l'ADN selon Pitcher et al., (1989).	98
IV.2.1.5.2. Identification des souches par la technique ERIC-PCR	99
IV.3. Caractérisation technologique des entérocoques	103
IV.3.1. Etude des aptitudes technologiques	103
IV.3.1.1. Pouvoir acidifiant, et cinétique de croissance	103
IV.3.1.2. Pouvoir coagulant	111
IV.3.1.3. Activité protéolytique	111
IV.3.1.4. Activité lipolytique et amylolytique	112
IV.3.1.5. Pouvoir texturant	113
IV.3.1.6. Pouvoir épaississant	114
IV.3.1.7. Pouvoir aromatisant	115
IV.3.1.8. Activité autolytique	115
IV.4. Caractérisation sanitaire des entérocoques	117
IV.4.1. Etude des caractères d'intérêt sanitaire	117
IV.4.1.1. Recherche de la gélatinase	117
IV.4.1.2. Recherche du type d'hémolyse (la cytolysine)	117
IV.4.2. Résistance aux antibiotiques (Antibiogramme).	118
IV.4.3. Recherche des gènes de virulence par la technique PCR multiplex	121
IV.4.4. Résultats d'amplification des gènes de résistance	124
IV.5. Discussion	132
VI. Conclusion générale	147
Perspectives	151
Références bibliographiques	152
Annexes	183
Publication	

Introduction générale

Introduction générale

"Anas dit :« O Messenger d'Allah ! Donne-nous un abri et de la nourriture. Le temps de Médine ne nous convient pas. Il les envoya à Al-Harra avec quelques-unes de ses chamelles et dit : « Buvez de leur lait » ... (**Sahih Albukhari ; Hadith n°233**)

Depuis longtemps, le lait de chamelle était l'un des principaux aliments disponibles dans les régions arides et semi-arides où il couvre une part substantielle des besoins nutritionnels quantitatifs et qualitatifs. Les populations indigènes ont longtemps, cru que le lait de chamelle est salubre et a même des vertus thérapeutiques. Cette observation empirique a été scientifiquement prouvée en démontrant l'activité antimicrobienne plus forte du lait de chamelle par rapport au lait d'autres femelles d'espèces animales et sa capacité à inhiber les agents pathogènes Gram positifs et Gram négatifs préoccupants la sécurité alimentaire (**Barbour & al., 1984**). Le lait de chamelle est consommé en tant que lait frais ou fermenté, ce produit a été longtemps ignoré et sous-estimé, et il n'a pas eu sa part de chance dans la recherche scientifique, quand en le comparant avec le lait de vache qui a été largement étudié. Les recherches menées jusqu'à présent sur le lait de chamelle ne couvrent pas tous les aspects, des études réalisées entre 1997 et 2009 se sont principalement concentrées sur la composition, les caractéristiques et les fonctionnalités du lait de chamelle (**Al haj & Al Kanhal, 2010**).

Néanmoins, les données sur la diversité microbienne du lait de chamelle restent insuffisantes. Le choix des entérocoques pour cette étude a été établi en fonction de leur capacité à résister à des conditions hostiles telles que le séchage, le stress thermique et l'irradiation UV qui prévalent dans les régions où les échantillons de lait de chamelle seront prélevés.

L'omniprésence des entérocoques dans la nature, et leur aptitude exceptionnelle à résister ou à se développer dans des environnements extraentériques hostiles leur permettent de coloniser diverses niches écologiques. Ce sont des bactéries commensales de la flore digestive sous-dominante et constituent une proportion importante des bactéries autochtones associées au tractus gastro-intestinal des mammifères. Ils se produisent également dans le sol, les eaux de surface, et sur les plantes et légumes. Chez l'homme, les entérocoques sont responsables d'infections similaires telles que des bactériémies opportunistes, des endocardites, des infections du tractus urinaire et des plaies chirurgicales, en particulier chez les patients immunodéprimés. Le séquençage des génomes d'*E. faecalis* et *E. faecium* a révélé la présence des facteurs de virulence et de

l'ADN exogène pouvant apporter une explication sur la façon dont ces bactéries ont fait la transition de commensaux aux pathogènes nosocomiaux.

En revanche, ces microorganismes sont considérés depuis des siècles comme des bactéries lactiques utilisées dans la transformation des aliments. Ils peuvent alors coloniser les aliments crus et se multiplier dans ces matériaux pendant la fermentation en raison de leur capacité à survivre dans des conditions environnementales défavorables telles que le pH extrême, les températures et la salinité. Ils peuvent être utilisés comme starter ou adjuvant ainsi que des cultures de bio-préservation dans l'industrie laitière. Les entérocoques ont également été utilisés comme probiotiques en raison de leurs possibilités de promouvoir la santé. Actuellement, très peu d'entérocoques isolés à partir de produits laitiers portent des facteurs de virulence potentiels et peuvent présenter des caractères pathogènes. En outre, le nombre des entérocoques résistants aux antibiotiques a augmenté au cours de la dernière décennie. Heureusement, ces caractéristiques inquiétantes dépendent de la souche.

Pour ces raisons, la sélection des souches entérocoques d'un intérêt dans l'industrie alimentaire devrait être basée sur l'absence de toute possibilité de propriétés pathogènes ou de gènes transférables de résistance aux antibiotiques ou de virulence. La surveillance par les techniques modernes d'analyse ainsi que la connaissance à jour de ces souches et de leurs propriétés aideront le transformateur et le consommateur à accepter des entérocoques dans leurs aliments.

L'emploi des entérocoques dans l'industrie alimentaire est de plus en plus controversé. Ils sont impliqués dans la fermentation de nombreux aliments, les entérocoques sont capables de produire diverses molécules antimicrobiennes (acide lactique, bactériocine ou encore peroxyde d'hydrogène). Ces propriétés les rendent indispensables à l'industrie agroalimentaire, ils doivent être minutieusement caractérisés et faire l'objet d'études préalables pour démontrer leur innocuité.

Eu égard à cet état des lieux, nous nous sommes proposé de réaliser une étude qui vise en premier lieu à avoir une meilleure connaissance du lait issu de populations de dromadaires implantés dans le Sud-Ouest algérien, précisément la région de Bechar. En second lieu, on a jugé nécessaire de faire une caractérisation des entérocoques, tant sur le plan technologique, que le plan sanitaire. Cette étude comprend les objectifs spécifiques suivants :

- a) Une analyse physicochimique et microbiologique du lait de chamelle prélevé dans la région de Bechar.

- b) Isolement et identification des entérocoques isolés de lait de chamelle, en utilisant des méthodes phénotypique et moléculaire.
- c) Etude des aptitudes technologiques des entérocoques isolés du lait de chamelle, et réaliser un discriminatoire pour élire les souches performantes.
- d) Caractériser la résistance aux antibiotiques phénotypique et génotypique des entérocoques, en recherchant les gènes de résistance à la vancomycine.
- e) Détecter la présence des gènes de virulence *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, *hyl* chez les isolats entérocoques, et déterminer la relation entre ces facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Aperçu sur le dromadaire

﴿أَفَلَا يَنْظُرُونَ إِلَى الْإِبِلِ كَيْفَ خُلِقَتْ﴾

الآية 17 من سورة الغاشية

I.1. Taxonomie et évolution du dromadaire

Le dromadaire ou le chameau a une seule bosse (*Camelus dromedarius*) est l'une des deux espèces du genre *Camelus*. Le mot dromadaire est un nom emprunté au latin tardif *dromedarius*, du grec ancien *dromados*, génitif de *dromas*, qui signifie « qui court ». L'autre est le chameau Bactriane ou le chameau a deux bosses (*Camelus bactrianus ferus*), ce nom leur a été donné par référence à la région de "Baktriane" située au nord de l'Afghanistan, où cette espèce était initialement implantée. Ces deux espèces sont particulièrement adaptées aux zones arides et désertiques : le chameau dans les montagnes asiatiques, le dromadaire dans les déserts chauds d'Afrique et d'Arabie (Lhoste, 1993).

L'un des principaux problèmes historiques qui aient été posés au sujet du dromadaire africain reste celui de son apparition et de son expansion à tout le nord du continent. Entre les restes fossiles qui remonte au Pléistocène moyen d'un chameau à deux bosses qui a été découvert en 1887 et en 1955 dans un gisement acheuléen dans une sablière du Sud oranais à Ternifine (Tighennif) wilaya de Mascara. Ce chameau fossilisé datant de quelques millions d'années a été défini par **Pomel (1893)** et lui donna le nom de *Camelus Thomasii*. Cette espèce, nettement plus grande que le *Camelus dromedarius*, va perdurer jusqu'au Pléistocène final, sans être jamais abondante. On l'a reconnue dans les gisements moustériens ou atériens du Puits des Chaachas (au sud de Tébessa), à El Guettar (région de Gafsa, Tunisie), à Kifan Bel Ghomari (Taza, Maroc) et sur le littoral algérien. A l'Holocène cette espèce aurait été remplacée par le *Camelus dromedarius*. Et la présence récente (moins de 2 000 ans) du dromadaire au Maghreb et au Sahara se situait un hiatus que seules la paléontologie, la préhistoire pouvaient combler en expliquant la présence dans le même site de deux espèces du même genre, l'une disparue, l'autre actuelle.

Curasson (1947), **Epstein (1971)** et **Lhote (1987)** rapportent que le dromadaire avait été introduit en Afrique du Nord (Egypte) à partir du sud-ouest de l'Asie (péninsule arabe et perse). Mais **Cauvet (1925)** pense que le dromadaire aurait bien pu avoir été domestiqué par les peuples d'Afrique en même temps que ceux d'Asie en témoignent les ossements fossiles de dromadaires trouvés en Afrique du Nord en même temps que les objets domestiques en pierre taillée de l'époque paléolithique. En effet ces ossements appartiennent aux dromadaires des races africaines dont le squelette et surtout la dentition sont très différents des races asiatiques venues probablement avec les conquêtes arabes à partir du XIe siècle (**Alou, 1985**).

Tableau 1 : Classification zoologique du dromadaire (Kadim & al., 2013).

Taxonomie	
Règne	Animal
Embranchement	Vertébrés
Classe	Mammifère
Sous classe	Placentaires
Ordre	Artiodactyles
Sous ordre	Tylopodes
Famille	Camélidés
Genre	<i>Camelus</i>
Espèce	<i>C. dromedarius</i>

Les chameaux, les lamas, et les Vigognes sont trois genres constituant la famille des camélidés. Les camélidés sont des mammifères vertébrés ongulés appartenant à l'ordre des artiodactyles sous-ordre des tylopodes. Ce sont la seule famille dans ce sous-ordre. Par conséquent, en dépit d'être des animaux ruminants, les camélidés ne figurent pas dans l'ordre des ruminants (Kadim et al., 2013).

I.2 Répartition géographique et effective camelin

a) Répartition mondiale

Il est difficile de déterminer exactement le nombre de chameaux dans le monde. Tout d'abord, cela est parce qu'il est principalement un animal des populations nomades qui se déplacent fréquemment. Deuxièmement, parce que les chameaux ne sont généralement pas soumis à la vaccination obligatoire. Ainsi, un recensement exhaustif pour les chameaux est assez difficile. Officiellement, le nombre total des chameaux dans le monde est d'environ 27 millions de têtes. La grande majorité de cette population (84%) sont des dromadaires (*Camelus dromedarius*). Le reste (6%) sont des chameaux à deux bosses (*Camelus bactrianus*) peuplant les régions froides de l'Asie (FAOstat, 2013) (figure 1 & 2).

Le dromadaire est, de tous les animaux domestiques, le mieux adapté aux régions chaudes, à climat désertique et subdésertique. Dans ces régions, son aire de distribution s'étend sur environ 20 millions de kilomètres carrés en Afrique au niveau des zones tropicales et subtropicales, des régions arides et semi-arides du nord de l'Afrique et jusqu'au sud-ouest de l'Asie (Cauvet, 1925 ; Hoste & Peyre de Fabrègues, 1984). Le dénominateur commun des climats de son aire de dispersion semble être la très

importante variabilité interannuelle de la faible pluviométrie, la longueur et la siccité extrême de la saison sèche et l'importante amplitude thermique, tant nycthémérale que saisonnière (**Peyre de Fabrègues, 1989**).

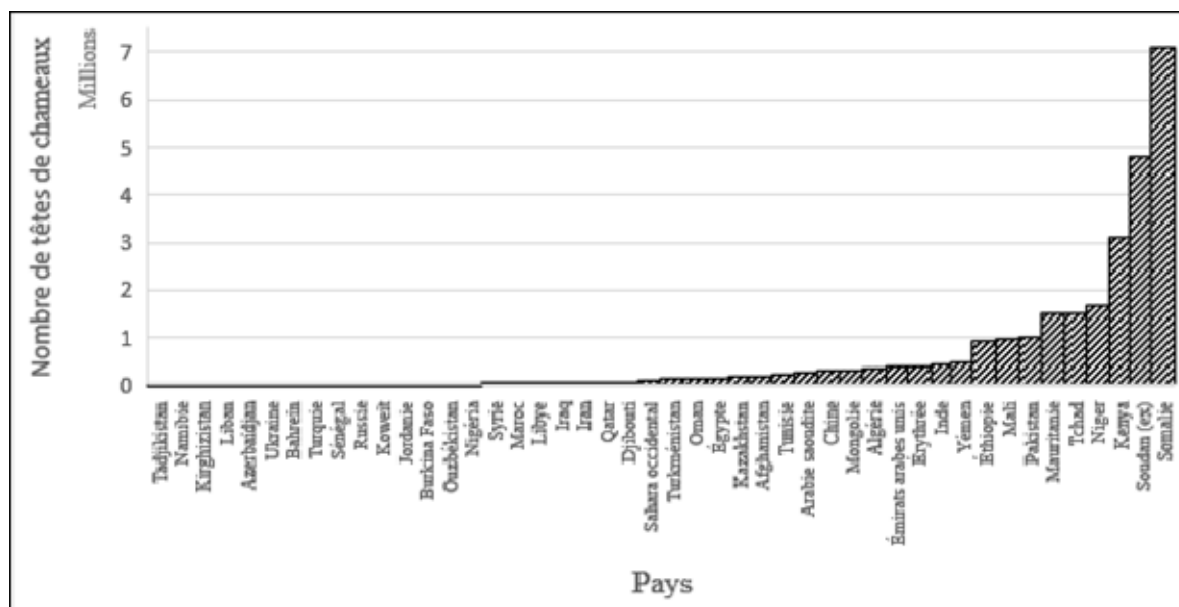


Figure 1 : Répartition mondiale de l'effectif camelin (**FAOstat, 2013**)

b) Répartition du dromadaire en Algérie

Le dromadaire est présent dans 17 Wilayas (8 sahariennes et 9 steppiques). L'effectif camelin algérien a été estimé par la FAO stat à 345000 têtes jusqu'à l'année 2013, ce chiffre situe tout de même l'Algérie au 14^{ème} rang mondial et au 6^{ème} rang du monde arabe. Le cheptel camelin est réparti sur trois principales zones d'élevage : le sud-est, le sud-ouest et l'extrême sud avec respectivement 52%, 18% et 30% de l'effectif total (voir figure 3). (**Abdelguerfi & Ramdane, 2003 ; FAOstat, 2013**)

I.3 Importance socioéconomique du dromadaire

Le dromadaire est un animal polyvalent, car il fournit des ressources alimentaires appréciables par sa viande, sa graisse, son lait. Son urine sert au traitement de certaines maladies. Sa peau, sa laine, ses excréments sont également utiles aux populations nomades (**Lhote, 1987 ; Diallo, 1989**). Mais son emploi essentiel est de servir de monture (selle) de tracter des charrues plus particulièrement sur les terrains sablonneux sa force est aussi mise à profit pour puiser l'eau des puits, et pour le bât (**Diallo, 1989**). Aucun autre animal domestique n'est en mesure de fournir autant de services variables que le dromadaire aux êtres humains.

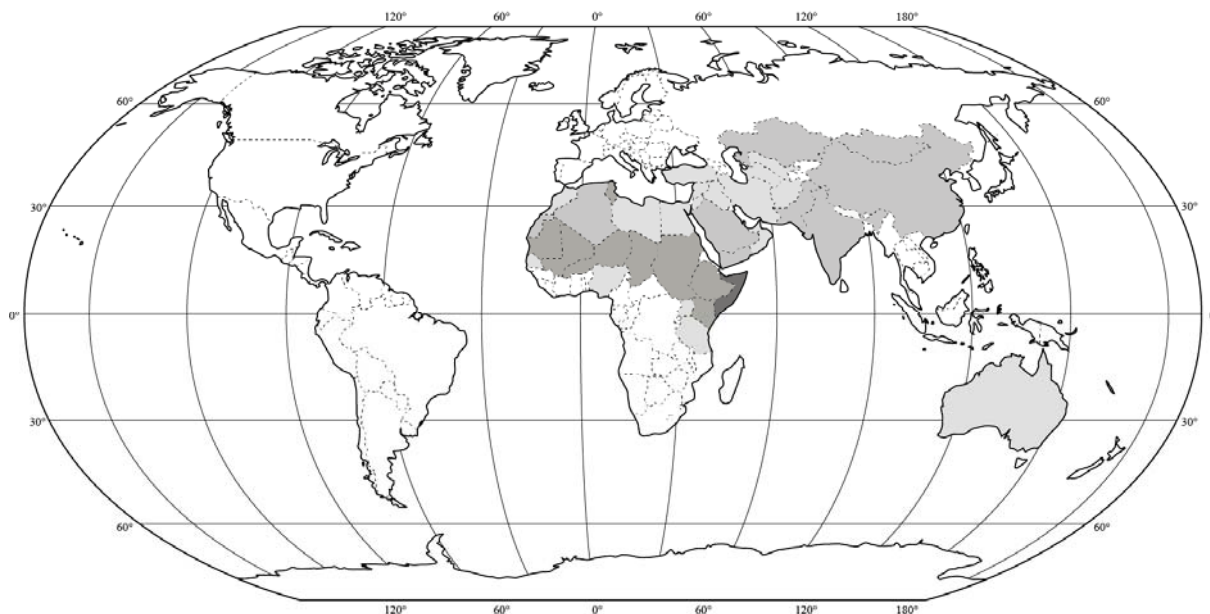


Figure 2 : Aire de dispersion du genre *Camelus*, la couleur foncée indique une grande population cameline (carte modifiée et adaptée) (FAO, 2009).

I.3.1 Le lait de chamelle

Les dromadaires, contrairement aux autres animaux sont capable dans des conditions de sécheresse extrême et en manque de pâturage de produire du lait durant l'année et en grandes quantités (Ellouze & Kamoun, 1989). La contribution de la chamelle à la production laitière mondiale est assez limitée (Faye, 2003). Selon les estimations de la FAO stat en 2013, la production mondiale de lait camelin n'est pas moins de 2.93 millions de tonnes, alors que la production mondiale du lait de chamelle disponible pour la consommation humaine a été évaluée à 1,3 million de tonnes, soit 500 fois moins que celle du lait de vache. Contrairement à la consommation de viande, celle du lait et de ses dérivés est beaucoup plus répandue et représente la ressource alimentaire la plus importante pour les sociétés pastorales nomades. En milieu pastoral, le lait de chamelle est très prisé à l'état frais. Il est aussi transformé en lait fermenté, car l'obtention de beurre ou de fromage est très difficile.

En Algérie, la production du lait de chamelle a occupé 0.5% de la production laitière totale durant la période allant de l'an 2000 à 2005 (Senoussi, 2011). D'après les estimations de la FAO stat en 2013, la production annuelle du lait de chamelle en Algérie était de 15000 tonnes (chiffre non officiel), ce qui classe l'Algérie au 13^{ème} rang mondial des pays producteurs. Néanmoins le potentiel de la production laitière cameline était toujours sous-estimé et insuffisamment exploité. Cette filière de lait de chamelle en Algérie semble du moins la plus négligée. La valorisation du lait de chamelle pourra servir de levier

pour la lutte contre la pauvreté et la sécurisation des revenus des pasteurs et agropasteurs camelins.

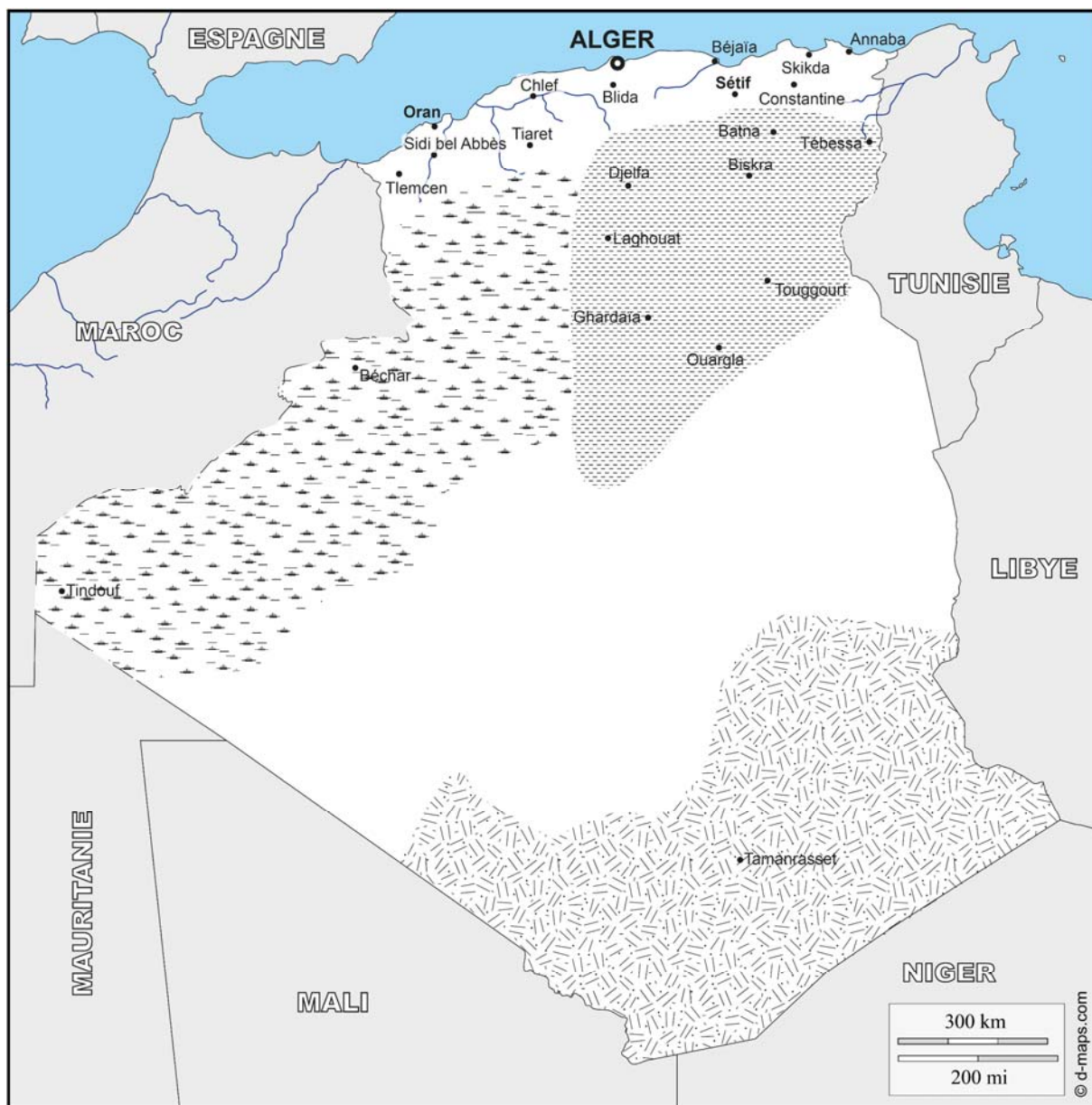


Figure 3 : Répartition du dromadaire en Algérie (carte adaptée et modifiée à partir de d-maps.com et selon les données de Ben Aissa, 1989 ; Abdelguerfi & Ramdane, 2003)

I.3.1.1. Propriétés organoleptiques et physico-chimiques

Le lait de chamelle, est un liquide blanc opaque, à la traite et lors des transvasements il forme une mousse en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, avec un gout assez doux légèrement âpre, acide, sucré et parfois même salé, il a aussi un aspect plus visqueux que le lait de vache. Cette variabilité dans le goût est liée au type de plantes désertiques broutées, du régime alimentaire de la chamelle ainsi qu'à la disponibilité en eau [Sbouï & al., 2009 ; Siboukeur, 2008 ; Kamoun, 1995]. La viscosité du lait de chamelle à 20° C est de 1,72 mPa.s, tandis que la viscosité du lait de vache sous les mêmes conditions est de 2,04 mPa.s [Omar & al., 2010]. Le pH du lait camelin se situe autour de $6,68 \pm 0,12$ et l'acidité est de l'ordre de 15° Dornic [Ghennam & al., 2007].

La densité moyenne de lait de chamelle est $1,028 \pm 0,002 \text{ g.cm}^{-3}$ [Kamoun, 1995 ; Alloui-Lombarkia & al., 2007], et son point de congélation varie entre $-0,53 \text{ °C}$ à $-0,61 \text{ °C}$ [Hassan & al., 1987].

Comme la vache, la chamelle a une mamelle à quatre quartiers. La période de lactation varie de 9 à 18 mois, et les rendements laitiers calculés varient de 735 à 1675 kg par 305 jours, en fonction de l'individu, la race, le stade de lactation, et l'alimentation... [Yagil, 1982]. La valeur calorique du lait de chamelle (665 kcal / L) est presque similaire à celle du lait de vache (701 kcal / L) [El-Agamy, 2009].

La composition en éléments essentiels du lait de chamelle (en g / 100 ml) selon les données de la littérature est de $3,82 \pm 1,08$ pour la matière grasse, $3,35 \pm 0,62$ pour les protéines totales, $4,46 \pm 1,03$ pour le lactose, $12,47 \pm 1,53$ pour la matière sèche et $0,79 \pm 0,09$ pour les cendres. [Konuspayeva, 2009]

Tableau 2 : Les concentrations moyennes des minéraux dans le lait de chamelle, de la vache, et de la femme. (mg / 100g) [Kenji, 2013]

Minéraux	Chamelle	Vache	Femme
Ca	114	120	31
Mg	11	12	2.7
Na	59	51	12
K	156	137	64
P	55	65	7.8
Zn	0.59	0.4	0.15
Mn	0.005	0.003	0.001
Fe	0.29	0.03	0.047

Les sels minéraux du lait de chamelle sont présentés dans le **(Tableau 2)**, On y dénombre en effet des macros et des oligo-éléments qui se trouvent sous forme de sels (phosphates, chlorures et citrates) ou de métaux divers (sodium, potassium, magnésium, calcium, fer, cuivre, zinc...etc.). En général la composition en macroéléments (Na, K, Ca, Mg...) est relativement similaire à celle du lait bovin, cependant le lait camelin se caractérise par des taux plus élevés en oligo-éléments **(Ellouze & Kamoun, 1989 ; Kamoun, 1989 ; Alloui-Lombarkia & al., 2007 ; Siboukeur, 2008; Sboui & al., 2009)**.

Le lait de dromadaire a été signalé pour contenir diverses vitamines, telles que la vitamine C, A, E, D et du groupe B, et se singularise par sa richesse relative en vitamines B3 (niacine) et en vitamine C **(Tableau 3)**. Même si des variations importantes (de 25 à 60 mg/l) de la teneur de cette dernière dans le lait camelin sont rapportés, il n'en demeure pas moins que les teneurs signalées sont en moyenne trois fois plus élevées que celles présentes dans le lait de vache **(Omar, 2010)**.

Tableau 3 : Les concentrations moyennes des vitamines dans le lait de chamelle, de la vache, et de la femme. (mg /kg) **(Kenji, 2013)**

Vitamines	Chamelle	Vache	Femme
A	0.21	0.28	0.55
B1 (thiamine)	0.41	0.59	0.15
B2 (riboflavine)	1.1	1.6	0.38
B3 (niacine)	0.78	0.7	1.7
B5 (acide pantothénique)	2.3	3.8	2.7
B6 (pyridoxine)	0.54	0.5	0.14
B7 (biotine)	ND	0.04	0.01
B9 (acide folique)	0.0046	0.055	0.042
B12	0.0053	0.009	0.0005
C	140	13	40
D	0.003	0.009	0.014
E	0.18	0.6	8

I.3.1.2. Propriétés thérapeutiques du lait de chamelle

Le lait de chamelle est apprécié traditionnellement pour ses propriétés anti-infectieuse, anti-cancéreuse, antidiabétique et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents **(Konuspayeva, 2007)**. Les allégations santé de ce lait, peuvent être attribuées à certains de ses composants, richesse en acides gras insaturés,

acides aminés essentiels, vitamine C et en protéines à activité antimicrobienne puissante. (Konuspayeva & al., 2004).

Tableau 4 : Différentes études entreprises sur les effets thérapeutiques du lait de chamelle.

Aspect étudié	Effet observé et interprétations	Auteurs
Diabète	Hypoglycémie (teneurs élevées d'insuline dans le lait)	(Sboui & al., 2009)
Complications du diabète	Diminution du stress oxydatif et prévention des néphropathologies (teneurs élevées en antioxydants)	(Senoussi, 2011)
Allergies au lait	Effet hypoallergique (absence de la β -Lg et présence d'une caséine α S différente de la caséine bovine)	(Konuspayeva, 2007)
Infections	Effet anti-infectieux (activité antibactérienne et antivirale)	(Vignola, 2003)
Tumeurs	Effet anti-tumoral (contrôle des processus tumoraux par stimulation de la défense immunitaire)	(Konuspayeva & al., 2004).
Toxicité aux métaux lourds	Effet protecteur contre la toxicité aux Aluminium et Cadmium	(Senoussi, 2011)

I.3.2. Flore microbienne du lait de chamelle

En termes de microbiologie, le lait de chamelle n'a jamais été étudié à large spectre, les travaux réalisés sont cités aux doigts, et ne couvre pas tous les aspects microbiologiques. Ces travaux éparpillés ne touchent que quelques groupes de microorganismes d'intérêt technologique ou sanitaire. Le **tableau 5** résume quelques travaux de recherche réalisés, sur des microorganismes isolés du lait de chamelle, en particulier des bactéries lactiques.

Tableau 5 : Bactéries lactiques isolées à partir du lait cru et du lait fermenté de dromadaire.

Origine du lait	Espèces	Références
Algérie Lait cru de chamelle	<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetyllactis</i>	Hassaine & al. (2007), Drici & al. (2010)
Algérie Shmen beurre à base du lait de chamelle	<i>E. faecium</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetyllactis</i> , <i>Leu. gelidum</i> , <i>Leu. Pseudomesenteroides</i>	Kacem & Karam (2006)
Maroc Lait cru de chamelle	<i>E. casseliflavus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. halophilus</i> , <i>P. paravulus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Strep. bovis</i> , <i>Strep. salivarius</i> , <i>Strep. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lb. amylophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. garviae</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetyllactis</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> , <i>Leu. lactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i>	Benkerroum & al. (2003), Khedid & al. (2009)
Inde Fromage à base du lait de chamelle	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Nanda & al. (2011)
Sudan Gariss lait fermenté à base de lait de chamelle	<i>E. faecium</i> , <i>Strep. bovis</i> , <i>Strep. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> , <i>Lb. animalis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. divergens</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lc. alimentarium</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. Raffinolactis</i>	Suliman & al. (2006), Abdelgadir & al. (2008) Ashmaig & al. (2009)
Kenya Suusac lait fermenté à base de lait de chamelle	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lc. raffinolactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i>	Lore & al. (2005)

E, *Enterococcus*; *Lb*, *Lactobacillus*; *Lc*, *Lactococcus*; *Leu*, *Leuconostoc*; *P*, *Pediococcus*; *Strep*, *Streptococcus*; *W*, *Weissella*

Chapitre II

Les entérocoques

﴿قَالَ أَقْسِمُ بِمَا تُبْصِرُونَ * وَمَا لَا تُبْصِرُونَ * إِنَّهُ لَقَوْلُ رَسُولٍ كَرِيمٍ * وَمَا هُوَ بِقَوْلِ شَاعِرٍ قَبِيلًا مَا تُؤْمِنُونَ * وَلَا يُقْوِي كَاهِنٍ قَبِيلًا مَا تَدَّكُرُونَ * نَسْرِيلُ مِنْ رَبِّ الْعَالَمِينَ﴾

(سورة الحاقة الآيات : 38-43)

II. Les entérocoques

Les entérocoques sont des microorganismes procaryotes ubiquitaires, appartenant au cocci à Gram positif, catalase négative, anaérobie facultatif, non sporulant. Ils sont le plus souvent considérés comme des composants de la flore intestinale des humains et des animaux qui agissent comme des agents pathogènes opportunistes dans différents compartiments extra-intestinaux de l'organisme. Ils ont reçu ces dernières années une attention considérable dans la bactériologie médicale en raison de leur rôle croissant dans les infections nosocomiales. Un facteur important contribuant à ce phénomène a sans aucun doute été leur résistance naturelle (intrinsèque) et acquise aux antibiotiques fréquemment utilisés. Paradoxalement, ils sont considérés comme des bactéries lactiques utilisées depuis des siècles dans la transformation des aliments. Impliqués dans la fermentation de nombreux aliments (lait, végétaux, viandes et poissons), ils sont capables de produire diverses molécules antimicrobiennes (acide lactique, bactériocine ou encore peroxyde d'hydrogène). Ces propriétés les rendent indispensables à l'industrie agro-alimentaire.

Ce genre bactérien produit une grande diversité de bactériocines, considérées comme des agents de contrôle biologique dans les aliments, en conservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Elles constituent ainsi une alternative à l'utilisation d'additifs chimiques ou à celle de traitements physico-chimiques employés dans la conservation des produits alimentaires (Aguilar-Galvez, 2010).

Dans ce chapitre on essayera de faire une recension des connaissances et de développer les différents aspects sanitaires et technologiques des entérocoques.

II.1 Taxonomie

Le terme entérocoque a été utilisé la première fois par **Thiercelin (1899)** pour décrire un diplocoque Gram-positif d'origine intestinale qui se présente sous forme de paires ou en petites chainettes. Ce microorganisme a été inclus dans le genre *Streptococcus* comme *Strep. faecalis* par **Andrewes & Horder (1906)**. Une deuxième espèce fécale décrite comme *Strep. faecium* par **(Orla-Jensen, 1919)** a été trouvée pour avoir des caractéristiques similaires. Bien que ces micro-organismes, ainsi que deux autres espèces, *Strep. durans* et *Strep. avium*, ont été plus tard reconnus par **Sherman (1937)** pour former un groupe distinct au sein du genre *Streptococcus*, leur position taxonomique est demeurée inchangée jusqu'en **Kalina (1970)**, en soulignant les différences morphologiques, biologiques et sérologiques, a proposé qu'ils devraient être placés dans un nouveau genre, entérocoque. Cela a été largement accepté lorsque les études

moléculaires et chimio taxinomiques confirment les différences par rapport aux autres streptocoques (**Schleifer & Kilpper-Balz, 1984**).

Le genre *Enterococcus* a été séparé du genre *Streptococcus* sur la base des résultats d'hybridation ADN-ADN et des études d'hybridation ADN-ADNr (**Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984**). Dans d'autres études subséquentes de l'ADNr 16S (**Ludwig & al., 1985 ; Schleifer & Kilpper-Balz, 1987**) non seulement ont confirmé cette séparation, mais ont également démontré que les entérocoques différaient également du genre *Lactococcus* et certains autres cocci à Gram positif. Les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* sont plus distants par rapport au genre *Enterococcus* que sont les cocci ou les bâtonnets des genres *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Melissococcus*, *Eremococcus*, *Ignavigranum*, et *Abiotrophia*. En effet, selon l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S les genres *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* sont inclus dans une nouvelle famille, *Enterococcaceae*, dans l'ordre *Lactobacillales*.

Plus récemment, des séquences complètes du génome pour de nombreuses *E. faecalis* et *E. faecium*, ainsi que des séquences de quelques autres espèces, sont devenues disponibles. Les résultats des analyses génétiques (études des ARNr 16S et de l'espace intergénique 16S-23S) suggèrent que le genre *Enterococcus* est hétérogène et qu'il existe environ 5-6 grands groupes d'espèces au sein de ce genre. Toutefois, la composition de ces groupes est différente selon les techniques utilisées et selon les auteurs. Selon **Švec & Devriese, (2009)** in Bergey's manual, le genre *Enterococcus* est constitué des groupes : (1) *E. faecalis*, (2) *E. avium*, (3) *E. faecium*, (4) *E. cecorum*, (5) *E. gallinarum*, (6) *E. italicus*. Les espèces *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. canintestini*, *E. dispar*, *E. hermanniensis*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus* constituent des groupes distincts (**voir tableau 6**).

Tableau 6 : Groupes phylogénétiques des espèces du genre *Enterococcus* selon les analyses génétiques de l'ARNr 16S et de l'espace intergénique 16S-23S (Švec & Devriese, (2009) in Bergey's manual)

Groupes						Groupes phylogénétiquement distincts
1	2	3	4	5	6	
<i>E. faecalis</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. italicus</i>	
<i>E. faecalis</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. italicus</i>	<i>E. aquimarinus</i>
<i>E. caccae</i>	<i>E. devriesei</i>	<i>E. canis</i>				<i>E. asini</i>
<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. gilvus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. camelliae</i>	<i>E. canintestini</i>
<i>E. moraviensis</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. hirae</i>				<i>E. dispar</i>
<i>E. silesiacus</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. mundtii</i>				<i>E. hermanniensis</i>
<i>E. termitis</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. ratti</i>				<i>E. pallens</i>
		<i>E. villorum</i>				<i>E. phoeniculicola</i>
						<i>E. saccharolyticus</i>
						<i>E. sulfureus</i>

Donc selon le Bergey's manuel de la bactériologie systématique, la deuxième édition publiée en 2009, le genre *Enterococcus* est classé dans la famille, *Enterococcaceae*, ordre, *Lactobacillales*, classe des *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Dans ce genre en compte 34 espèces officiellement identifiées et classées, et depuis lors d'autres espèces d'entérocoques ont été publiées, actuellement une cinquantaine d'espèces sont décrites.

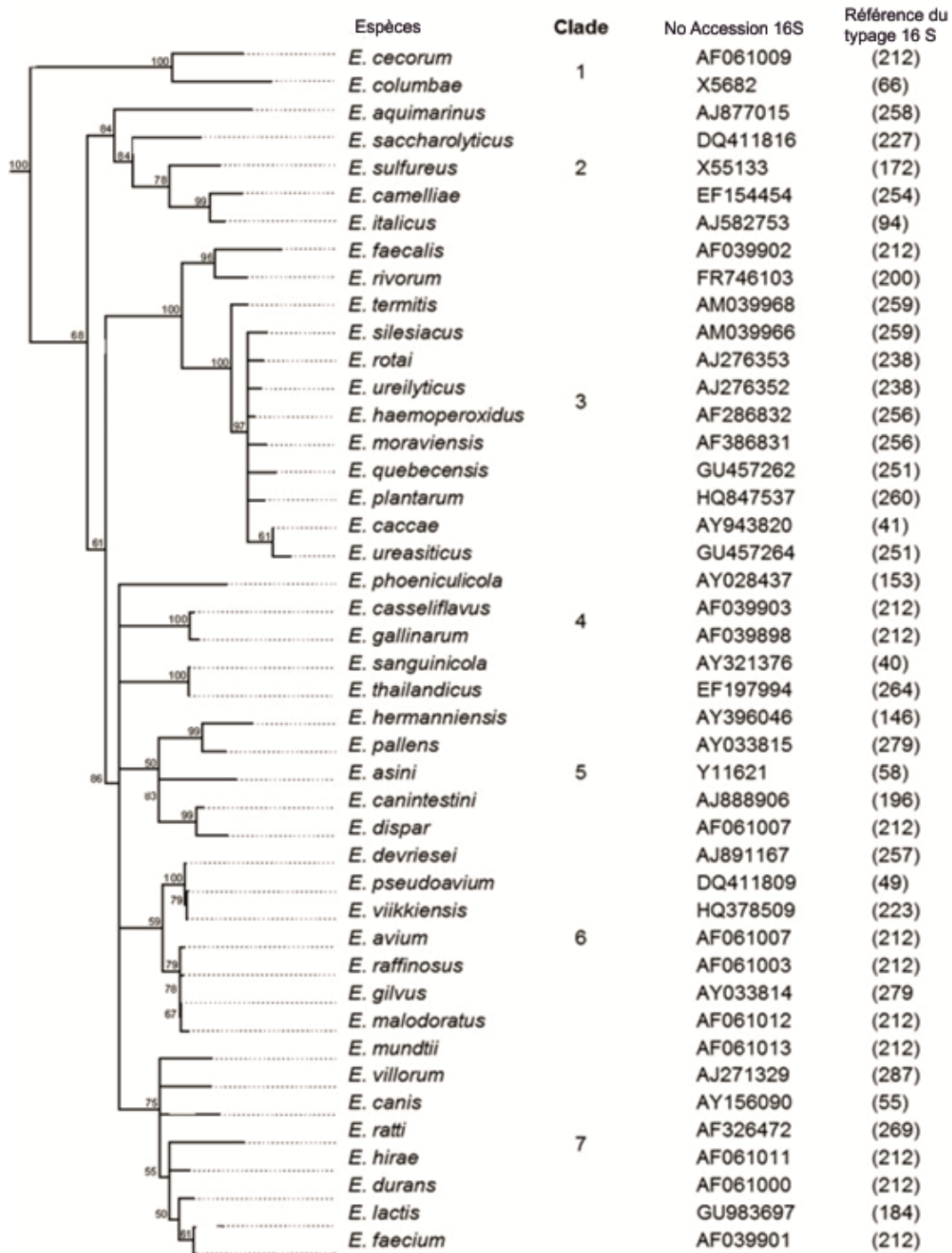


Figure 4 : Dendrogramme du genre *Enterococcus*. Ce dendrogramme des séquences des gènes ARNr 16S disponibles pour les membres du genre *Enterococcus* a été compilé en utilisant l'algorithme « neighbour-joining » par le logiciel Geneious (Biomatters Ltd) et la séquence 16S de *Tetragenococcus solitarius* utilisée comme groupe externe de comparaison. Les valeurs bootstrap ont été générées sur 1000 itérations. (Gilmore & al., 2013)

II.2 Description du genre *Enterococcus*

Des bactéries à Gram positif. Les cellules sont ovoïdes, isolées ou regroupées en paires ou en courtes chaînes, et sont souvent allongées dans la direction de la chaîne. Non sporulantes. Généralement immobiles sauf quelques rares espèces (*E. casseliflavus* et *E. gallinarum*). Certaines espèces donnent une pigmentation jaune. Anaérobie facultatif. Certaines espèces nécessitent une atmosphère enrichie en CO₂ (CO₂-dépendant). Catalase négative, mais certaines souches révèlent une activité pseudo-catalase lorsqu'elles sont cultivées sur milieu gélosé contenant du sang. L'activité hémolytique est variable et largement espèce-dépendante. La croissance optimale de la plupart des espèces d'entérocoques est de 35 °C à 37 °C. Beaucoup, mais pas toutes les espèces sont capables de croître à 42°C et même à 45 °C, et lentement à 10 °C. Ils sont très résistants à la dessiccation **(Kalina, 1970)**.

Ce sont des chimio-organotrophes, requiert des nutriments complexes, ont un métabolisme fermentaire, de type homofermentaire ou le produit final prédominant de la fermentation du glucose est la L (+) - acide lactique. Les entérocoques font partie d'un groupe de microorganismes nommés bactéries à acide lactique produisant des bactériocines. Une de leurs caractéristiques consiste en un faible contenu G+C% de 35.1 – 44.9 mol%. **(Švec & Devriese, 2009)**

Nombres de caractéristiques sont communes à toutes les espèces décrites, bien que rares exceptions peuvent se produire et certains résultats de tests n'ont pas encore été déterminés pour les espèces les moins connues: résistance à 40% (v/v) de la bile, la production de β -glucosidase, leucine arylamidase, hydrolyse d'esculine, la production d'acide à partir de la N-acétylglucosamine, amygdaline, arbutine, le cellobiose, le D-fructose, le galactose, le β -gentiobiose, le glucose, le lactose, le maltose, le D-mannose, le méthyl β -D-glucoside, le ribose, de la salicine et le tréhalose. Les tests suivants sont pour la plupart négatifs : l'uréase, la production d'acide à partir d'arabinose D-érythritol, D- et L-fucose, le méthyl- α -d xyloside et L-xylose. Il convient de noter que certaines caractéristiques traditionnellement considérées comme typiques du genre ne sont pas applicables à plusieurs espèces décrites plus récemment : antigène de groupe Lancefield D, la résistance à l'azoture de sodium à 0,4% ou 6,5% de NaCl, la croissance à 10 ° C et 45 ° C, la production de pyrrolidonyl arylamidase et de l'acétoïne.

L'espèce type de ce genre est *Enterococcus faecalis* **(Andrewes & Horder, 1906 ; Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984)**

II.3 Habitat

Les entérocoques sont caractérisés par des propriétés intrinsèques qui leur permettent de se répondre un peu partout dans la nature. Ils sont largement répartis entre le tube digestif de l'homme, les autres mammifères, les oiseaux, les reptiles, les insectes, les plantes, le sol et l'eau. Le fait qu'ils sont une partie essentielle de la microflore intestinale de l'homme et des animaux leur distribution est très similaire dans ces sources. *E. faecium* et *E. faecalis* prédominent dans le tractus gastro-intestinal humain, *E. faecium* chez les animaux et *E. mundtii* et *E. casseliflavus* dans les sources végétales **(Klein, 2003)**.

Chez l'homme, les entérocoques sont considérés comme les principaux membres de la flore intestinale, présents à des concentrations entre 10^5 - 10^7 UFC/ gramme de matières fécales. Leur nature auxotrophe (nécessitant jusqu'à neuf acides aminés et plusieurs vitamines) suggère que les entérocoques se sont développés dans un contexte des relations hautement co-évolutives avec d'autres organismes, et ceci pour assurer leurs besoins nutritionnels. Cela ne veut pas dire que les entérocoques ne sont pas compétitifs, car ils sécrètent un large assortiment de peptides antimicrobiens, appelés entérocoques, qui interfèrent avec la croissance des bactéries lactiques et d'autres bactéries Gram positives. **(Švec & Devriese, 2009)**

Un fait très intéressant, dans certains cas pathologiques, l'équilibre bien aiguisé de la flore intestinale peut être modifiée. Par exemple, les patients atteints de colite ulcéreuse seront colonisés par un nombre plus élevé d'entérocoques, par rapport aux individus sains. Alors que l'habitat naturel des entérocoques chez l'homme est considéré comme le tractus gastro-intestinal inférieur, ils sont capables de coloniser une variété de sites, y compris la partie supérieure du tractus gastro-intestinal, les voies génitales inférieures, les voies génitales supérieures et de la cavité buccale, y compris la salive, la langue, la muqueuse vestibulaire et la plaque dentaire. **(Devriese & al., 2006)**

Des études sur les animaux ont montré que les facteurs de l'hôte influencent aussi la colonisation. Comme chez les humains, il apparaît également qu'une espèce entérocoques prédomineront dans un hôte spécifique. Par exemple, *E. faecium* est isolé plus fréquemment chez les bovins que *E. faecalis*, de même pour *E. hirae* chez les chats. Cet équilibre peut être influencé par le régime alimentaire ou l'âge de l'hôte.

Les entérocoques pigmentés ont été proposés pour avoir une relation épiphytique avec les plantes. Beaucoup affirment que les entérocoques ne sont pas indigènes dans le sol ou l'eau, et leur présence représente une contamination provenant de sources

animales ou végétales. Pour cette raison, malgré le fait qu'*E. casseliflavus* et *E. gallinarum* ont été isolés à partir des voies digestives et la face extérieure des insectes, on ne sait pas si cela est leur habitat naturel. **(Collins & al., 1984)**

Leur capacité à survivre pendant de longues périodes sur une variété d'objets inanimés et en plein soleil suggère qu'ils peuvent être un meilleur indicateur de la pollution fécale dans les eaux récréatives que les coliformes. Bien qu'un certain nombre de rapports ont lié les entérocoques aux incidents d'intoxication alimentaire, cette association n'a pas été étayée. En effet, cela peut se révéler difficile, car de nombreux aliments sont contaminés par des entérocoques

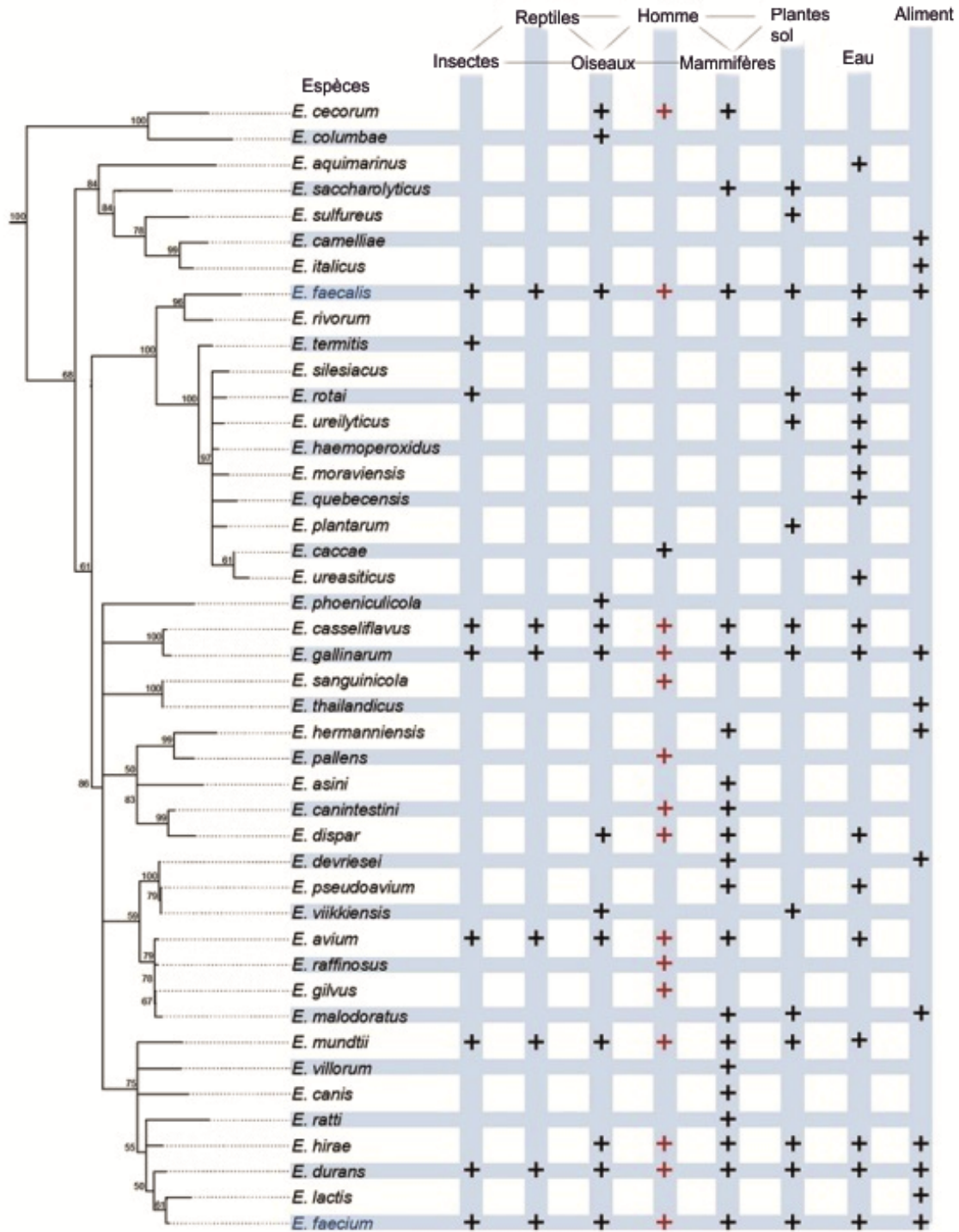


Figure 5 : Répartition dans la nature des espèces du genre *Enterococcus*. Le dendrogramme montre les relations phylogénétiques. Les sources d'isolement sont indiquées pour chaque espèce. Une chaîne alimentaire simplifiée est montrée. Symboles rouges et noirs indiquent les espèces qui ont été décrites dans les infections humaines ou la colonisation, respectivement. (Gilmore & al., 2013)

II.4. Rôles et applications des entérocoques

II.4.1. Indicateurs de contamination fécale

En raison de leur ubiquité dans les matières fécales humaines et de leur habilité à résister aux différentes conditions physicochimiques et à survivre dans l'environnement, les entérocoques ont été adoptés comme indicateurs de pollution fécale humaine de l'eau potable et des aliments. Plus récemment, du fait de leurs densités sur les mains humaines on les utilise comme indicateurs de l'hygiène des mains. Cependant l'utilisation des entérocoques comme indicateurs de pollution ou de contamination fécale humaine peut être problématique, parce que les entérocoques sont également présents dans les excréments des animaux [Harwood & al., 2000 ; Layton & al., 2010], dans les sols [Fujioka & Byappanahalli, 2004 ; Goto & Yan, 2011], ainsi que sur les plantes

II.4.2. Applications des entérocoques dans les produits laitiers

L'utilisation des entérocoques dans les fromages est très controversée. Les études sur la microflore des fromages traditionnels dans les pays méditerranéens, qui sont produits principalement à partir du lait cru de brebis ou de chèvre, et moins fréquemment à partir de lait de vache, ont indiqué que les entérocoques jouent un rôle important dans la maturation de ces fromages, probablement par la protéolyse, la lipolyse, et l'utilisation du citrate, contribuant ainsi à leur goût et leur saveur typique, Ils sont également présents dans d'autres produits alimentaires fermentés, telle que les saucisses [Franz et al., 1999a, 2003 ; Giraffa, 2002; Hugas & al., 2003] et les olives [Fernandez-Diaz, 1983; Franz & al., 1996, 1999a ; Floriano & al., 1998 ; Ben Omar & al., 2004]. Les entérocoques ont la capacité de produire des bactériocines « entérocoques », qui sont de petits peptides avec une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positives étroitement apparentés, y compris d'altération ou les bactéries pathogènes telles que *Listeria* [De Vuyst & Vandamme., 1994]. En outre, les entérocoques sont utilisés dans certains pays comme probiotiques.

a) Comme culture starter

La découverte des souches *E. faecium* et *E. faecalis* isolés de divers fromages, avec un bon pouvoir acidifiant et/ou des propriétés protéolytiques [Wessels & al., 1990 ; Centeno & al., 1999 ; Suzzi & al., 2000] et l'isolement fréquent des entérocoques à partir de culture starter naturel utilisées pour la fabrication de fromages traditionnels [Gatti & al., 1994 ; Villani & Coppola, 1994 ; Giraffa et al., 1997] ont encouragé certaines applications de ces micro-organismes comme des cultures starter primaires. Cependant, depuis le début des

travaux sur le fromage cheddar (**Dahlberg & Kosikowski, 1948 ; Thunell & Sandine, 1985**), aucun rapport de recherche important n'a été rapporté. Par conséquent, le pouvoir acidifiant généralement faible et l'absence des activités protéolytiques font que les entérocoques ont une importance mineure comme culture starter primaire dans la fabrication du fromage.

b) Les entérocoques en tant qu'adjuvants

Les cultures adjuvantes peuvent être définies comme ceux qui sont ajoutés au fromage à des fins autres que la formation d'acide qui est exclusivement consacré à la culture starter. Des cultures adjuvantes non starters sélectionnés peuvent être ajoutées pour accélérer la maturation, pour produire la sapidité souhaitable, ou à agir en tant que probiotiques. Plusieurs travaux de recherche ont été menés pour évaluer les fonctionnalités technologiques des entérocoques sélectionnés dans la production de fromage. *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* sont des souches qu'ils ont été proposées en combinaison avec d'autres souches lactiques mésophiles et thermophiles dans le cadre de formuler des cultures starters pour différents fromages européens tels que les fromages italiens à pâte demi-cuite (**Neviani & al., 1982**), Mozzarella (**Coppola & al, 1988 ; Parente & al., 1989 ; Villani & Coppola, 1994**), Feta (**Litopoulou-Tzanetaki & al., 1993 ; Sarantinopoulos & al, 2002a**), Venaco (**Casalta & Zennaro, 1997**), Cebreiro (**Centeno & al., 1999**) et Hispánico (**Oumer & al., 2001**). En général, l'ajout des entérocoques en tant qu'adjuvant le long du processus de la maturation a affecté positivement le goût, l'arôme, la couleur, la structure, ainsi que le profil sensoriel global, des fromages entièrement mûrs.

Plusieurs fromages européens sont caractérisés par une flore bactérienne de surface complexe, constitués généralement de levures, de bactéries corynéformes, et microcoques ou staphylocoques à coagulase négative. Cependant, même les entérobactéries et les entérocoques sont souvent présents comme contaminants mineurs (**Bockelmann, 2002**). Dans une investigation récente sur la flore bactérienne de surface des fromages lors de la maturation, différentes souches *Enterococcus spp* colonisent la croûte du fromage ont été trouvés. La moitié de ces souches ont montré une activité inhibitrice contre les souches de *Listeria* et ont été signalée comme des candidats prometteurs pour la formulation d'une flore de surface pour la maturation de certains types de fromage. Récemment, *E. faecium* PR88 a été utilisé comme culture probiotique adjuvante dans le fromage Cheddar. La souche PR88, qui possèdent les propriétés requises

d'un microorganisme probiotique, y compris la capacité à soulager le syndrome du côlon irritable, l'origine intestinale, non pathogène, et la tolérance à la bile et à l'acide (**Hunter et al., 1996**), a été utilisée comme adjuvant starter. Par rapport au témoin, une augmentation de la protéolyse, et des niveaux plus élevés de certains composés volatils odorants actifs a été observée dans les fromages contenant l'additif PR88 tout au long de la période d'affinage. La souche a maintenu la viabilité dans le fromage Cheddar pendant 9-15 mois d'affinage à 8 °C.

Enfin, le Comité consultatif sur les nouveaux aliments et processus a décidé d'autoriser l'utilisation de la souche d'*E. faecium* K77D comme une culture starter dans les produits laitiers fermentés (**ACNFP, 1996**).

c) Les entérocoques en tant que probiotiques

La définition d'un probiotique a évolué avec la compréhension croissante des mécanismes par lesquels il influe sur la santé humaine (**De Vuyst & al., 2004**). Par conséquent, un probiotique peut être décrit comme une préparation ou un produit contenant une culture simple ou mixte des microorganismes viables, en concentration définie et suffisante, capables d'altérer la flore microbienne (par implantation ou colonisation) dans un compartiment de l'hôte et qui exercent des effets bénéfiques pour la santé dans cet hôte (**De Vuyst & al., 2004**). Ils sont appliqués dans les aliments tels que le yaourt, les laits et laits fermentés, les préparations pour nourrissons et dans des préparations pharmaceutiques.

Les effets revendiqués par les probiotiques comprennent : l'antagonisme contre les agents pathogènes d'origine alimentaire, l'amélioration de la réponse immunitaire, l'équilibre de la flore colique, les activités antimutagènes et anticarcinogènes, le traitement de la diarrhée du voyageur et celle causée par les antibiotiques, et la prévention des ulcères liés à *Helicobacter pylori*. Les probiotiques sont également impliqués dans le renforcement de la barrière intestinale, la réduction du taux de cholestérol sérique, l'amélioration des symptômes de malabsorption du lactose ainsi que la candidose et les infections des voies urinaires (**Saavedra, 2001**).

Les souches probiotiques les plus utilisées pour l'homme ont une origine gastro-intestinale humaine et le plus souvent appartiennent à des espèces des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Cependant, des souches appartenant à d'autres espèces lactiques, y compris les entérocoques, ont aussi été utilisées dans le passé en tant que probiotiques (**Fuller, 1989 ; O'Sullivan & al., 1992 ; Holzapfel & al., 1998**). Depuis février 2004, 10 préparations (9 souches différentes d'*E.*

faecium) sont autorisées comme additifs alimentaires pour les animaux dans l'Union européenne (**Commission européenne, 2004**).

Une souche *Enterococcus* bien étudiée (la souche *E. faecium* SF 68) produite en Suisse a été utilisée comme probiotique (**Cylactin \ LBC SF68 ME10, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Bâle, Suisse**) pour la prévention de la diarrhée causée par les antibiotiques et dans le traitement de la diarrhée chez l'enfant (**Wunderlich & al., 1989**).

Rossi et al. (1999) ont utilisé la souche *E. faecium* CRL 183 pour le développement d'un nouveau produit de lait de soja fermenté avec des potentialités probiotiques. La souche *Faecium* CRL 183 en combinaison avec *Lactobacillus jugurti* ont entraîné une diminution de 43% du cholestérol in vitro.

L'utilisation des entérocoques comme probiotiques reste une question controversée. Bien que les avantages de certaines souches probiotiques soient bien établis, l'émergence et l'association accrue des entérocoques aux maladies humaines et la multirésistance aux antibiotiques ont soulevé des inquiétudes quant à leur utilisation comme probiotiques. La crainte que les gènes de résistance aux antimicrobiens ou des gènes codant pour des facteurs de virulence puissent être transférés à d'autres bactéries dans le tractus gastro-intestinal contribue à cette controverse (**Franz et al., 2003**).

II.5. Propriétés biochimiques des entérocoques d'intérêt technologique

II.5.1. Le pouvoir acidifiant

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries des levains de fromagerie est leur aptitude à l'acidification du lait qui dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acidité développée. Plusieurs travaux sur l'aptitude des entérocoques à acidifier le lait ont été rapportés. En général, les entérocoques présentent une faible activité acidifiante du lait. **Morea et al. (1999)** ont montré que le pH du lait après 24 h d'inoculation avec des souches isolées à partir du fromage Mozzarella n'a pas baissé en dessous de 5,5. Des recherches récentes sur des entérocoques isolés du lait ont confirmé leur faible pouvoir acidifiant dans le lait avec seulement quelques souches présentant un pH inférieur à 5,0-5,2 après 16-24 h d'incubation à 37 °C (**Andrighetto & al., 2001 ; Durlu-Ozkaya & al., 2001 ; Sarantinopoulos & al., 2001**). Il a été également observé que l'espèce *E. faecalis* est généralement apte à acidifier le lait plus fort que l'espèce *E. faecium*. Chez des souches *E. faecalis* isolées d'un fromage traditionnel italien, un pouvoir acidifiant élevé dans le lait écrémé avec un abaissement du pH à environ

4,5 après 24 h de la fermentation a été observé [Giraffa & al., 1993 ; Suzzi & al., 2000]. Il semble donc y avoir effectivement chez les entérocoques une aptitude à l'acidification caractéristique de l'espèce

II.5.2. Activités protéolytiques

L'action protéolytique des entérocoques au cours de l'affinage peut se manifester soit par une production d'enzymes exocellulaires qui accompagne le développement microbien, soit par une libération d'enzymes endocellulaires après la lyse des corps bactériens.

La dégradation de la caséine joue un rôle majeur dans le développement de la texture du fromage. En outre, la dégradation secondaire des acides aminés est considérée comme ayant un impact majeur sur le développement de la saveur dans le fromage. Certains peptides contribuent à la formation de la saveur, tandis que d'autres, des peptides indésirables peuvent conduire à des saveurs amères.

Jusqu'à présent les études effectuées sur l'activité protéolytique des bactéries lactiques sont principalement limitées aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* [Pritchard & Coolbear, 1993 ; Sousa & Malcata., 2002]. Les voies biochimiques qui conduisent à la dégradation de la caséine et du transport des acides aminés et des peptides sont considérées comme étant les mêmes dans les autres bactéries lactiques, y compris le genre *Enterococcus*. En comparant aux autres bactéries lactiques les données sur l'activité protéolytique, des entérocoques sont sporadiques. Bien que certains auteurs aient signalé une activité protéolytique pertinente chez les espèces *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans* isolées à partir de divers fromages, ces activités sont généralement faibles pour la plupart des espèces d'entérocoques, à l'exception de l'espèce *E. faecalis* étant la plus active [Wessels & al., 1990 ; Centeno & al., 1999 ; Suzzi & al., 2000] [Dovat & al., 1970 ; Arizcun & al., 1997 ; Macedo et Malcata., 1997 ; Suzzi & al., 2000 ; Andrighetto & al., 2001].

Aucune relation claire n'a été observée entre les activités protéolytiques et l'acidification [Durlu-Ozkaya & al., 2001]. Cependant ces deux traits sont parfois bien corrélés avec les souches les plus protéolytiques étant également les plus acidifiantes [Hagrass & al., 1991 ; Giraffa & al., 1993 ; Suzzi & al., 2000].

II.5.3. Activité lipolytique et estérasique

Les lipides ont un effet majeur sur la saveur et la texture du fromage. Ils contribuent à la saveur de fromage de trois façons :

- (1) Une source d'acides gras, en particulier des acides gras à courte chaîne, qui peuvent être convertis en d'autres composés sapides et aromatiques, telle que des méthyles cétones et des lactones ;
- (2) étant une cause de l'oxydation des acides gras, conduisant à la formation de divers aldéhydes insaturés qui sont fortement aromatisés et ainsi provoquer un défaut d'arôme comme mentionné rancissement oxydatif ;
- (3) étant des solvants pour des composés sapides et aromatiques, obtenus non seulement à partir de lipides, mais aussi des protéines et du lactose. **(El Soda & al., 1995)**.

Les estérases sont arbitrairement classées comme enzymes hydrolysant des substrats en solution, tandis que les lipases hydrolysant des substrats en émulsion. Bien que la contribution possible des lipases et estérases au processus de maturation de fromage n'est pas bien définie, les estérases ont été liés au développement de la saveur et la texture du fromage grâce à la lipolyse des lipides du lait et en outre la conversion des acides gras libres produits en méthyle cétones et thio-esters. La lipolyse n'est pas impliquée directement dans la rhéologie du fromage.

Cependant, les glycérides partiels sont des composés tensioactifs qui influent sur l'organisation moléculaire, donc ayant un effet sur la texture du fromage. Les bactéries lactiques sont généralement considérées comme faiblement lipolytiques, par comparaison avec les autres groupes de micro-organismes. Certaines bactéries lactiques utilisées comme des cultures starter (*Lactococcus* et *Lactobacillus*), ainsi que quelques autres bactéries (*Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Micrococcus*), qui peuvent survivre après pasteurisation et /ou contaminer le fromage pendant sa maturation, sont soupçonnés de contribuer de manière significative à l'hydrolyse de la matière grasse du fromage **(El Soda & al., 1995 ; Collins & al., 2003)**. En ce qui concerne l'activité lipolytique des entérocoques, des données limitées et souvent contradictoires existent dans la littérature.

Les premiers travaux concernant les activités lipolytiques et estérolytiques des entérocoques ont été réalisés par **Lund (1965)**, qui a déterminé par électrophorèse la présence des estérases dans des extraits acellulaires des souches *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans*. De plus, les souches d'*E. faecalis* ont montré une activité plus élevée, telle que déterminée sur la base de l'intensité des bandes estérolytiques. Cinq ans plus tard, **Dovat & al (1970)** ont étudié l'activité lipolytique de 16 *Enterococcus* et 5 souches de *Streptococcus*, après les avoir

cultivés dans le lait écrémé, la crème du lait et le lait écrémé additionné de tributyrine. Il a été conclu que les entérocoques étaient activement lipolytiques. La vitesse de lipolyse est inversement liée à la masse moléculaire des triglycérides (tripropionine > tributyrine > tricaprine > tricapriline), tandis que la trioléine n'a pas été hydrolysée du tout. Dans la même étude, les acides gras volatils produits ont été déterminés par chromatographie, montrant que les entérocoques, et surtout les souches d'*E. durans*, produisent plus d'acide acétique que les souches de *Streptococcus*.

Subséquentement, **Martinez-Moreno (1976)** a montré que des souches des espèces (*E. durans*, *E. faecium* et *E. faecalis*) isolées à partir de fromage Manchego, étaient actives seulement contre la tributyrine et non contre les lipides du lait. **Chander & al. (1979a, b)** dans deux études consécutives ont examiné l'influence de certains acides gras sur la croissance des souches d'*E. faecalis* et la production d'une lipase, et ils ont purifié et caractérisé cette lipase. La masse molaire de cette enzyme spécifique a été estimée à environ 21 kDa et son point isoélectrique déterminé à 4,6. L'activité enzymatique maximale de la lipase a été observée à pH 7,5 et 40 °C. L'enzyme était capable d'hydrolyser la tributyrine plus que la tricapriline, tricapriline et la trioléine. Il a été observé que les acides gras de courte chaîne (C3, C4, C6 et C10) favorisent la production des lipases, contrairement aux acides gras de longue chaîne (C12, C14, C16, C18 et C18 : 2) où la production de lipase a été inhibée.

Carrasco de Mendoza & al. (1992) ont conclu que l'activité lipolytique des entérocoques est espèce-dépendante. La plupart des souches examinées présentaient une faible activité et seulement quelques souches appartenant à l'espèce *E. faecalis* ont été caractérisées comme lipolytique.

Dans une autre étude beaucoup plus systématique, **Sarantinopoulos & al. (2001a)** ont montré que parmi les 129 entérocoques, la majorité (90%) hydrolyse tous les substrats de la tributyrine (C4) à la tristéarine (C18) avec une activité décroissante. En outre, concernant les estérases, toutes les souches étaient actives sur les substrats synthétiques utilisés, à partir de 4-nitrophényl-acétate (C2) au -stéarate (C18), avec une diminution d'activité en fonction de la longueur de la chaîne.

En général, les souches d'*E. faecalis* ont été les plus lipolytiques et estérolytiques, suivie d'*E. faecium* et *E. durans*. Le système estérolytique des entérocoques est assez complexe et plus efficace que leur système lipolytique. Les entérocoques présentent une activité supérieure à celle des souches de la plupart

des autres genres lactiques, avec les souches de l'espèce *E. faecium* étant les plus estérolytiques au sein des entérocoques (Tsakalidou & al., 1993 ; Tsakalidou & al., 1994 ; Sarantinopoulos & al., 2001).

II.5.4. Métabolisme du citrate et du pyruvate

Le citrate est présent dans de nombreuses matières premières qui sont utilisées dans les fermentations alimentaires telles que les fruits, les légumes et le lait, et il est également utilisé comme additif pour la fabrication de saucisses fermentées. Le comportement des bactéries lactiques peut différer d'une espèce à une autre vis-à-vis le citrate, et non pas toutes les bactéries lactiques sont capables de métaboliser le citrate.

La capacité de métaboliser le citrate est toujours liée aux plasmides endogènes qui contiennent le gène codant pour le transporteur responsable de l'absorption du citrate à partir du milieu. Étant donné que le citrate est un substrat fortement oxydé, aucun équivalent réducteur, tel que le NADH, n'est produit au cours de son utilisation, ce qui conduit à la formation de produits métaboliques finaux autres que l'acide lactique. Ceux-ci comprennent le diacétyle, l'acétaldéhyde, l'acétoïne, et le 2,3-butanediol, qui ont des propriétés aromatiques très distinctes et influencées de manière significative la qualité des aliments fermentés (Hugenholtz, 1993).

Par exemple, le diacétyle détermine les propriétés aromatiques de fromage frais, du lait fermenté, de la crème et du beurre. L'utilisation de citrate entraîne également la production de dioxyde de carbone, ce qui peut contribuer à la texture de certains produits laitiers fermentés.

Il y a peu d'informations disponibles sur le métabolisme du citrate chez les entérocoques. Dans une étude récente, des souches isolées d'*E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* d'origine alimentaire diffèrent dans leur capacité à utiliser le citrate ou le pyruvate comme seule source de carbone, la première souche étant plus rapide que les deux autres dans l'utilisation des acides organiques (Sarantinopoulos & al., 2001).

Le métabolisme du citrate par la souche *E. faecalis* FAIRE 229 a été étudié dans différents milieux de croissance contenant du citrate, soit en présence de glucose ou du lactose ou comme seule source de carbone. Dans le lait, le co-métabolisme du citrate et du lactose a été observé alors que, dans un bouillon MRS le citrate n'a pas été catabolisé même en présence soit du lactose ou du glucose, bien que la croissance ait été stimulée par du citrate. Quand le citrate est présent

en tant que seule source de carbone, il est catabolisé et les principaux produits finaux sont l'acétate et le formate (**Sarantinopoulos & al., 2001**).

Dans ces égards, de nombreux *E. faecalis* et *E. faecium* isolés à partir de produits laitiers se sont révélés être de bons producteurs d'acétaldéhyde, d'éthanol, du diacétyle et d'acétoïne lorsqu'ils sont cultivés dans du lait, contribuant ainsi davantage dans le développement de l'arôme et de la saveur des fromages (**Hagrass & al., 1991 ; Andrighetto & al., 2001 ; Sarantinopoulos & al., 2001**). Il semble donc que les entérocoques ont le potentiel métabolique de contribuer activement au développement de la saveur dans les produits laitiers fermentés.

II.5.5. Production des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des petits peptides antimicrobiens, cationiques, amphiphiles (plutôt hydrophobe), produits naturellement par des micro-organismes par synthèse ribosomique, qui varient dans leurs ; spectre et mode d'activité, structure moléculaire et masse moléculaire, la thermo-stabilité, le pH, et leurs déterminants génétiques.

De nombreuses espèces d'entérocoques, principalement, *E. faecalis* et *E. faecium*, sont connues pour produire une grande variété d'entérocoques, avec une activité contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.*, y compris *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*, et *Vibrio cholerae* (**Giraffa, 1995 ; Franz & al., 1996 ; Maisnier-Patin & al., 1996 ; Nunez & al., 1997 ; Simonetta & al., 1997 ; Ennahar & al., 1998 ; Laukova & Czikova 1999 ; Sarantinopoulos & al., 2002b**).

L'un des résultats les plus impressionnants est jusqu'à présent l'absence presque totale des lantibiotiques chez les entérocoques, avec les seules exceptions étant la cytolysine et l'entérocoque W (**Coburn & Gilmore, 2003 ; Cox & al., 2005 ; Sawa & al., 2012**). La plupart des entérocoques caractérisés appartiennent aux bactériocines de la classe II et quelques-unes sont des enzymes lytiques thermolabiles. Préalablement, ces derniers ont été classés comme bactériocines, mais sont maintenant inclus dans une classe distincte des antimicrobiens (**Cotter, Hill, & Ross, 2005**).

D'autres entérocoques ont également été caractérisés de diverses espèces d'entérocoques et de différents environnements, et les entérocoques caractérisés plus complètement sont résumés dans le **tableau 7**. La plupart des entérocoques caractérisés sont produits par deux espèces *E. faecium* et *E. faecalis*, mais aussi

d'autres espèces *E. mundtii*, *E. avium*, *E. hirae*, et *E. durans* peuvent également produire des entérocoïnes (**voir le tableau 7**).

Les bactériocines d'*E. faecalis* sont codées par des gènes souvent portés par des éléments génétiques mobiles, y compris des plasmides conjugatifs et/ou des transposons, qui pourraient servir comme moyen efficace de diffuser ces traits à une population plus importante de bactéries, par transfert horizontal des gènes. Trois types de plasmides conjugatifs ont été identifiés et analysés chez les entérocoques. Deux types comprennent des plasmides répondants aux phéromones et plasmides non répondants aux phéromones (**Clewell, 1981 ; Clewell, 1993 ; Ike & al., 1998 ; Tomita & al., 2003**).

Tableau 7 : Classification des entérocoques (Gilmore, 2014)

Classe	Espèce	Bactériocine	Source d'isolement	Poids moléculaire (Acides aminés)	Références
Class I : Lantibiotiques	<i>E. faecalis</i>	Cytolysine Cyl _L and Cyl _S	Isolats cliniques	3,458 [38], et 2,032 [21]	(Gilmore & al., 1994)
	<i>E. faecalis</i>	Entérocoque Wα et Wβ	Poissons fermentés	3,256 [30] et 2,728 [29]	(Sawa & al., 2012)
Bactériocines : Class II	<i>Classe IIa</i>				
	<i>E. faecium</i>	Entérocoque A	Saucisson fermenté sec	4,829 [47]	(Aymerich & al., 1996)
	<i>E. faecium</i>	Entérocoque P	Saucisson fermenté sec	4,493 [44]	(Cintas & al., 1997)
	<i>E. faecium</i>	Bactériocine GM-1	Fèces des enfants	4,630 [44]	(Kang & Lee, 2005)
	<i>E. faecalis</i>	Bactériocine 31	Isolat clinique	[43]	(Tomita & al., 1996)
	<i>E. mundtii</i>	Mundticine KS, entérocoque CRL35, mundticine QU2	Ensilage, fromage traditionnel	4,287 [43]	(Kawamoto, et al., 2002; Saavedra & al., 2004)
	<i>E. faecalis</i>	Entérocoque SE-K4	Ensilage	5,356 [43]	(Eguchi & al., 2001)
	<i>E. faecalis</i>	Entérocoque MC4-1	Macaque	[43]	(Flannagan, Clewell, & Sedgley, 2008)
	<i>E. faecium</i>	Bactériocine T8	Sécrétions vaginales des enfants infectés par le HIV	5,090 [44]	(De Kwaadsteniet & al., 2006)

<i>E. avium</i>	Avicine A	Les excréments des bébés	4,289 [43]	(Birri & al., 2010)
<i>E. hirae</i>	Hiracine JM79	Le canard colvert sauvage	5,093 [44]	(Sanchez & al., 2007)
<i>E. faecium</i>	Bactériocine RC714	Exsudats humaines	[43]	(Del Campo & al., 2001)
<i>E. faecium</i>	Bactériocine 43	Isolat clinique	[44]	(Todokoro & al., 2006)
Classe IIb				
<i>E. faecalis</i>	Entérocoque C	Colostrum humain	4,286 [39] 3869 [35]	(Maldonado-Barragan & al., 2009)
<i>E. faecalis</i>	Entérocoque 1071 A et B	Les excréments des porcs	4,286 [39], 3,899 [35]	(Balla & al., 2000)
<i>E. faecium</i>	Entérocoque X a et b	Pommes de sucre	4420 [40], 4068 [37]	(Hu & al., 2010)
Classe II : Bactériocines circulaires				
<i>E. faecalis</i>	AS-48, Bactériocine 21, Entérocoque 4	Isolat clinique	7,166 [70]	(Joosten & al., 1996 ; Martinez Bueno & al., 1994 ; Samyn & al., 1994 ; Tomita & al., 1997)
Classe II : Bactériocines sans séquence leader				
<i>E. faecalis</i>	MR10A MR10B / (343) Ent7A Ent7B	La glande uropygienne des oiseaux, et Viande de bœuf	5,202 [44], 5,208 [43]	(Liu & al., 2011 ; Martin-Platero & al., 2006)

<i>E. faecium</i>	Entérocoque L50A, L50B / 62A, 62B	Saucisson fermenté sec Vagin humaine	5,190 [44], 5,178 [43]	[Cintas & al., 1998 ; Dezwaan & al., 2007]
<i>E. faecium</i>	Entérocoque Q	Saucisson fermenté sec	3,980 [34]	[Cintas & al., 2000 ; Criado & al., 2006]
<i>E. faecalis</i>	Entérocoque EJ97	Eaux usées	5,328 [44]	[Galvez & al., 1998 ; Sanchez-Hidalgo & al., 2003]
<i>E. faecium</i>	Entérocoque RJ-11	Son de riz	5,049 [44]	[Yamamoto & al., 2003]
<i>Classe II : Autres bactériocines</i>				
<i>E. faecium</i>	Bac 32, Entérocoque IT	Isolat clinique (ERV)	6,390 [54]	[Inoue, Tomita, & Ike, 2006 ; Izquierdo & al., 2008; Izquierdo & al., 2009]
<i>E. faecium</i>	Bactériocine 51	Isolat clinique (ERV)	105 aa thermostables	[Yamashita & al., 2011]
<i>E. faecium</i>	Entérocoque B	Saucisson fermenté sec	5,479 [53]	[Casaus & al., 1997]
<i>E. faecalis</i>	Entérocoque 96	Fromage Munster	5,179 [48]	[Izquierdo & al., 2009]
<i>Entérolysines thermolabiles</i>				
<i>E. faecalis</i>	Entérolysine A	Poissons, et lait	34,501 [343]	[Hickey & al., 2003 ; Nilsen, Nes, & Holo, 2003]
<i>E. faecalis</i>	Bactériocine 41	Isolat clinique	[595]	[Tomita, Kamei, & Ike, 2008]

II.6. Virulence et pathogénèse des entérocoques

La grande majorité des entérocoques, y compris les espèces qui sont les principaux agents d'infection nosocomiale, sont des habitants paisibles du tractus gastro-intestinal (GI) de l'homme et des animaux. Toutefois, des situations surgissent dans lesquelles les entérocoques peuvent provoquer des maladies graves.

L'ère de la médecine moderne a créé des circonstances qui facilitent le comportement pathogène de ces microbes de la manière suivante. Premièrement, l'utilisation abusive des antibiotiques a sélectionné des mutants résistants à ces médicaments. Même si les entérocoques ne peuvent pas être aussi intrinsèquement virulents que d'autres bactéries pathogènes, et en plus d'être naturellement résistants à de nombreux antibiotiques ils ont l'aptitude à accepter et échanger les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques. Ces propriétés donnent aux entérocoques un avantage sélectif dans des environnements où l'utilisation des antibiotiques est intense, telle que les hôpitaux, et peuvent leur permettre de supplanter d'autres espèces qui maintiennent l'équilibre de la flore commensale. Un autre facteur est la population grandissante des individus immunodéprimés, incluant les personnes âgées, les patients qui ont des greffes de moelle osseuse ou d'organe solide, et les patients atteints de cancer. Le système immunitaire contribue probablement à l'équilibre de la flore commensale, et un système de défense très affaibli peut être incapable de garder ces espèces sous contrôle. Enfin, il existe des facteurs génétiques qui confèrent aux entérocoques de survivre et causer une infection à l'hôte. Certains de ces facteurs font partie du génome de base, tandis que d'autres sont des traits qui peuvent être acquis ou partagés.

Les espèces du genre *Enterococcus* ayant la plus forte virulence sont généralement des isolats cliniques, suivis à moindre degré par des isolats d'origine alimentaires et ensuite les souches des cultures starter (**Busani & al., 2004 ; Ben Omar & al., 2004**). Cette virulence est déterminée par plusieurs facteurs, par exemple :

- (1) l'aptitude à coloniser le tractus gastro-intestinal, qui est l'habitat naturel ;
- (2) la capacité d'adhérer à une variété de protéines de la matrice extracellulaire, incluant la thrombospondine, la vitronectine et la lactoferrine ; et
- (3) la capacité d'adhérer à l'épithélium du tractus urinaire, l'épithélium de la cavité orale et les cellules embryonnaires rénales humaines.

La plupart des infections sont considérées comme endogène, par la translocation des bactéries à travers les cellules épithéliales de l'intestin qui causent alors de l'infection

via les ganglions lymphatiques et donc se disséminer à d'autres cellules dans le corps **(Franz & al., 1999)**.

Les facteurs de virulence associés à la pathogénèse des infections à entérocoques chez les humains sont en cours d'investigation active. Certains ont été identifiés, et leur rôle a été testé dans divers modèles animaux infectés par les entérocoques, bien qu'il n'y ait pas une certaine corrélation avec les infections humaines. Ces facteurs de virulence peuvent être divisés en facteurs sécrétés (cytolysine / hémolysine, gélatinase et la sérine protéase) et des protéines ou des adhésines liées à la membrane et la paroi cellulaires [substance d'agrégation, la protéine de surface d'entérocoque (Esp), l'adhésine au collagène d'*E. faecalis* (Ace), et les polysaccharides].

II.6.1. Facteurs de virulence sécrétés

II.6.1.1. Cytolysine

La cytolysine, ou β -hémolysine [Bactériocine], est une toxine bactérienne, a des propriétés β -hémolytiques chez l'homme, et est bactéricide contre d'autres bactéries Gram-positives. Les gènes permettant sa production sont localisés sur des plasmides répondant aux phéromones ou sur un îlot de pathogénie présent dans le chromosome. La cytolysine active consiste en deux petits peptides (CylLI et CylLs). Lorsque fonctionnels, ils sont toxiques ou lytiques pour une grande variété de cellules eucaryotes et procaryotes **(Hallgren & al., 2008)**. En plus de sa toxicité, la forme extracellulaire activée de la cytolysine CylLs (CylLs^{''}) induit un haut niveau d'expression des gènes structuraux de la cytolysine par un mécanisme de quorum-sensing impliquant un système à deux composants **(Haas & al., 2002 ; Shankar & al., 2002)**. La production de la cytolysine peut être considérée comme une stratégie bactérienne pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte en détruisant les cellules du système immunitaire, ainsi **Miyazaki & al. (1993)** ont montré que le surnageant d'une culture hémolytique de l'espèce *E. faecalis* a lysé les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) de souris et les macrophages. La production de la cytolysine semble être un facteur de risque majeur associée à des entérocoques pathogènes, ainsi **Huycke & al. (1991)** ont déterminé un risque de la mort multiplié par cinq des patients dans les trois semaines de bactériémie causée par des entérocoques β -hémolytiques, par rapport à celle causée par des souches non- β -hémolytiques.

La cytolysine est codée par un opéron complexe composé de huit gènes [*cyLLI*, *cyLLs*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA*, *cyII*, *cyIR1*, *cyIR2*], avec deux promoteurs différents qui se chevauchent,

assurant l'expression de cet opéron. Les gènes structuraux des sous-unités de la cytolysine (*cyiI* et *cyiLs*), les gènes des fonctions de modification post-traductionnelle et de sécrétion (*cyiM*, *cyiB* et *cyiA*) et les gènes de l'immunité cellulaire (*cyiI*) constituent une seule unité transcriptionnelle. Les gènes régulateurs *cyiR1* et *cyiR2*, sont transcrits dans le sens opposé en tant que seconde unité transcriptionnelle. Les sous-unités cytolysine CylI et CylLs sont synthétisés sous forme de précurseurs de 68- et 63-résidus, respectivement, et subissent une modification post-traductionnelle par le produit du troisième gène (*cyiM*), qui est un polypeptide de 993-résidus, et qui introduit des modifications caractéristiques de la classe des bactériocines lantibiotiques. (Booth & al., 1996 ; Gilmore & al., 1994).

Les protéines CylB ont une double fonction, une comme transporteurs ABC (Gilmore, Segarra, et Booth, 1990 ; Gilmore & al., 1994) et l'autre comme un signal peptidase (Håvarstein, Diep, & Nes, 1995), et ces deux fonctions permettent d'exporter les sous-unités de la cytolysine et d'éliminer par protéolyse un peptide leader de chaque sous-unité. Les sous-unités sécrétées (CylLs et CylI), qui sont encore inactives à ce stade, nécessitent un traitement protéolytique par la protéase CylA pour donner la forme active (CylL_s et CylI_s) qui est capable de lyser les cellules cibles (Booth & al., 1996). CylI fournit une fonction d'auto-immunité en protégeant l'espèce productrice de l'activité bactéricide de la cytolysine.

CylR1 et CylR2, deux protéines régulatrices, régulent la production de la cytolysine en réduisant l'expression à partir du promoteur cytolysine d'environ 40 fois. (Rumpel & al., 2004). Un modèle a été proposé pour le fonctionnement de la cytolysine qui sert à relier le détecteur des molécules inductrices CylLs^{''} à la présence ou l'absence d'une cellule cible appropriée (Coburn & al., 2004). En l'absence d'une cellule cible, CylLs^{''} et CylI^{''} sont maintenus à des concentrations basses et peuvent en outre interagir pour former un complexe oligo-mérique insoluble qui diminue efficacement la concentration de l'inducteur libre, CylLs^{''}. Ainsi, en l'absence d'une cellule cible, CylI^{''} maintient la concentration de CylLs^{''} libres en solution au-dessous du niveau seuil nécessaire pour déclencher la production de cytolysine à haut niveau.

Cependant, en présence d'une cellule cible, CylI^{''} se lie préférentiellement à la membrane cible, ce qui réduit la concentration de CylI^{''} en solution et permet l'accumulation de CylLs^{''} libres à un niveau nécessaire pour activer l'expression de la cytolysine à haut niveau. Ainsi, cela fournit un mécanisme par lequel la bactérie produit des niveaux élevés de cytolysine seulement lorsque cela est nécessaire en détectant simultanément les molécules inductrices CylLs^{''} accumulées et une cellule cible par l'intermédiaire du détecteur de la membrane de CylI^{''}. En outre, cela fournirait un

mécanisme de sécurité supplémentaire pour que la bactérie se protège d'elle-même contre les effets bactéricides de la cytolysine [Gilmore & al., 2014].

Considérant le mode d'autorégulation de la cytolysine, requérant une accumulation de CylLs" à un niveau seuil, la diffusion dans la circulation sanguine pourrait prévenir un haut niveau d'expression dans ce milieu, rendant ainsi une hémolyse sanguine élevée peu probable. Cependant, aux sites de coagulation intravasculaire, dans l'environnement des valvules cardiaques, ou dans les biofilms, des microenvironnements peuvent apparaître où *E. faecalis*, et ainsi CylLs, peut s'accumuler à des concentrations suffisamment élevées pour enclencher l'expression à haut niveau de la cytolysine [Gilmore & al., 2002].

II.6.1.2. Gélatinase

La gélatinase est une Zinc-métalloprotéase extracellulaire qui agit sur une variété de substrats tels que la chaîne β de l'insuline, le collagène des tissus, le vasoconstricteur endothéline-1, ainsi que des phéromones sexuelles et leurs peptides inhibiteurs [Waters & al., 2003]. Le gène codant pour la gélatinase (*gelE*) se trouve dans un opéron avec un gène (*sprE*) codant pour une sérine-protéase [Qin & al., 2000]. Le séquençage du gène *gelE* par Su et al. [Su & al., 1991] a montré qu'il code pour une protéine de 509 résidus prédite pour contenir une séquence signal de 29 acides aminés suivi par 162 résidus de proséquence et une protéine mature de 318 acides aminés avec une masse de 34.5kDa.

Les premières études qui ont examiné la prévalence de la production de la gélatinase par des isolats cliniques d'*E. faecalis* ont rapporté que 72% des isolats de l'hôpital étaient positifs [Kühnen & al., 1988], tandis qu'une étude ultérieure qui a examiné des isolats provenant simultanément des hôpitaux (clinique et fécale) et de la communauté (fécale) a noté une fréquence plus élevée parmi les isolats de l'hôpital, par rapport aux isolats fécaux de la communauté. Ces résultats suggèrent une prolifération possible pour un phénotype Gel+ dans le milieu hospitalier [Coque & al., 1995]. Cette dernière étude a également observé l'absence du phénotype Gel+ chez 46% des isolats d'une endocardite, suggérant ainsi l'absence du rôle de cette enzyme dans cette maladie particulière. Des études ultérieures ont également rapporté l'identification d'une espèce *E. faecalis* qui portait le gène *gelE*, mais qui étaient phénotypiquement négatif [Eaton & Gasson, 2001 ; Qin & al., 2000].

En outre, la présence de *gelE* et *fsr* (les gènes régulateurs pour la gélatinase et la sérine protéase) chez les entérocoques peut avoir un effet sur la gravité de la maladie dans des modèles animaux, Roberts & al. (2004) ont comparé l'incidence de ces gènes chez

des souches d'*E. faecalis* isolées à partir des individus sains et d'autres malades, et ont constaté que ni *fsr* ni *gelE* était nécessaire pour que *E. faecalis* cause une infection.

Il a été montré que GelE clive la fibrine polymérisée, ce qui suggère son importante implication dans la virulence d'*E. faecalis*, en effet cette protéase sécrétée peut endommager les tissus de l'hôte permettant ainsi la migration et la dissémination de la bactérie. En plus de son rôle dans la virulence, GelE peut aussi effectuer diverses importantes fonctions de ménage pour la bactérie. Par exemple, GelE nettoie la surface de la cellule bactérienne des protéines mal repliées et est également responsable de l'activation d'une autolysine, qui est une enzyme (muramidase-1) dégradant le peptidoglycane, aboutissant à un relâchement d'ADN extracellulaire et favoriserait une réduction de la longueur de la chaîne bactérienne, et la formation de biofilm. Ainsi, ces différentes fonctions suggèrent que GelE agit afin d'augmenter la dissémination d'*E. faecalis* dans des environnements à haute densité cellulaire (Thomas & al., 2009). En plus de leur fonction dans la formation de biofilm, le rôle principal de la gélatinase et de la sérine protéase dans la pathogénicité des entérocoques serait de fournir des éléments nutritifs aux bactéries en dégradant le tissu de l'hôte (Gilmore, 2002 ; Mohamed & Huang, 2007).

II.6.1.3. Hyaluronidase

Les entérocoques peuvent produire une enzyme hydrolytique nommée hyaluronidase, une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, qui est une composante majeure de la matrice extracellulaire. L'enzyme dépolymérise la fraction mucopolysaccharidique des tissus conjonctifs, facilitant par le fait même la dissémination des entérocoques, ainsi que leurs toxines, à travers les tissus de l'hôte. Cependant, il n'y a aucune preuve directe pour le rôle de l'hyaluronidase dans les infections causées par des entérocoques (Jett & al., 1994 ; Rice & al., 2003 ; Kayaoglu & al., 2004). Récemment, la séquence de gène codant pour le gène *hylEfm* hyaluronidase à partir d'une souche d'*E. faecium* a été déterminée. Ce gène *hyl* présent sur le chromosome est composée de 1659 pb qui code pour une protéine putative de 533 acides aminés et qui est identique à 42% et présente une similarité de 60% à une hyaluronidase de *S. pyogenes* (Rice & al., 2003).

II.6.1.4. Les phéromones sexuelles

Les phéromones sexuelles peuvent être considérées comme déterminants de la virulence. Ce sont des produits de clivage des peptides signaux de 21 et 22 acides d'acide qui sont associés à des lipoprotéines de surface de fonction inconnue (Clewell & al., 2000). Ceux-ci, ainsi que leurs protéines d'exclusion de surface, sont impliqués dans l'apparition des changements pathologiques tels que l'inflammation aiguë (Johnson, 1994).

Ils sont chimiotactiques pour les PMNs humaines et de rat in vitro, et induisent la production de superoxyde et la sécrétion d'enzymes lysosomales (**Ember & Hugli, 1989 ; Sannomiya & al., 1990 ; Johnson, 1994**).

II.6.1.5. Production de superoxyde extracellulaire et de peroxyde d'hydrogène

L'anion superoxyde est un radical de l'oxygène très réactif qui peut engendrer des dommages cellulaires et tissulaires dans diverses infections, incluant les maladies inflammatoires. L'anion superoxyde et d'autres radicaux de l'oxygène exercent un effet destructeur sur une grande variété de composés biologiques tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques [**Cross & al., 1987**]. La production de superoxyde extracellulaire a été rapportée comme étant une caractéristique commune chez les souches d'*E. faecalis*.

Parmi un total de 91 isolats cliniques, 87 produisaient l'anion superoxyde extracellulaire à un niveau détectable. Les isolats associés aux bactériémies et aux endocardites produisent du superoxyde extracellulaire de façon significativement plus élevée que ceux isolés de selles d'individus sains [**Huycke & al., 1996**].

Moy & al., (2004) ont suggéré que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut servir comme un facteur déterminant de la virulence qui peut endommager les cellules hôtes à proximité, mais ils ont admis que le rôle de peroxyde d'hydrogène dans la pathogenèse de la maladie humaine n'est pas clair. Néanmoins, **Huycke & al. (2002)** dans un essai du test des comètes en utilisant des cellules ovaires du Hamster chinois et des cellules HT-29 épithéliales de l'intestin, ont montré que la souche d'*E. faecalis* produisant le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pourrait endommager l'ADN de la cellule eucaryote. En revanche, un mutant avec un transposon inactivé, et sa production de superoxyde extracellulaire atténuée n'a pas produit le même effet endommageant sur l'ADN. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provenant du superoxyde a été identifié comme étant l'agent génotoxique réel (**Huycke & al., 2002**).

II.6.2. Facteurs de virulence liés à la membrane

II.6.2.1. Substances agrégatives

Les substances d'agrégation (SA) sont des adhésines glycoprotéiques ancrées dans la surface cellulaire (LPXTG) et codées par des gènes portés sur des plasmides conjugatifs répondants aux phéromones. L'expression de ces gènes est induite par des phéromones sexuelles qui sont des peptides de petite taille (7 à 8 acides aminés hydrophobes) excrétés par les souches d'*E. faecalis* réceptrices dépourvus de plasmides. Ces phéromones

interagissent avec la souche donatrice aboutissant à l'expression des substances d'agrégation sur la surface cellulaire, ce qui favorise l'agglutination des cellules donatrices et réceptrices par la liaison entre les substances d'agrégation et un récepteur complémentaire appelé « substance de liaison » localisée sur la surface de la cellule réceptrice [Clewell, 1993 ; Dunny & al., 1995]. La formation d'agrégats au cours de la conjugaison, facilitant ainsi le transfert des plasmides sur lesquelles les gènes des substances agrégatives sont localisés, ainsi que l'adhérence aux surfaces des cellules eucaryotes [Koch & al., 2004].

La présence de SA augmente l'hydrophobicité de la surface cellulaire des entérocoques, ce qui conduit à la localisation du cholestérol aux phagosomes, et on pense qu'il retarde ou empêche la fusion des vésicules lysosomales [Eaton & Gasson, 2002]. Une analyse par électrophorèse sur gel en champs pulsés d'isolats cliniques a montré que le gène codant pour SA n'était pas présent chez les isolats d'*E. faecium* [Hallgren & al., 2008].

Les substances agrégatives présentées par les protéines Asa1, Asc10 et Asp1, codées par les gènes *asa1*, *prgB*, *asp1* situés sur les plasmides conjugatifs pAD1, pCF10 et pAD1, respectivement, ont des séquences d'acide aminé à l'extérieur de la région variable N-terminale hautement similaire [Galli, Friesenegger, & Wirth, 1992 ; Galli, Lottspeich, & Wirth, 1990 ; Kao & al., 1991]. Ces protéines (adhésines), de 1296 acides aminés ont une séquence signale N-terminale, un domaine C-terminal LPXTG ancré à la paroi cellulaire, deux motifs Arg-Gly-Asp (RGD), et un certain nombre de domaines déterminés expérimentalement impliqués dans la formation d'agrégation et la liaison à l'acide lipotéichoïque (ALT) [Hendrickx & al., 2009]. L'expression des gènes *asa1*, *prgB*, *asp1* est induite par une phéromone oligopeptide autocrine, laquelle est sécrétée par d'autres entérocoques [Chandler, Hirt, & Dunny, 2005 ; Kozlowicz, Dworkin, & Dunny, 2006]. L'expression de la SA à la surface de la cellule permet un contact physique étroit entre les bactéries donneuses et receveuses, permettant ainsi un transfert, à haute fréquence, de plasmides de virulence et de résistance aux antibiotiques. Les substances agrégatives sont donc considérées comme un facteur de virulence important multifonction, car elles agissent comme des adhésines et des invasives ; en outre, elles sont impliquées dans la translocation des bactéries à l'intérieur des cellules y compris les cellules immunitaires afin de s'échapper de la réponse immunitaire.

II.6.2.2. Protéines de surface extracellulaire

La protéine de surface d'entérocoque ou Esp, a été identifiée initialement chez une souche d'*E. faecalis* très virulente, résistante à la gentamicine, isolée à partir d'une bactériémie. Ce sont des protéines attachées à la paroi cellulaire possédants des caractéristiques structurales similaires à celles des protéines de surface des autres bactéries Gram positif, telle qu'une séquence signal de transport et une séquence d'ancrage à la paroi cellulaire qui est légèrement divergente du motif consensus LPxTG (**Shankar & al., 1999**). Elles ont un poids moléculaire approximatif de 202 kDa, et sont codées par le gène *esp* qui possède une taille de 5622 pb et qui est très fréquent chez les isolats cliniques qui sont à l'origine des infections. Il est supposé que la présence de ce gène *esp* promouvoir l'adhérence, la colonisation et l'évasion du système immunitaire, et de jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques (**Foulquié Moreno & al., 2006**). Esp contribue également à la formation du biofilm par les entérocoques, ce qui pourrait conduire à une résistance au stress environnementale et l'adhésion aux cellules eucaryotes telles que celles du tractus urinaire (**Bergmann & al., 2004**). Des études ont montré que la rupture du gène *esp* altère la capacité d'*E. faecalis* à former des biofilms. Des souches *E. faecalis* négatives pour Esp étaient capables de produire un biofilm après avoir reçues un transfert plasmidique du gène *esp* (**Latasa & al., 2006**). Parmi 28 isolats cliniques d'*E. faecium* 21 isolats possèdent des séquences spécifiques pour le gène *esp*, ce qui laisse supposé que ce gène est probablement lié à la pathogénicité, étant donné que les souches isolées du lait ne le possèdent pas (**Mannu & al., 2003**). Les souches d'*E. faecium* possédants le gène *esp_m* ont des taux de conjugaison plus élevés que les souches qui ne le possèdent pas, et elles ont montrés également une résistance élevée à l'ampicilline, la ciprofloxacine et l'imipénème (**Billström & al., 2008**).

La protéine Esp présente une similarité structurelle parfaite à la protéine R28 de l'espèce *Streptococcus pyogenes* (**Stålhammar-Carlemalm & al., 1999**), aux protéines Rib et C-alpha de *Streptococcus agalactiae* (**Michel & al., 1991**) et à la protéine Bap associée à la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* (**Cucarella & al., 2001**). Cette similarité est limitée à une région hautement conservée dans les unités répétitives C de la protéine Esp, correspondant à des régions du groupe A et B au sein des protéines streptococciques, tandis que la similarité avec Bap est limitée à la région N-terminale non-répétée.

II.6.2.3. Protéines de liaison au collagène

L'attachement des bactéries aux composantes tissulaires et cellulaires de l'hôte, telles que la matrice extracellulaire (MEC), est une première étape importante du processus d'infection. Plusieurs études ont rapporté la capacité de certains *E. faecalis* isolés à adhérer à un certain nombre des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), tels que le collagène, la laminine, le fibrinogène, la fibronectine, la lactoferrine, la vitronectine et la thrombospondine, mais la plupart de ces études sont en accord que l'adhésion à ces protéines *in vitro* n'est relativement présente que chez peu d'isolats. Des recherches ultérieures sur des gènes qui codent pour des adhésines potentiels, en exploitant la première séquence du génome disponible d'*E. faecalis* (souche V583) ont conduit à la découverte de l'adhésine Ace [adhésine du collagène d'*E. faecalis*], la première MSCRAMM [composants de surface microbienne reconnaissant les molécules adhésives de la matrice] ayant été décrite chez les entérocoques, et permet la liaison au collagène de type I et IV, à la laminine et à la dentine. Acm [adhésine du collagène d'*E. faecium*] interagit avec le collagène de type I, et à un moindre degré, au collagène de type IV. Les adhésines au collagène d'*E. faecalis* (Ace) et d'*E. faecium* (Acm) Ace et Acm sont des adhésines qui montrent également une similarité structurale aux MSCRAMMs des autres bactéries Gram positives (Rich & al, 1999 ; Nallapareddy & al., 2003).

L'organisation structurale de l'ensemble Ace et Acm est similaires en ce qu'ils contiennent une séquence peptide signal en position N-terminale suivi d'un domaine A de liaison de haute affinité au ligand, consistant en un ou plusieurs variant de repliement de type (IgG) immunoglobuline, un domaine répété B, et un signal d'ancrage à la paroi cellulaire de type LPXTG en C-terminale (Nallapareddy & al., 2003). L'activité de liaison au collagène de ces protéines se trouve dans le domaine A. Etant donné que ces protéines contiennent aussi des motifs répétitifs et le nombre de répétitions peut être modifié, ces protéines peuvent également être impliquées dans l'échappement de la réponse immunitaire par des mécanismes similaires à ceux proposés par Shankar & al. (1999) pour l'Esp.

Dans une analyse récente par cytométrie en flux des bactéries récoltées à partir d'une endocardite due aux végétations infectées par *E. faecalis*, la protéine Ace s'est trouvée présente chez 40-45% des bactéries, ce qui a confirmé la production d'Ace *in vivo* (Singh & al., 2010). Bien que les détails des voies de régulation qui contrôlent l'expression du gène *ace* sont colossalement inconnues, il a été montré que le régulateur transcriptionnel Ers contrôle négativement le gène *ace* en se liant à son site promoteur. Cette étude a également indiqué que les sels biliaires est un facteur ou stress qui

augmente la production des ARNm d'Ace. Même si les détails moléculaires restent non caractérisés, il a été proposé que cet effet des sels biliaires peut être médié par la dérégulation des *ers* (Lebreton & al., 2009).

Plus récemment, Pinkston & al. (2011) ont rapporté que la gélatinase clive spécifiquement Ace de la surface cellulaire dans les étapes subséquentes de *croissance in vitro*, ce qui fournit au moins une explication pour la détection précédente de faibles niveaux d'Ace de surface et de collagène d'adhérence dans ces conditions. Par l'utilisation d'un mutant *fsrB*, il a été également montré que l'exposition d'Ace sur la surface est réglée par le système *Fsr* via l'activité de la gélatinase, ce qui démontre un lien entre l'adhérence au collagène médiée par l'Ace d'*E. faecalis* et le réseau de régulation multi-cibles *Fsr* de communication (quorum-sensing) (Bourgogne & al., 2006 ; Pinkston et al., 2011).

Singh et al. (2010) ont démontré l'importance d'Ace dans le rôle de la pathogénicité d'*E. faecalis* dans l'endocardite en montrant que la suppression du gène *ace* conduit à une atténuation significative de l'endocardite expérimentale de rat, alors qu'aucune différence n'a été observée dans un modèle de péritonite. En outre, Ace joue un rôle important dans le stade précoce d'attachement d'une endocardite, en plus d'être exprimée *in vivo* sur la surface cellulaire d'*E. faecalis* dans les végétations infectées. Enfin, la vaccination avec un vaccin recombinant du domaine A d'Ace de liaison au collagène, ainsi que l'immunisation passive avec des anticorps anti-domaine A d'Ace, les deux ont attribués une protection contre l'endocardite et réduisant la colonisation par *E. faecalis* des végétations dans un modèle de souris (Singh & al., 2010).

Ceci est en accord avec l'inhibition efficace précédemment montrée *in vitro* de l'adhérence au collagène et/ou à la laminine par des anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-domaine A d'Ace (Hall & al., 2007 ; Nallapareddy, Qin & al., 2000 ; Nallapareddy & al., 2000). Ces résultats suggèrent qu'Ace, qui a également été trouvé pour être immunogènes chez l'homme (Nallapareddy & al., 2000), pourrait être une cible utile pour les stratégies immunoprophylactiques ou thérapeutiques (Singh & al., 2010).

II.6.2.4. Antigène A d'*E. faecalis* (EfaA)

EfaA est un antigène de surface d'*E. faecalis* important, il a été identifié en utilisant des sérums provenant des patients atteints d'endocardite provoquée par *E. faecalis* (Lowe, Lambert, & Smith, 1995). Le gène *efaA* est le troisième gène d'un opéron à trois gènes, *efaBCA*, qui est prévu pour coder des composants d'un transporteur de type ABC, avec EfaA présumé en tant que composant de liaison au substrat lipoprotéique (Low & al., 2003). EfaA a montré une forte homologie avec un groupe de protéines transporteurs

ABC tels que FimA, SsaB, ScaA et PsaA des streptocoques, dont certains ont également été identifiés comme étant des adhésines importantes de surface ou en tant que facteurs associés à l'adhésion ou la pathogénèse (**Andersen, Ganeshkumar, & Kolenbrander, 1993 ; Kolenbrander & al., 1998**).

Singh et al ont donné preuve de l'implication préalable de EfaA dans les infections à *E. faecalis*, ils ont montré dans un modèle expérimental de péritonite que les souris infectées par un mutant isogénique d'*E. faecalis* OG1RF avec le gène *efaA* inactive, avaient une survie significativement prolongée, par rapport à ceux qui sont infectés par la souche mère de type sauvage (**Singh & al., 1998**). Le dépistage de la prévalence du gène *efaA* a montré sa présence ubiquitaire dans presque tous les isolats d'*E. faecalis* et on a identifié un homologue qui est aussi répandu chez *E. faecium* (**Eaton & Gasson, 2001 ; Singh & al., 1998**).

Low et al ont rapporté que la production d'EfaA est régulée positivement in vitro lorsque la concentration du manganèse (Mn^{+2}) environnementale est faible. Ils ont proposé que l'opéron *efaBCA* code une perméase à haute affinité au manganèse qui est exprimé dans les tissus ou le sérum où Mn^{+2} , un micronutriment important pour *E. faecalis*, n'est pas librement disponible, ce qui explique l'importance de EfaA pour l'infection des tissus hôtes humains (**Low & al., 2003**).

II.6.2.5. Les pili associés au biofilm et à l'endocardite (Ebp)

Les pili sont des fibres multimériques de protéines de surface LPXTG. Ils sont polymérisés par une sortase de classe C pour être ensuite immobilisés de façon covalente au peptidoglycane de la paroi cellulaire par une sortase de classe A. Bien que les structures filamenteuses ressemblant à des pili ou fimbriae ont été observées par microscopie électronique dans les études sur les entérocoques par Handley et Jacob dans les années 1980 (**Handley & Jacob, 1981**), la base génétique et structurale des pili des entérocoques est demeurée inconnue jusqu'à la découverte d'un locus à trois gènes *ebpABC* et un gène *bps* adjacent situé en aval codant pour une sortase (sortase associée au biofilm et au pili), qui sont nécessaires pour l'assemblage des pili sur la surface de la souche *E. faecalis* OG1RF (**Nallapareddy & al. , 2006**).

Le premier indice de l'importance du pili Ebp dans la virulence des entérocoques a été tiré de la constatation des concentrations élevées des anticorps contre les protéines recombinantes correspondant aux trois sous-unités structurelles des pili, EbpA, EbpB et EbpC, dans le sérum des patients atteints d'une endocardite à *E. faecalis*, une constatation

qui implique qu'ils sont exprimés in vivo et sont immunogènes chez l'hôte humain **(Sillanpää & al., 2004)**.

L'adhérence de la plupart des isolats d'*E. faecalis* à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte est renforcée par la croissance en présence de sérum. Cependant, la suppression des gènes *ebpABC* à presque éliminer l'adhésion induite par le sérum de la souche *E. faecalis* OG1RF au fibrinogène, un composant majeur de la matrice extracellulaire et du sérum **(Nallapareddy & al., 2011)**, alors qu'aucun effet sur l'adhésion à la fibronectine n'a été observé. L'implication des pili Ebp dans l'adhésion au fibrinogène a été confirmée par la complémentation et l'inhibition de l'adhérence au fibrinogène des OG1RF par des anticorps contre les trois pilines ebp ; les derniers résultats ont également souligné la possibilité d'utiliser des anticorps anti-ebp pour l'immunisation contre les infections à *E. faecalis*.

Dans le cas de l'espèce *E. faecalis*, l'assemblage du pilus Ebp est dépendant de la sortase SrtC, tandis que son expression est dépendante du gène régulateur transcriptionnel, *epbR* **(Bourgogne & al., 2007)**. Il semblerait que les sous-unités majeures des pili, chez *E. faecalis* et *E. faecium*, sont les protéines EbpC, PilA et PilB tel qu'observé par microscopie à transmission immunoélectronique. Par contre, ce ne seraient pas tous les entérocoques observés qui exprimeraient le pilus. Les différences dans l'expression du pilus à la surface des bactéries laissent suggérer qu'un mécanisme épigénétique serait impliqué, tels que pour les pili associées à la pyélonéphrite chez *Escherichia coli* **(Hernday & al., 2002)**.

II.6.2.6. Acide lipotéichoïque

L'acide lipotéichoïque (ALT), est une adhésine amphiphile associée à la membrane. Cette adhésine est un facteur de virulence potentiel et partage plusieurs propriétés pathophysiologiques du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif. L'ALT est un polymère composé d'une chaîne de polyglycérolphosphate hydrophile liée par un pont ester à une queue de glycolipide hydrophobe. Chez les entérocoques, ces molécules de surface semblent être identiques à l'antigène de groupe D **(Wicken & al., 1963)**.

En 2004 Hufnagel et ces collaborateurs ont proposé un nouveau schéma de typage, qui classe la majorité des souches d'*E. faecalis* testées dans l'un des quatre types : CPS-A, B, C ou D. Les souches de sérotypes A et B ne contenaient que les gènes *cpsAB* dans leur locus capsule, tandis que les souches de sérotypes C et D possèdent huit à neuf gènes supplémentaires **(Hufnagel & al., 2004)**.

D'autres travaux ont défini les souches de sérotypes CPS-C comme contenant le gène *cpsF*, qui code pour une enzyme de glycosylation ne se trouve que dans la capsule CPS-C (Thurlow, Thomas, & Hancock, 2009). En se basant sur la purification des composants de la capsule d'une souche de sérotype A, il a été admis que les sérotypes A et B possédaient un polysaccharide capsulaire d'une nature chimique différente de celle des sérotypes C et D, (Wang & al., 1999). Tandis que, une autre recherche a montré que cette matière était en fait un acide lipotéchoïque qui avait été modifié par inattention durant la procédure de purification (Theilacker & al., 2006). Les antisérums contre les sérotypes A et B contiennent des anticorps reconnaissant l'ALT, qui est accessible, car ces souches ne possédant pas de capsule (Huebner & al., 1999 ; Theilacker & al., 2006 ; Theilacker & al., 2011 ; Thurlow, Thomas, & Hancock, 2009).

L'acide lipotéchoïque d'*E. faecalis* est un composant important de la paroi cellulaire qui influe sur la façon dont le système immunitaire reconnaît l'infection. Les anticorps dirigés spécifiquement contre les ALT ont donné lieu à la mort opsonique (Huebner & al., 1999 ; Theilacker & al., 2011), et sont protecteurs dans un modèle de souris atteinte d'une infection à entérocoques (Huebner & al., 2000). Toutes les souches d'*E. faecium* séquencées contiennent des homologues *cpsAB*, mais pas les autres gènes de la capsule, ce qui suggère que ces souches sont incapables de produire une telle capsule.

II.6.2.7. Capsule (hydrate de carbone variable)

Plusieurs études ont démontré que la méthode importante de la clairance immunitaire des entérocoques est l'opsonisation médiée par les neutrophiles, avec ou sans la participation du complément. Cependant, certaines souches ont été signalées d'être résistantes à l'opsonisation, et un polysaccharide, peut-être un composant capsulaire, a été identifié par plusieurs observations indirectes comme le médiateur de la résistance (Arduino, Murray, & Rakita, 1994 ; Huebner & al., 1999 ; Rakita & al., 2000 ; Rakita & al., 1999). Par exemple, l'exposition de la souche d'*E. faecium* DO (également connu sous le nom TEX16) au periodate de sodium, mais pas les protéases ou les phospholipases, élimine la résistance à l'opsonisation (Arduino, Murray & Rakita, 1994). Néanmoins, des anticorps dirigés contre cette souche, et ciblant la fraction des carbohydrates, ont aussi éliminé la résistance opsonique, ce qui a rétabli le pouvoir des neutrophiles à éliminer cette souche (Rakita & al., 2000).

L'identification d'une capsule d'*E. faecalis* a été obtenue par purification d'un hydrate de carbone qui a été localisée à la surface de la bactérie lors de l'utilisation d'anticorps spécifiques. Un locus génétique *cps* (polysaccharides capsulaires), code les gènes

nécessaires pour produire ces hydrates de carbone, a également été identifié (**Hancock & Gilmore, 2002**). Une souche ayant une mutation isogénique dans l'un des gènes (*cpsI*) est plus sensible à la destruction opsono phagocytaire par les neutrophiles et fut compromise de sa capacité à persister dans les ganglions lymphatiques de la souris, ce qui montre que la capsule contribue à la virulence chez la souche OG1RF. De plus, lorsque des anticorps spécifiques aux capsules ont été inclus dans l'essai de phagocytose, les souches d'*E. faecalis* productrices de capsules ont été détruites plus efficacement, ce qui suggère que ces anticorps pourraient avoir des indications thérapeutiques (**Hancock & Gilmore, 2002**). Cela laisse suggérer que la présence de la capsule est associée à une lignée pathogène d'*E. faecalis*.

II.6.2.8. Polysaccharide commun de la paroi cellulaire : Epa, antigène polysaccharidique des entérocoques

L'existence d'un polysaccharide de paroi cellulaire qui est commun à toutes les souches d'*E. faecalis* a été d'abord détectée par une étude de dépistage des antigènes communs produits lors des infections humaines par *E. faecalis*. Une étude de caractérisation de cet antigène a pu démontrer, en introduisant le fragment d'ADN d'intérêt provenant de la souche *E. faecalis* OG1RF dans une souche d'*E. coli*, qu'il y avait expression d'un produit résistant à la protéinase K et que ce produit consistait en un hydrate de carbone. Le séquençage du gène *epa* a permis de démontrer l'implication de ce gène dans la biosynthèse et l'exportation de polysaccharides (**Xu & al., 1997 ; Xu, Murray & Weinstock, 1998**).

Une caractérisation ultérieure a défini les gènes impliqués dans la production du polysaccharide Epa comme *epaA-epaR*, qui correspond à EF2198-EF2177 dans le génome de la souche V583 (**Teng & al., 2009**). Un locus *epa* similaire existe chez toutes les souches séquencées d'*E. faecium*, sauf que les trois gènes [*epaI*, *epaJ*, *epaK*] sont manquants (**Hancock & Gilmore, 2002 ; Xu, Murray, & Weinstock, 1998 ; Xu & al., 2000**).

La perte du polysaccharide Epa a donné lieu à des phénotypes de virulence atténuée dans une variété de modèles et d'essais, ce qui suggère que ce polysaccharide contribue aux propriétés pathogènes d'*E. faecalis*. Des mutants par insertion dans les gènes *epaB* et *epaE* ont entraîné une atténuation de la mort dans un modèle de péritonite de souris avec une augmentation de deux à trois fois plus de la DL₅₀ (**Xu & al., 2000**). Ces deux mutants étaient également plus sensibles à la phagocytose et à la mort médié par les neutrophiles, ce qui suggère que ce polysaccharide de la paroi cellulaire permet à *E. faecalis* de s'évader

du système immunitaire [Teng & al., 2002]. Ce polysaccharide peut aussi contribuer à la colonisation et à l'invasion des tissus, ainsi les mutants *epa* sont en outre déficient en la formation de biofilm sur une surface en polystyrène [Mohamed & al., 2004] et la translocation à travers une couche monocellulaire polarisée des cellules épithéliales du colon [Zeng & al., 2004].

II.7. Antibiorésistance chez les entérocoques

L'importance clinique du genre *Enterococcus* est directement liée à sa résistance aux antibiotiques, ce qui contribue au risque de colonisation et à l'infection. Les espèces cliniquement plus importantes sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Bien que les caractéristiques de résistance de ces deux espèces diffèrent de façon importante, ils sont soit intrinsèquement résistants, et les gènes de résistance sont situés sur le chromosome, ou ils possèdent des déterminants de résistance acquise qui sont situés sur des plasmides ou des transposons [Clewell, 1990 ; Murray, 1990]. La résistance intrinsèque aux antibiotiques comprend la résistance aux céphalosporines, β -lactamines, sulfamides et aux faibles concentrations de clindamycine et des aminoglycosides, tandis que la résistance acquise comprend la résistance au chloramphénicol, à l'érythromycine, à des concentrations élevées de clindamycine et aminoglycosides, à la tétracycline, à des concentrations élevées de β -lactamines, aux fluoroquinolones et aux glycopeptides tels que la vancomycine [Murray, 1990 ; Leclercq, 1997].

II.7.1. Mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques aux antibiotiques

Beaucoup d'efforts ont été consacrés à la compréhension des mécanismes moléculaires de la résistance des entérocoques.

Comme indiqué précédemment, les entérocoques présentent une résistance significative à une grande variété d'agents antimicrobiens. Certainement cette résistance est presque pertinente dans la plupart des contextes écologiques naturels occupés par les entérocoques. Comme commensaux normaux du tractus gastro-intestinal humain, les entérocoques sont régulièrement exposés à une myriade d'antibiotiques au cours des soins médicaux, et la résistance des entérocoques joue un rôle clé dans la dynamique écologique qui se produit pendant et après un traitement aux antibiotiques. En outre, leur résistance a confondu les efforts déployés par la médecine moderne pour faire face aux infections causées par les entérocoques.

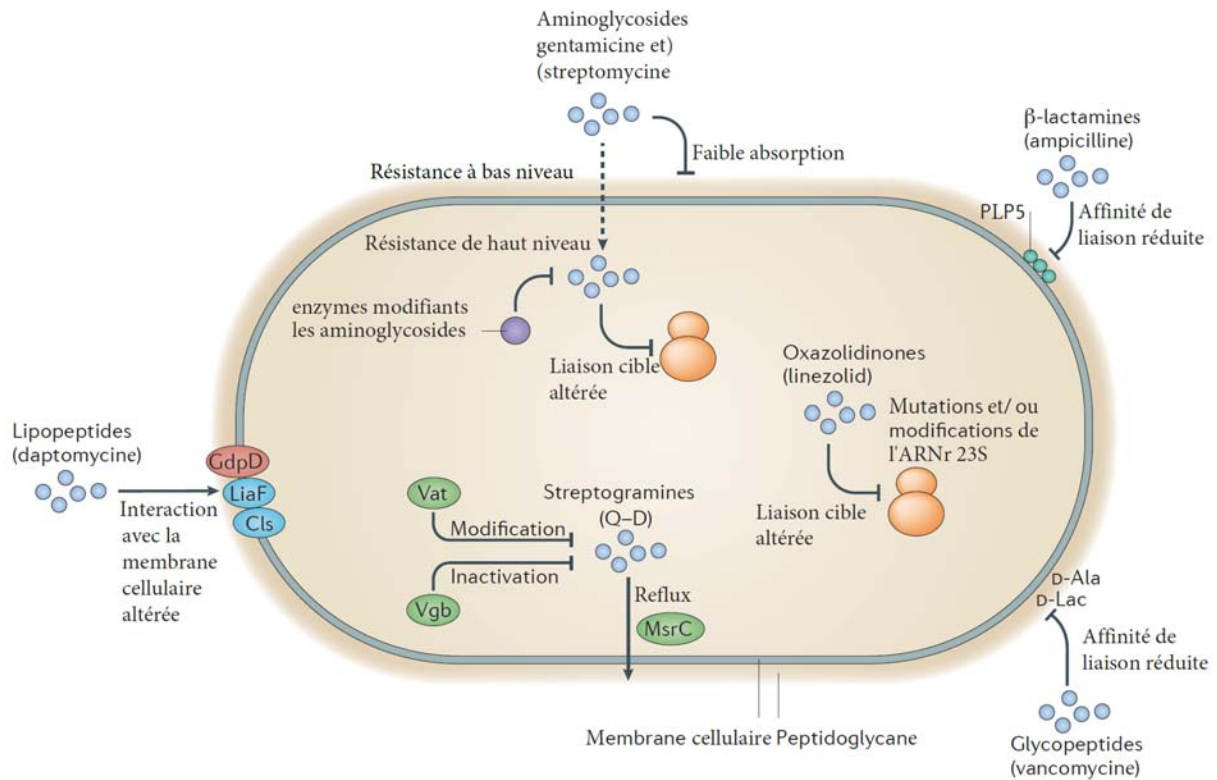


Figure 6 : Les mécanismes essentiels de la résistance des entérocoques aux antibiotiques [Arias & Murray, 2012].

II.7.1.1. La résistance intrinsèque

Laquelle est codée dans le génome de tous les membres de l'espèce, elle diffère de la résistance acquise, en ce que cette dernière est présente chez seulement quelques membres de l'espèce et est obtenue par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles [ou via sélection lors de l'exposition aux antibiotiques].

La résistance intrinsèque modérée réfère 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*). Cette résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques peut avoir engendré un avantage cumulatif des entérocoques dans l'acquisition de gènes codant pour de la résistance à de fortes concentrations envers d'autres antimicrobiens [Tannock & Cook, 2002]. Il faut noter que ce n'est pas toutes les espèces d'*Enterococcus* ont des résistances intrinsèques (ex. : *E. durans*).

Les entérocoques sont beaucoup plus résistants de façon intrinsèque envers les antimicrobiens que d'autres bactéries à Gram-positif cliniquement importantes, mais la raison de cette observation est encore mal connue. 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 & Cook, 2002). Le tableau suivant montre les différents mécanismes utilisés par les entérocoques pour résister aux antibiotiques.

Tableau 8 : Résistance intrinsèque aux antimicrobiens chez les entérocoques (Tremblay, 2012).

Antimicrobiens	Mécanisme de résistance intrinsèque
Bêta-lactamines	Surproduction de PLP de faible affinité et/ou diminution d'affinité pour la liaison des bêta-lactamines
Aminoglycosides	Membrane cellulaire imperméable, faible entrée, et manque d'une chaîne de transport d'électrons
Clindamycine et lincomycine (<i>E. faecalis</i>)	Faible entrée et faible perméabilité
Quinolones	Faible perméabilité, entrée réduite et environnement anaérobie
Triméthoprim- sulfaméthoxazole	Résistance <i>in vivo</i> par l'utilisation de folates exogènes
Streptogramines A (<i>E. faecalis</i>)	Entrée réduite par transporteur ABC
Glycopeptides (<i>E. gallinarum</i> et <i>E. casseliflavus</i>)	Présence d'une ligase D-Ala-D-Ser (phénotype VanC)

II.7.1.2. Résistance aux β -lactamines

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines inhibent la croissance des bactéries en servant de substrats de suicide pour la D, D-transpeptidases (également connu sous le nom de protéines de liaison à la pénicilline ou PLP) qui catalysent la réticulation des chaînes peptidiques latérales du peptidoglycane au cours de la synthèse de ce dernier. Une fois modifiés par un antibiotique du type bêta-lactame, les PLPs sont inactivés, ce qui empêche la synthèse continue de la paroi cellulaire. Les entérocoques sont intrinsèquement insusceptibles aux bêta-lactamines, mais le degré de l'insusceptibilité varie entre les différentes classes de bêta-lactamines et entre les espèces des entérocoques : les pénicillines ont le plus d'activité sur les entérocoques (et *E. faecium* est intrinsèquement un peu plus résistante qu'*E. faecalis*), les carbapénèmes un peu moins, et les céphalosporines présentent la moindre activité. Ce spectre d'activité se traduit par l'utilité de ces médicaments pour le traitement, dans la mesure où l'ampicilline reste une thérapie efficace contre les infections aux entérocoques susceptibles, cependant les céphalosporines sont totalement inefficaces contre les entérocoques. En fait, l'utilisation antérieure des céphalosporines est un facteur de risque majeur pour l'acquisition d'une infection à entérocoques (Shepard & Gilmore, 2002).

La non susceptibilité intrinsèque des entérocoques aux bêta-lactamines implique la production de la protéine (Plp5) à faible affinité de la classe B des protéines de liaison à la pénicilline, un orthologue de la protéine (Plp2a) à faible affinité qui est exprimée par des isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (**Gonzales & al., 2001**).

En raison de son affinité relativement faible pour les bêta-lactamines, la protéine Plp5 codée par un gène chromosomique est capable d'effectuer la synthèse du peptidoglycane à des concentrations des antibiotiques bêta-lactames qui saturent tous les autres PLPs des entérocoques (**Canepari & al., 1986**), et elle est donc nécessaire pour la résistance aux bêta-lactamines (**Arbeloa & al., 2004 ; Rice & al., 2005**).

Plp5 est nécessaire aussi bien pour la résistance intrinsèque caractéristique des entérocoques aux bêta-lactamines, tels que leur résistance intrinsèque à la céphalosporine, ainsi que pour la résistance acquise aux membres de la famille des bêta-lactamines (par exemple l'ampicilline), à laquelle autrement les entérocoques sont cliniquement susceptibles.

II.7.1.2.1. La résistance à l'Ampicilline

Les modifications de Plp5 sont associées à une résistance accrue aux bêta-lactamines, tels que l'ampicilline. Par exemple, le gène codant la protéine Plp5 trouvé chez les souches nosocomiales résistantes à l'ampicilline d'*E. faecium* diffère de 5% du gène correspondant des souches susceptibles à l'ampicilline associées à la communauté (**Garnier & al., 2000**). La plupart des études faisant état d'une association entre des mutations sur le Plp5 et la résistance à l'ampicilline accrue ont été effectuées sur des isolats cliniques non isogéniques, chez lesquels autres facteurs inconnus que le Plp5 peuvent influencer la résistance. Pour contourner cette limitation, **Rice** et ses collègues ont utilisé un système plasmidique d'expression de *p/p5* pour investiguer l'impact des substitutions des acides aminés spécifiques dans Plp5 sur la résistance à l'ampicilline (**Rice & al., 1991**).

Des substitutions qui avaient été précédemment impliqués comme contribuant à la résistance à l'ampicilline dans des souches cliniques confèrent des niveaux modestes de résistance lorsqu'elles sont exprimées à partir du gène *p/p5* d'origine plasmidique dans un hôte *E. faecium* autrement susceptible, fournissant ainsi une preuve directe de leur influence.

Des combinaisons de mutations ponctuelles, en particulier Plp5 M485A avec une insertion de Ser à la position 466, ont donné lieu à des niveaux de résistance

substantiellement accrue. En outre, une corrélation a été établie entre l'affinité à la liaison aux antibiotiques, des mutants recombinants Plp5 purifiés, avec le degré de résistance fournie par ces allèles. Une autre étude a révélé que le facteur déterminant *plp5* d'origine chromosomique peut être transféré entre les souches d'*E. faecium* par conjugaison, ce qui suggère un mécanisme par lequel la résistance aux concentrations élevées d'ampicilline attribuée par les allèles mutants *plp5* pourrait être diffusée aux isolats cliniques (Rice, 2005). Bien que le mécanisme de transfert conjuguatif n'a pas été établi dans cette étude, un mécanisme plausible pourrait impliquer la mobilisation médiée par des plasmides conjuguatifs co-intégrés des entérocoques, comme décrit récemment chez *E. faecalis* (Marshall & al., 2002). Pareillement à *E. faecium*, des mutations dans Plp5 des isolats cliniques d'*E. faecalis* peuvent également conduire à une résistance accrue aux antibiotiques bêta-lactames, tels que l'imipénème et l'ampicilline (Oyamada & al., 2006).

II.7.1.3. La résistance aux aminoglycosides

Depuis la découverte de l'effet synergique d'une combinaison de streptomycine et de la pénicilline sur les entérocoques dans les années 1940, les aminoglycosides ont été les antibiotiques de choix et les plus importants dans le traitement des infections aiguës dues aux entérocoques (Eliopoulos & al., 1990). À partir du milieu des années 1970, le développement progressif de la résistance aux aminoglycosides a servi comme une illustration de la plasticité génétique des entérocoques.

Les aminoglycosides agissent en se liant à l'ARNr 16S de la sous-unité ribosomique 30S et d'interférer avec la synthèse des protéines. Les entérocoques présentent généralement un niveau modéré de résistance intrinsèque aux aminoglycosides qui a été attribué à une mauvaise absorption des antibiotiques. Par exemple, l'analyse des mutants sélectionnés qui présentaient une résistance accrue à la gentamicine in vitro a suggéré que les troubles de l'absorption de la gentamicine peuvent contribuer directement à une résistance accrue, bien que les mutations ou les gènes responsables de l'altération de l'absorption ne sont pas clairement identifiés. Nonobstant, certaines données suggèrent que d'autres mécanismes peuvent contribuer à, ou même être principalement responsable de la résistance intrinsèque de certains entérocoques aux aminoglycosides (Aslangul & al., 2006).

À cette fin, l'acquisition des enzymes modifiant les aminoglycosides codées par des gènes portés sur des plasmides ou des transposons, tels que les phosphotransférases, les acétyltransférases et les nucléotidyltransférases, a été bien illustrée. De nos jours, la résistance à de hauts niveaux de la streptomycine est relativement commune, constituant

environ 30-50% des isolats [McCracken & al. 2013]. Les deux *E. faecium* et *E. faecalis* ont acquis une 3' phosphotransferase codée par un gène situé dans un plasmide, qui confère une résistance à de hauts niveaux de kanamycine et élimine la synergie avec la pénicilline / amikacine, en dépit de la résistance de bas niveau à ce dernier. La résistance de haut niveau à la gentamicine est également un problème commun dans le monde entier, ce qui représente jusqu'à 55% des isolats cliniques d'entérocoques.

II.7.1.4. La résistance aux glycopeptides

Les glycopeptides tels que la vancomycine, la téicoplanine et leurs dérivés plus récents sont utilisés pour traiter les infections graves dues aux bactéries Gram positives résistantes. Les glycopeptides inhibent la croissance bactérienne en interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane, par la formation des complexes avec les terminaisons peptidiques de peptidoglycane D-Ala-D-Ala sur la surface externe de la cellule, ce qui empêche les enzymes biosynthétiques de la paroi cellulaire (c'est-à-dire les PLP) de les utiliser comme substrats pour la transglycosylation et la transpeptidation, et donc une altération de l'intégrité de la paroi cellulaire.

Neuf clusters de gènes distincts conférant une résistance aux glycopeptides ont été décrits chez les entérocoques. Ces déterminants diffèrent les uns des autres à la fois génétiquement et phénotypiquement, en fonction de leur emplacement physique (codé sur un élément génétique mobile ou dans le génome) ; les glycopeptides spécifiques auxquels ils confèrent une résistance (souvent distingués sur le plan opérationnel comme fournissant une résistance à la fois à la vancomycine et à la téicoplanine, ou fournissant une résistance à la vancomycine, mais non à la téicoplanine) ; le niveau de résistance qu'ils confèrent ; si la résistance est exprimée par voie inductible ou constitutive ; et le type de précurseur de peptidoglycane produit par leurs produits géniques.

Les groupes de gènes *van* codent plusieurs fonctions : (I) un module de régulation, à savoir un système de transduction de signal à deux composants qui est responsable de la détection de la présence de glycopeptides et de l'activation de l'expression des gènes de résistance dans des types de *van* inductible ; (II) les enzymes qui produisent les précurseurs de peptidoglycane modifiés, y compris la machinerie enzymatique qui est nécessaire pour produire le substitut approprié (D-Lac ou D-Ser) et une ligase qui fusionne D-Ala avec D-Lac ou D-Ser pour faire le dipeptide correspondant qui peut être incorporé dans des précurseurs de peptidoglycane via la machinerie biosynthétique normale de la cellule ; et (III) les D, D-carboxypeptidases qui éliminent l'un de précurseur de peptidoglycane normal (non modifié) synthétisé par le mécanisme biosynthétique naturel de

la cellule, assurant ainsi que presque tous les précurseurs atteignant la surface cellulaire sont de la variété modifiée.

Les groupes de gènes de *van* sont généralement désignés par les noms donnés aux ligases qu'ils codent (*vanA*, *vanB*, *vanC*, et ainsi de suite). Les types *vanA* et *vanB* sont les plus fréquents parmi les isolats cliniques et ont été largement étudiés en détail.

Le facteur VanA confère un niveau élevé de résistance à la vancomycine et à la téicoplanine. VanA est typiquement codé sur Tn1546 ou des transposons apparentés, et comprend sept trames de lecture ouvertes transcrites à partir de deux promoteurs séparés. L'appareil de régulation est codé par le système à deux composants *vanR* [régulateur de réponse] et *vanS* [capteur kinase], qui sont transcrit à partir d'un promoteur commun, tandis que les autres gènes sont transcrits à partir d'un second promoteur. Les produits génétiques qui spécifient la production des précurseurs de peptidoglycane modifiés comprennent VanH [déshydrogénase qui convertit le pyruvate en lactate] et VanA [ligase qui forme le dipeptide D-Ala-DLac]. Les peptidases VanX [dipeptidase qui clive D-Ala-D-Ala] et VanY [D, Dcarboxypeptidase] servent à éliminer les précurseurs naturels du peptidoglycane de la cellule. Le 7^e gène, *vanZ*, est souvent appelé une fonction « accessoire », mais son rôle dans la résistance n'est pas entièrement compris.

Le locus *vanB* confère une résistance modérée à élever à la vancomycine, mais n'est pas induit par la téicoplanine, *vanB* est habituellement acquis sur des transposons de type Tn5382 / Tn1549, qui se produisent sur des plasmides ou dans le chromosome de l'hôte.

L'organisation génétique de *vanB* est semblable à celle de *vanA*, en ce qu'elle contient deux promoteurs distincts transcrivant sept cadres de lecture ouverts, mais il existe quelques différences significatives. Par exemple, bien que *vanB* encode un système à deux composants [nommé *vanRB* et *vanSB*], ce système de signalisation est considérablement différent de celui codé dans *vanA*. *vanB* code pour des homologues de VanH et de la D-Ala-D-Ala ligase [codée par *vanB*], ainsi que des peptidases [VanX et VanY]. Cependant VanB manque d'un homologue de VanZ, et au lieu de cela code une protéine nommée VanW, dont le rôle dans la résistance n'est pas clairement compris.

II.7.1.5. La résistance à la daptomycine

La daptomycine est un antibiotique lipopeptidique avec une puissante activité bactéricide in vitro contre les bactéries Gram positives. Son mécanisme d'action n'a pas été élucidé clairement, mais on pense qu'il implique une insertion dépendante du calcium

dans la membrane cytoplasmique suivie par une dépolarisation membranaire, une libération d'ions potassium intracellulaire et une mort cellulaire rapide (**Alborn, & al., 1991, Matsumura & Simor, 1998, Silverman & al., 2003**).

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

Le développement de la résistance à la daptomycine semble être associé à des changements ultrastructuraux profonds de l'enveloppe cellulaire et de l'appareil septal, bien qu'il reste peu clair si ces changements sont fonctionnellement importants pour la résistance ou simplement une conséquence accidentelle des mutations. LiaF fait partie du système de régulation LiaFSR à trois composants, qui est connu pour coordonner la réponse de l'enveloppe cellulaire aux antibiotiques et aux peptides antimicrobiens dans certaines bactéries Gram positives, ce qui suggère que les perturbations dans l'activité de ce système de signalisation peuvent modifier les propriétés de l'enveloppe de telle sorte que la daptomycine ne peut plus interagir avec, ou s'insérer dans la membrane de manière efficace.

Dans des études parallèles, **Palmer** et ses collaborateurs ont systématiquement choisi cas par cas les variantes d'*E. faecalis* résistantes à la daptomycine in vitro (**Palmer, Kos, & Gilmore, 2010**) et ont caractérisé l'ordre d'apparition des mutations correspondant à une résistance accrue à la daptomycine. La comparaison des séquences génomiques entières a identifié des mutations dans sept gènes, dont *cls*, *rpoN* et des gènes supplémentaires dont les fonctions cellulaires dans d'autres contextes n'ont pas été établies.

Le transfert de l'allèle mutant *cls* à une souche *E. faecalis* sensible confère une résistance accrue à la daptomycine, ce qui prouve sans ambiguïté que la mutation *cls* est suffisante pour la résistance.

Partie II

Matériels et Méthodes

III.1. Etude physicochimique et microbiologique du lait de chamelle

Le lait de chamelle comme tous les autres types de lait est un milieu propice pour le développement de plusieurs microorganismes. Cependant, il se caractérise par une composition biochimique et des paramètres physiques qui influent sur les types de microorganismes qui peuvent le peupler par rapport aux autres laits.

De ce fait, on se propose ici d'avoir une meilleure connaissance des caractéristiques physicochimiques et microbiologiques du lait de chamelle produit dans la région de Béchar au sud-ouest algérien.

Selon les données statistiques de la direction des services agricoles de Bechar (**DSA**) en 2012, l'effectif camelin a été estimé à 24200 têtes, dont 12803 têtes sont des chameaux réparties sur les différentes communes de la wilaya. Voir tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Répartition de l'effectif camelin sur les communes de la wilaya de Béchar. (DSA, 2012)

Commune	Effectif camelins (têtes)	
	Total	Chamelle
Béchar	1600	1432
Beni Ounif	1060	799
Boukais	300	280
Kenadsa	320	180
Taghit	1690	700
Abadla	2713	2100
Erg-Ferradj	1054	880
Mechraa H, B	1045	795
Tebelbala	5011	4835
Igli	320	170
Beni Abbes	8238	ND
Tamtert	110	ND
El Ouata	1074	556
Kerzaz	100	60
Beni Ikhlef	30	20
Timoudi	78	50
Ouled Khodeir	19	6
Ksabi	32	12
Total Wilaya	24200	12803

ND: Non déterminé

III.1.1. Description de la zone d'étude

La wilaya de Béchar située à 1000 km au sud-ouest de la capitale Alger, et avec une superficie de 161400 km² est limitée au nord par la wilaya de Naâma, au sud par la wilaya d'Adrar, au sud-ouest Tindouf, à l'ouest par le Maroc, et à l'est par la wilaya d'El-Bayadh.

L'élevage camelin est une activité pratiquée dans la région d'ESSAOURA depuis longtemps. Elle abrite un troupeau camelin composé du point de vue racial de deux races importantes à savoir la race locale *Sahraoui* et la race *Reguibi* appartenant à l'espèce *Camelus dromedarius*. La principale ressource alimentaire pour le cheptel camelin dans cette région est celle du parcours naturel. Ces parcours camelin sont généralement localisés dans trois zones géographiques avec des caractéristiques écologiques différentes.

La zone 1 : située entre la daïra d'Abadla, la daïra de Kenadsa, Béchar et Beni Ounif, elle regroupe les zones de parcours sub-steppiques de la région nord de la wilaya de Béchar.

La zone 2 : située entre la daïra de Beni Abbas et la daïra d'Igli, elle regroupe les parcours sahariens sur Hamadas, ce sont des reliefs caillouteux à végétation épineuse et de faible densité.

La zone 3 : située entre le sud et le sud-est de la wilaya de Béchar et constituée de parcours sahariens ou Erg. Ce sont des zones dunaires dont la densité végétale est très faible.

III.1.2. Echantillonnage

Quarante (40) échantillons du lait de chamelle cru ont été prélevés entre 2010 et 2013. A partir de chaque chamelle tirée au hasard nous avons prélevé 200 ml dans des flacons en verre stériles. La traite des chammelles a été effectuée le matin avant la sortie du troupeau au pâturage. Après le prélèvement, les échantillons sont étiquetés et placés immédiatement dans une glacière à (+4°C) afin de les acheminer au laboratoire. Les analyses physicochimiques et microbiologiques sont effectuées le jour même du prélèvement.

Tableau 10 : Echantillons du lait de chamelle prélevés de différents sites de la région sud-ouest (Bechar)

N°de l'échantillon	Date de prélèvement	Région	N°de l'échantillon	Date de prélèvement	Région	N°de l'échantillon	Date de prélèvement	Région
E1	07 /04/2010	Twila	E15	28/02/2012	Oum Draben	E29	22/04/2012	Taghit
E2	07 /04/2010	Twila	E16	28/02/2012	Oum Draben	E30	06/01/2013	Hassi elhouari
E3	18/04/2010	Boudib	E17	05/03/2012	El Morra	E31	20/01/2013	Hassi elhouari
E4	18/04/2010	Boudib	E18	12/03/2012	El Morra	E32	20/01/2013	Hassi elhouari
E5	26/04/2010	Zouzfana	E19	18/03/2012	El Morra	E33	20/01/2013	Hassi elhouari
E6	26/04/2010	Zouzfana	E20	21/02/2012	El Morra	E34	03/02/2013	Boudib
E7	26/04/2010	Zouzfana	E21	21/02/2012	El Morra	E35	03/02/2013	Boudib
E8	02/05/2010	Boudib	E22	28/02/2012	Oum Draben	E36	03/03/2013	Hassi elhouari
E9	02/05/2010	Boudib	E23	28/02/2012	Oum Draben	E37	03/03/2013	Hassi elhouari
E10	09/05/2010	Oued Sfaya	E24	28/02/2012	Oum Draben	E38	31/03/2013	El mharaa
E11	09/05/2010	Oued Sfaya	E25	12/03/2012	Abadla	E39	31/03/2013	El mharaa
E12	21/02/2012	El Morra	E26	17/03/2012	Jorf el barda	E40	31/03/2013	El mharaa
E13	21/02/2012	El Morra	E27	31/03/2012	M'sakka			
E14	28/02/2012	Oum Draben	E28	10/04/2012	Boualala			

III.1.3. Analyses Physicochimiques

III.1.3.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)

Mesure de la différence de potentiel entre une électrode de verre et une électrode de référence réunies en un système d'électrode combinée. On a utilisé dans cette étude un pH-mètre de type (HANNA pH211). Dans un volume de lait de chamelle de chaque échantillon, on plonge le pH-mètre et on note la valeur de pH à 0.01 près à la température de mesure.

III.1.3.2. Détermination de l'acidité titrable (Dornic)

Elle correspond à la neutralisation de l'acidité totale par une solution d'hydroxyde de sodium (soude) de titre N/9, en présence d'un indicateur coloré la phénolphaléine (solution à 1% dans l'éthanol à 95%).

Un degré Dornic correspond à 0.1 g d'acide lactique par litre de lait. L'acidité exprimée en gramme d'acide lactique par litre du lait est égale à :

$$\frac{V_1 \times 0,01 \times 1000}{V_0} = 10 \frac{V_1}{V_0}$$

Où

V_0 : est le volume, en millilitre, de la prise d'essai.

V_1 : est le volume en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium nécessaire

III.1.3.3. Détermination de la densité

La mesure de la densité du lait sert à l'étude de mouillage du lait ce qui influe sur sa qualité. La mesure de la densité est réalisée en utilisant un lactodensimètre. Elle est exprimée par le rapport du poids d'un volume de lait à une température donnée sur le poids d'un volume identique d'eau dans la même température. La lecture de la densité se fait directement à partir d'un lactodensimètre à 20°C, et si la température est différente de 20°C, la formule suivante serait appliquée :

$$D_c = D_{lue} \pm (T_{lue} - 20) \times 0,2$$

Où :

D_{lue} : densité lue.

T_{lue} : Température ambiante

III.1.3.4. Détermination de l'extrait sec total (EST)

La détermination de la matière sèche est basée sur la perte d'eau suite à une dessiccation. Elle est déterminée par étuvage à une température de $103\pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'un poids constant (pesée après dessiccation à l'étuve à 102°C).

Le résultat est exprimé selon la formule suivante :

$$\text{EST} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

Où :

M_0 : la masse en grammes de la capsule vide,

M_1 : la masse en grammes de la capsule et de la prise d'essai.

M_2 : la masse en grammes de la capsule et du résidu après dessiccation,

III.1.3.5. Détermination du taux de cendre

Le taux de cendre du lait est obtenu par incinération d'une prise d'essai dans un four à moufle à une température de 600°C jusqu'à la combustion totale de la matière organique, et l'obtention d'une cendre blanchâtre d'un poids constant.

Le résultat final est exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de cendre}\% = \frac{m_1 - m_0}{p} \times 100$$

Où

m_0 : La masse du creuset vide.

m_1 : La masse du creuset incinéré avec l'échantillon.

p : La masse de la prise d'essai.

III.1.3.6. Détermination de l'azote total et la teneur en protéines totales (méthodes de Kjeldahl) (AOAC, 991 .20, 1994)

Introduite en 1883 par **Kjeldahl**, cette méthode est considérée comme référence internationale pour déterminer l'azote total et la teneur en protéines totales contenus dans les produits alimentaires. Elle est réalisée en trois étapes, la digestion (minéralisation), la distillation, et le titrage.

Le lait est digéré dans l'acide sulfurique (H_2SO_4), en utilisant comme catalyseur le sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) avec le sulfate de potassium K_2SO_4 (la fonction du sulfate de

potassium est d'élever le point d'ébullition de l'acide sulfurique et de permettre d'obtenir un mélange oxydant plus fort pour la minéralisation.), l'azote des protéines libéré et retenu sous forme de sel d'ammonium. Addition d'hydroxyde de sodium NaOH excédentaire au minéralisât refroidi concentré pour libérer de l'ammoniac (NH₃), qui est ensuite distillé, et recueilli dans un excédent de solution d'acide borique H₃BO₃, et titré par une solution d'acide chlorhydrique.

L'azote total est déterminé en pourcentage par unité de masse selon la formule suivante :

$$\text{Nitrogène, \%} = \frac{1,4007 \times (V_s - V_b) \times N}{W}$$

Où :

V_s : volume titrant (ml) pour l'échantillon.

V_b : volume titrant (ml) pour le blanc.

N : normalité de l'acide titrant.

W : masse (g) de l'échantillon à analyser.

La teneur en protéines totales est calculée en multipliant l'azote total par un facteur de conversion spécifique.

$$\text{Protéines\%} = \text{N\%} \times K$$

K = facteur de conversion de l'azote en protéine, K= 6,38 pour le lait.

III.1.3.7. Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode GERBER

La séparation complète des lipides exige la destruction de leur enveloppe protectrice. Ceci est effectué par un traitement acide approprié (10 ml d'acide sulfurique concentré à 91-92% pour 11 ml d'échantillon de lait). Les lipides libérés sont ensuite séparés en centrifugation (1200 tr/min pendant 4 minutes). L'addition de l'alcool iso amylique (1 ml) favorise une séparation très nette entre les lipides et la solution acide. Ensuite on note sur l'échelle du butyromètre le pourcentage du taux de lipides contenus dans le lait.

III.1.4 Analyses microbiologiques

Cette analyse va nous permettre d'avoir une idée sur la constitution microbiologique du lait de chamelle produit dans cette région. Elle comporte le dénombrement et/ou la recherche de :

- La flore aérobie mésophile totale,
- Les Coliformes et les coliformes thermo-tolérants
- Les Salmonelles
- Les Streptocoques (Entérocoques),
- Les Staphylocoques,
- Les anaérobies Sulfite réducteurs, et
- Les levures et moisissures.

III.1.4.1. Préparation des dilutions décimales

La réalisation des analyses microbiologiques nécessite d'effectuer une série des dilutions décimales, en vue d'obtenir une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes contenus dans la prise d'essai, et de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume, afin de faciliter l'examen microbiologique. La préparation est réalisée selon la norme **(NF V 08-010, 1996)**.

III.1.4.2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale à 30 °C (FAMT)

Cette flore, appelée aussi FAMR (flore aérobie mésophile revivifiable) est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que de la qualité (propreté) des installations.

Le dénombrement a été réalisé sur gélose PCA (Plat Count Agar) additionnée du lait écrémé, par ensemencement en masse d'1 ml de chacune des dilutions décimales de 10^{-2} et 10^{-3} en double suivi d'une incubation à 30 °C pendant 72 h en aérobiose. On compte les colonies lenticulaires ayant poussé en masse. Le témoin est réalisé avec du TSE **(NF ISO 4833, 1991)**. Le dénombrement a été effectué à l'aide d'un compteur de colonies, en tenant compte uniquement des boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. On calcule le nombre de microorganismes par ml à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Où

$\sum C$: La somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues ;

n_1 : Le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 : Le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

III.1.4.3. Dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermotolérants (NF V 08-050 et NF V 08-060)

Consiste à ensemercer en profondeur, dans les mêmes conditions, une quantité déterminée (1ml) du lait de chamelle et de dilutions décimales 10^{-1} et 10^{-2} dans un milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au lactose (VRBL), coulé dans une boîte de Pétri. Recouvrir les boîtes avec une couche du même milieu, et les incuber à 30 °C pendant 24 h pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes thermotolérants.

Le dénombrement repose sur le comptage des colonies caractéristiques qui sont violacées, d'un diamètre de 0,5 mm ou plus, et parfois sont entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile. Retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques.

Calculer le nombre N de coliformes/coliformes thermotolérants par millilitre, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{1,1d}$$

Où

$\sum C$: est la somme des colonies caractéristiques comptées sur les deux boîtes retenues ;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution comptée.

III.1.4.4. Dénombrement des Streptocoques du groupe D

Le dénombrement se fait en milieu liquide sélectif par la technique du nombre le plus probable (NPP), en deux étapes successives (Guiraud, 2003) :

- ☞ **Test présomptif** : Le milieu (Rothe), un milieu d'enrichissement relativement sélectif, est ensemercé en triple, à partir de chaque dilution 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . Après 24 h d'incubation à 37 °C, la présence d'un trouble microbien permet de conclure que dans les tubes correspondants ont cultivé au moins un Streptocoque fécal présumé provenant de l'inoculum.
- ☞ **Test confirmatif** : Chaque tube positif du test de présomption a fait l'objet d'une confirmation. On utilise l'action de deux agents sélectifs, l'azide et l'éthyle-violet (ou violet hexaméthylé) en repiquant une anse des tubes positifs dans le milieu de Litsky. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, l'apparition d'un trouble homogène avec parfois une pastille violette au fond du tube permet de dire qu'il y a au moins un

Streptocoque fécal dans l'inoculum, donc dans le milieu de Rothe positif utilisé pour l'ensemencement.,

- ✎ **Dénombrement** : le dénombrement est exprimé selon la table de **McGrady**.

III.1.4.5. Recherche des Salmonelles et des Shigelles (Afnor 6579)

Les *Salmonella* peuvent, en effet, être présentes en petit nombre et sont souvent accompagnées d'un nombre beaucoup plus grand d'autres microorganismes. En conséquence, un enrichissement sélectif est nécessaire ; de plus, un préenrichissement est aussi souvent nécessaire afin de pouvoir rechercher les *Salmonella* ayant subi une altération.

✎ **Préenrichissement en milieu non sélectif liquide**

Ensemencement de la prise d'essai (1ml du lait de chamelle) dans un tube contenant 9 ml d'eau péptonée tamponnée, puis incubé à 37°C pendant 16 à 20 heures.

✎ **Enrichissement en milieux sélectifs liquides**

A partir des cultures obtenues en préenrichissement on ensemence un bouillon de vert malachite au chlorure de magnésium (bouillon Rappaport Vassiliadis) par un volume de 0,1 ml, et on incube à 42°C, pendant 24 h. En parallèle on ensemence aussi un bouillon sélénite cystine avec un volume de 1 ml, et on incube à 37°C, pendant 24 h.

✎ **Isolement**

À partir des cultures obtenues en enrichissement, on ensemence avec une anse en surface deux boîtes contenant deux milieux sélectifs solides ;

- Le milieu Hecktoen additionnée d'un additif Hektoen
- Le milieu *Salmonella-Shigella* (**SS**) additionné d'un additif SS.

Ensuite, les incubées à 37°C pendant 24 h. Seront considérées comme positif les boîtes présentant des colonies typiques ayant des aspects caractéristiques des Salmonelles ou des Shigelles. Ces aspects sont les suivants :

- ✎ Sur **S-S** : colonies incolores (lactose -) avec centre noir (production de H₂S), la présence de centre noire élimine la possibilité de *Shigella*.
- ✎ Sur **Hecktoen** :
 - Colonies vertes ou bleuâtres (absence de fermentation des sucres) indique la possibilité de *Shigella* ou *Salmonella* non productrices d'H₂S ;
 - Colonies vertes à centre noir indique la possibilité de *Salmonella* ;
 - Colonies saumon ou jaunes éliminent la possibilité de *Salmonella* ou *Shigella* (sauf *Shigella sonnei*).

III.1.4.6. Recherche des Staphylocoques (NF V 08-057-1)

Consiste à ensemencer en surface un milieu de culture gélosé sélectif (90 ml de la gélose Baird Parker, 10 ml du surnageant de l'émulsion de jaune d'œuf, 1 ml de Tellurite de potassium) coulé dans une boîte de Pétri, avec 0,1 ml de lait de chamelle et 0,1 ml de chaque dilution 10^{-1} et 10^{-2} en double. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37 °C, les colonies noires (réduction de tellurite en tellure noire), brillantes et convexes (1,5 à 2,5 mm de diamètre après 48 heures d'incubation) entourées d'une auréole d'éclaircissement (hydrolyse des protéines de jaune d'œuf) avec un liseré blanc opaque (hydrolyse des lécithines) sont dénombrées.

III.1.4.7. Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs

Après destruction des formes végétatives, par chauffage à 80 °C pendant 10 minutes de 5 ml en double des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} du lait de chamelle, et refroidissement immédiat par l'eau de robinet pendant 10 minutes. Ces prélèvements sont incorporés dans des tubes à vis stériles contenant un milieu de base fondu, régénéré, additionné de sulfite de sodium et de sels de fer (le milieu viande foie). Après incubation à 37°C, les colonies noires ayant poussé en profondeur sont comptées après 18 h, 48 h et 72 h (Guiraud, 2003).

III.1.4.8. Dénombrement des moisissures et levures

Ensemencement en profondeur d'un milieu de base OGA à l'oxytétracycline et à la gentamicine, en double d'1 ml des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} de lait de chamelle. Les boîtes sont incubées couvercle en haut pendant 5 jours à une température de 22 °C. Un témoin a été ensemencé avec le TSE (NF ISO 13 681 V 04-507 Avril 1996). Le dénombrement se fera en fonction de la formule de calcul suivante :

$$N = \frac{\sum C}{1,1d}$$

Où :

- $\sum C$: est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.
- d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

III.2. Isolement et identification des entérocoques

A partir des échantillons du lait de chamelle [40], précédemment, prélevés et analysés, nous avons procédé à l'isolement et l'identification des entérocoques, selon la méthodologie suivante.

III.2.1. Isolement des entérocoques

L'isolement des entérocoques a été réalisé en deux étapes, à partir des résultats du dénombrement des streptocoques du groupe D (fécaux), où on a repiqué les tubes positifs du bouillon Litsky dans du bouillon BHIB, et en parallèle un milieu de culture sélectif solide (Citrates azide) a été ensemencé en profondeur avec 1 ml de lait de chamelle, et 1 ml de chaque dilution 10^{-1} et 10^{-2} . L'incubation s'est déroulée à 37°C et 42°C pendant 24 à 48h.

III.2.2. Purification des isolats

Des essais préliminaires ont été réalisés portant sur l'utilisation de plusieurs milieux (M17, MRS, Citrate azide Tween Carbonate, Citrate azide, BHIA) de culture afin de maintenir le milieu de culture le plus adéquat pour ce type de bactéries lactiques.

Après une constatation visuelle des aspects culturels sur les différents milieux de culture solide, on a sélectionné les colonies distinctes. Ensuite nous les avons purifiées sur les mêmes milieux dont elles ont été issues, et dans les mêmes conditions.

Après croissance des colonies en boîte, on prend de chaque boîte une colonie isolée sur laquelle seront effectuées une coloration de Gram, et la recherche de la catalase. Les bactéries à Gram positif, et catalase négative sont retenues et repiquées sur bouillon MRS ou BHIB, puis incubées à 42°C pendant 18 h. Une dernière purification a été réalisée sur le milieu CATC, où les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies, rose-rouge ou marron, lisses, légèrement bombées dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (**Balows & al., 1992 ; Domig, 2003 ; Heleni & al., 2006**).

III.2.3. Conservation des isolats

a) La conservation à court terme

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur bouillon BHI. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fera tous les trois semaines.

b) La conservation à long terme

À partir des cultures jeunes (18h) sur milieu liquide, on ajoute la culture jeune dans le milieu de culture de conservation. Le milieu de conservation contient du bouillon MRS ou BHI additionné de 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en cryotubes à -20°C. Indiquent que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le bouillon BHI, avant utilisation (**Badis & al., 2004 ; Saidi & al., 2002**).

Les souches conservées seront davantage examinées pour les identifier.

III.2.4. Identifications phénotypiques des isolats

Après purification, coloration de Gram et test de catalase, cent vingt-quatre (124) isolats sont retenus, et seront ensuite caractérisés phénotypiquement, en recherchant plusieurs attributs physiologiques et biochimiques selon le schéma d'identification de **Facklam & Collins (1989)**, et **Devriese & al., (2006)**.

III.2.4.1. Identification physiologique des isolats

III.2.4.1.1. Croissance à différentes températures

Ce test est important, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés aux températures 10 °C pendant sept à dix jours et à 45 °C pendant 24 heures, au bout de ces délais, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10 °C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.

III.2.4.1.2. Croissance dans des conditions hostiles

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) et différents pH donne des renseignements précieux pour l'identification. Les pré-cultures à tester sontensemencées sur des bouillons MRS hypersalés à 4 % et à 6.5 % de NaCl, et à des pH 4 et 9,6. Après une incubation à la température optimale pendant 24 h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

III.2.4.1.3. Recherche de type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂) à partir du glucose. Pour se faire, le bouillon MRS estensemencé par les pré-cultures bactériennes,

puis un bouchon de la gélose blanche stérile est coulé en surface. Après incubation, les isolats hétérofermentaires producteurs de gaz poussent le bouchon de la gélose en haut.

III.2.4.2. Identification biochimique des isolats

III.2.4.2.1. Recherche de la catalase

Cette enzyme est mise en évidence par la mise en contact de la culture à étudier avec une goutte d'eau oxygénée (10 %) sur une lame. La présence de l'enzyme se manifeste par l'apparition de bulles gazeuses (d'oxygène)

III.2.4.2.2. Mannitol mobilité

Ce test permet l'étude de la dégradation du mannitol et la recherche de la mobilité des bactéries. L'ensemencement est effectué par piqûre centrale en utilisant le milieu mannitol mobilité semi-solide. Le tube est ensuite incubé à 37°C pendant 24h.

III.2.4.2.3. Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine est un des critères usuels de l'identification au sein de nombreux groupes bactériens. L'esculine est un hétéroside. Son hydrolyse, catalysée par une β -glucosidase et l'esculinase, libère du glucose et l'aglycone : l'esculétine. Produite réagit avec les ions de fer III pour former un précipité noir dans le milieu. Le milieu utilisé est le bouillon à l'esculine. Après 24h-48h à 37°C d'incubation, le résultat se traduit par un noircissement du tube.

III.2.4.2.4. Utilisation du Citrate

Le milieu Citrate de Simmons coulé en tubes est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes. Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide.

Les germes sont ensemencés en stries sur les tubes qui contiennent le milieu de citrate de Simmons incliné, puis incubé à 37°C / 24h. Les germes qui utilisent le citrate comme seule source de carbone entraînent une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.

III.2.4.2.5. Tolérance au tellurite

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées, la gélose à 0.04% de tellurite de potassium par les isolats à tester. Après une période de 24h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires.

III.2.4.2.6. Test d'hémolyse

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang et gélose Columbia additionné de 5% du sang défibriné humain. Après incubation pendant une période de 24h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné.

Les entérocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies); β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié).

III.2.4.2.7. Identification des isolats par la galerie API 20 STREP (Biomerieux)

L'API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Principe

La galerie API 20 STREP comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

III.2.5. Identification moléculaire des isolats

III.2.5.1. Analyse des profils protéiques des isolats par SDS-PAGE

La séparation électrophorétique des protéines cellulaires est une technique sensible, appliquée dans la systématique bactérienne, qui fournit principalement des informations sur la similarité des souches dans la même espèce ou sous-espèce. Cette technique permet l'étude comparative d'un grand nombre de protéines codées par une partie importante du génome, et par conséquent, a un potentiel très élevé pour mesurer les relations entre les isolats.

Les protéines sont séparées en fonction de leurs poids moléculaires, car le SDS un agent dénaturant solubilise les protéines en les rendant linéaires et leurs donnant une charge négative. Par cette méthode il apparaît ainsi de détecter des relations taxonomiques plus large, en particulier au niveau des espèces et sous-espèces, que les méthodes basées sur des paramètres de charge. Nous avons appliqué cette technique pour l'identification de nos isolats.

✿ Principe

Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnelle à sa longueur. Les complexes SDS-protéines qui se forment sont chargés négativement à pH 7 et toutes les protéines possèdent la même densité de charge. Donc, dans des séparations dénaturantes de SDS-PAGE, la migration est déterminée non pas par la charge intrinsèque du polypeptide, mais par le poids moléculaire exprimé en Daltons (**Benguedouar, 2000 ; Coyne et al., 2002**). La séparation des protéines d'une souche bactérienne par SDS-PAGE donne un profil ou électrophore gramme caractéristique de la souche et reproductible si les techniques employées sont standardisées. Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente, mais de mobilité identique (**Ndiaye et al., 2002**).

III.2.5.1.1. Préparation des extraits protéiques selon Merquior & al. (1994)

Dans des microtubes eppendorf un volume de 1500µl de chaque culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle en milieu BHIB, est centrifugé à une vitesse de 2500 tours/min pendant 10 min à 4°C et le culot mis en suspension dans 50 µl de PBS et est centrifugée à une vitesse de 2500 tours/min pendant 10 min ,on enlève la surnagent et le culot mis en suspension dans 100µl de tampon de lyse et porte a dans un bain-marie 100°C pendant 15 min pour une dénaturation complète des protéines pour les bactéries Gram

positif on ajoute lysozyme puis incubé à 37°C pendant 30 – 60 min, ce traitement est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure. Enfin on centrifugée à une vitesse de 11600 tours /min pendant 10 min, et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (w/v) en conditions dénaturantes.

☼ **Tampon de lyse :**

- ✓ Staking buffer 1 ml
- ✓ Glycérol..... 0.8 ml
- ✓ SDS10%.....1.6ml
- ✓ β -mercaptoéthanol..... 0.4 ml
- ✓ Bleu de Bromophénol.....0.02 mg
- ✓ Eau distillée4 ml

Assemblage de la cassette (plaques de verre et le support) et préparation des gels de concentration et de séparation :

- ☼ Utiliser des plaques de verre bien nettoyées et sèches,
- ☼ Serrer à l'aide des deux vices de serrage et monter sur le support de polymérisation,
- ☼ Couler entre les deux plaques de verre de la solution du gel de résolution à 10% préparé comme suit :

III.2.5.1.2. Préparation des gels

a) Gel de séparation (resolving gel) à 10% : (20 ml)

- ☼ Solution d'acrylamide 30%.....6 ml
- ☼ Tampons de séparation4.5 ml
- ☼ Tetraméthylènediamine (TEMED).....9 μ l
- ☼ SDS.....0.18ml
- ☼ Amomium per sulfate.....0.09 ml
- ☼ Eau distillé0.23 ml

b) Gel de concentration (stacking gel) à 5 % :

- ☼ Solution d'acrylamide.....0.825 ml
- ☼ Stacking Buffer1.25ml
- ☼ TEMED5 μ l
- ☼ SDS 10%.....50 μ l
- ☼ Amomium per sulfate 10%.....25 μ l
- ☼ Eau distillée2.85 ml

Juste avant de couler chaque gel, ajoutez du persulfate d'ammonium (ammonium peroxydisulfate) à 10%.

III.2.5.1.3. Préparation du tampon de migration pH 8.3

- ☼ Tris 0.025M 1.06 g
- ☼ Glycine 1.92M 5.04 g
- ☼ SDS 1%..... 0.35 g
- ☼ H₂O QSP 350ml

III.2.5.1.4. Dépôts des échantillons et migration électrophorétique

Avant de déposer les échantillons, remplir les puits avec le tampon de migration. A l'aide d'une micropipette (20µl), un volume de 15 µl de chaque extrait protéique est déposé dans un puits. La migration électrophorétique est réalisée en appliquant une intensité constante de 60 mA et un voltage de 100V.

La migration dure jusqu'à 2h, et elle s'arrêtera automatiquement lorsque le temps se terminera.

III.2.5.1.5. Révélation des bandes protéiques

a) Solution de coloration

- ☼ Solution mère
(bleu de Comassie 0.1% et de méthanol) 50 ml
- ☼ Acide acétique 20 ml
- ☼ Eau distillée qsp..... 200 ml

Après migration, le gel est démoulé. Le gel de concentration est écarté, et donc le gel de séparation est mis dans un récipient contenant la solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par la solution de décoloration et ensuite par l'eau distillée jusqu'à la décoloration complète de gel et l'apparition nette des bandes protéiques.

b) Solution de décoloration

- ☼ Acide acétique 10%..... 20 ml
- ☼ Méthanol 25% 50 ml
- ☼ Eau distillée QSP..... 200 ml

III.2.5.1.6. Analyse numérique des profils protéiques

La caractérisation des souches par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE repose sur le degré de similitude entre les bandes polypeptidiques des isolats et des souches de

référence. Chaque bande est caractérisée par leur poids moléculaire que l'on peut déterminer à partir de leur rapport frontal.

III.2.5.2. Extraction d'ADN par la méthode de Pitcher et al, (1989)

Cette méthode s'applique aux bactéries Gram positif et Gram négatif la différence réside dans l'étape de lyse enzymatique. Dans ce protocole on expliquera uniquement pour les bactéries Gram positif, car les entérocoques sont Gram +. Avec quelques modifications, ce protocole passe par les étapes suivantes :

- ✎ Après une culture des souches dans le bouillon MRS de 18h à 24h on collecte les cellules par centrifugation à 16000xg pendant 2 min.
- ✎ Le culot est suspendu dans 100 µl d'une solution fraîche de lysozyme (50mg /ml) dans du tampon TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH=8), suivi d'une incubation à 37°C pendant 30 min.
- ✎ Les cellules sont ensuite lysées avec 0,5 ml de tampon GES (5 M thiocyanate de guanidium, 100 mM EDTA, 0,5% v/v SDS, pH 8).
- ✎ Les cellules en suspension sont agitées brièvement et laissées à température ambiante durant 10 min.
- ✎ Le lysat est refroidi dans la glace. Un volume de 0,25 ml d'une solution d'acétate d'ammonium (7,5 M) froide est ajouté au lysat en agitant.
- ✎ Les échantillons sont maintenus dans la glace pendant 10 min et occasionnellement agités.
- ✎ On ajoute 0,5 ml de chloroforme/alcool iso-amylque (24 :1).
- ✎ Après agitation les phases sont séparées par centrifugation à 17000xg pendant 20 min.
- ✎ La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 0,54 volume d'isopropanol froid est ajouté.
- ✎ On agite les tubes par renversement pendant 10 min et l'ADN précipité est recueilli par centrifugation à 6500 g durant 1 min.
- ✎ L'ADN collecté est lavé trois fois avec l'éthanol 70%, ensuite séché pour chasser les traces d'alcool.
- ✎ L'ADN est redissous dans 100 µL de tampon TE stérile (pH 8) ou dans de l'eau stérile durant une nuit à +4°C.
- ✎ Ensuite l'ADN est visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier la fiabilité de la méthode d'extraction pour toutes les souches.
- ✎ L'ADN des souches est conservé à -20°C pour d'autres utilisations.

III.2.5.2.1 Electrophorèse et visualisation d'ADN extrait sous l'UV

L'électrophorèse sur gel permet de séparer des molécules en fonction de leur taille en les faisant migrer à travers le gel d'agarose par l'application d'un champ électrique. Leur migration dépend donc à la fois de leur taille, mais aussi de la concentration du gel.

a) Préparation du gel d'agarose

L'ADN génomique extrait des souches est ensuite séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %, (il est préférable d'utiliser le tampon d'électrophorèse pour préparer le gel d'agarose).

- 1) Dans le tampon TBE (0.5X) dissoudre 0,8 g d'agarose et compléter par le même tampon TBE jusqu'à 100 ml pour avoir un gel d'une concentration de 0.8%. Chauffer la solution en agitant jusqu'à ébullition et dissolution totale de l'agarose.
- 2) Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir l'erlenmeyer à main nue (environ 50 °C).
- 3) Placer les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support. Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal.
- 4) Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.
- 5) Laisser se solidifier, puis enlever délicatement le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

b) Chargement et lancement du gel d'agarose

Le gel d'agarose est placé dans la cuve d'électrophorèse où il est immergé dans le tampon TBE (0.5x). Le marqueur de taille (Smart Ladders 10 Kb) est déposé dans le premier puits ; il servira à mesurer le poids moléculaire du fragment d'ADN extrait. Dans les autres puits, on dépose 15µl de chaque échantillon ; chaque échantillon est préparé à partir d'un mélange de 5µl de tampon de charge et 10µl d'ADN extrait. On utilise une tension de 100 V durant 30mn pour bien réaliser la migration. On ferme le couvercle de la cuve et on allume le générateur du courant électrique.

c) Visualisation du gel

Retirer le gel et le plonger dans une solution de coloration à bromure d'éthidium pendant 25 min celui qui permet de révéler des bandes présentes sur le

gel d'agarose. Ensuite, transférer le gel dans un bac rempli d'eau distillée pendant 25 à 30 min pour le lavage. Enfin, on visualise le gel sous la lumière UV dans un Transilluminateur (Bio-Print TX4), et on le photographie.

III.2.5.3. Identification des isolats par la technique ERIC-PCR

a) Principe

Dans les bactéries, il existe des éléments répétitifs chromosomiques éparpillés qui sont distribués de façon aléatoire dans les génomes (**Versalovic, Koeuth & Lupski, 1991a**). Ces séquences sont de tailles différentes et ne codent pas de protéines. Un exemple de ce type de séquences répétitives, les séquences consensus inter-géniques répétitives entérobactériennes (ERIC), également décrites comme des unités répétitives inter-géniques, qui diffèrent de la plupart des autres répétitions bactériennes en étant distribuées dans les génomes de nombreuses espèces. Les séquences ERIC ont d'abord été décrites chez *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, et d'autres membres des *Enterobacteriaceae*, ainsi que *Vibrio cholerae* (**Sharples & Lloyd, 1990 ; Hulton, Higgins & Sharp, 1991**). La séquence ERIC est un palindrome imparfait de 127 pb, qui contient une répétition centrale inversée conservée. Ces séquences sont principalement présentes dans les régions inter-géniques du génome. Le nombre de copies des séquences ERIC va d'environ 30 copies dans *E. coli* à environ 150 copies dans *Salmonella Typhimurium* et de plus de 700 copies dans certaines autres *Enterobacteriaceae* (**Hulton, Higgins & Sharp, 1991**).

La technique ERIC-PCR a d'abord été décrite par **Versalovic, Koeuth & Lupski (1991b)**. Dans cette technique des amorces oligonucléotidiques correspondant à des séquences palindromiques répétées décrites chez les entérobactéries ont été utilisées pour produire des empreintes d'ADN d'isolats bactériens individuels. Elle s'est révélée utile pour le typage de bactéries autres que les entérobactéries comme *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii*. Selon **Dona & al., (2012)** les amorces ERIC peuvent être utilisées pour la caractérisation des entérocoques isolés du lait.

b) Amorces utilisées

Le tableau suivant représente les séquences nucléotidiques des amorces utilisées :

Tableau 11 : Séquences nucléotidiques et caractéristiques des amorces ERIC.

Nom d'amorce	Séquence 5' ____ 3'	Taille (pb)	T _m ° de fusion
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCACA	23	67.6
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	22	66.4

c) Milieu réactionnel

La réaction de l'amplification a été réalisée dans des tubes PCR de 0.2 ml avec un volume final de 25 μ l. Les constituants sont cités dans le tableau ci-dessous :

Nota bene : avant de réunir les constituants dans les tubes PCR il faut mettre ces tubes dans la glace pour empêcher toute réaction aléatoire. Ainsi il faut agiter avec vortex avant de lancer l'amplification.

Tableau 12 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour amplification par ERIC-PCR.

Constituants	Concentration stock	Volume a prélevé	Concentration finale
Tampon (Green GoTaq)	5X	5 μ l	1X
dNTPs Mix (Désoxyribonucléotides)	10 mM (chaque dNTP)	1 μ l	0.4 mM
Taq polymérase (GoG2)	1.25 U/ μ l	1 μ l	1.25 U
MgCl ₂	25 mM	1.5 μ l	1.5 mM
Amorces	20 μ M (pour chacune)	1.2 μ l ERIC 1R 1 μ l ERIC 2	0.8 – 1 μ M
AND matrice (génomique)		2 μ l	\geq 250 ng
Eau bidistillée stérile		7-12 μ l	

d) Conditions d'amplification

L'amplification par PCR en utilisant les amorces ERIC nécessite les conditions suivantes :

Tableau 13 : Les étapes d'amplification utilisées pour la méthode ERIC-PCR. (Dona & al., 2012)

Etapas de PCR	Dénaturation initiale 1 cycle	35 cycles			Elongation finale 1 cycle
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	
T°C/Durée	94°C/3min	94°C/1min	48°C/1min	72°C/5 min	72°C/7 min

N.B. La programmation d'une dernière étape de conservation à +4°C sera nécessaire vue le temps total d'amplification qui prolonge l'expérimentation jusqu'au deuxième jour.

e) Visualisation et traitement du produit PCR sur gel d'agarose

Après achèvement de l'amplification, le produit PCR de chaque micro-tube est chargé dans un gel d'agarose préalablement préparé à une concentration de 1.5% (voir préparation du gel).

Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse, et l'appareil est mis en marche sous une tension de 100V pendant 40-45 min.

Après fin de la migration, le gel d'agarose est coloré comme il a été décrit précédemment. Ensuite il est visualisé et photographié avec le transilluminateur Bio-Print TX4.

Les photos du gel sont analysées par une version d'évaluation du logiciel BioNumerics 7.6 (**Applied Maths. Belgium, 2016**) et un dendrogramme de similarité sera réalisé.

III.3. Caractérisation technologique des entérocoques

III.3.1. Pouvoir acidifiant

Dans des flacons de 250 ml contenant du lait écrémé à 10% et stérilisé par tyndallisation, on ensemence 500 µl d'une suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune sur milieu MRS. Le volume du flacon est réparti sur des tubes stériles à raison de 10 ml par tube, ces derniers sont incubés à 37°C jusqu'au 72h.

- ☞ La mesure du pH et de l'acidité Dornic a été effectuée durant les intervalles suivants (2h, 4h, 18h, 24h, 72h). **(Larpent, 1997)**.
- ☞ Le degré Dornic [D°] sera calculé en fonction du volume de NaOH nécessaire pour la titration selon la règle suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} * 10$$

III.3.2. Pouvoir coagulant

Pour réaliser ce test, dans des flacons stériles 50 ml du lait écrémé stérile a été inoculé par 1ml de culture jeune. Après une incubation à 37°C pendant 48h, on mesure le volume de lactosérum exsudé et on note l'aspect du coagulum obtenu.

III.3.3. La cinétique de croissance

La cinétique de croissance consiste à réaliser des séries de culture pour la même souche, et de suivre l'absorbance (DO) de chaque série avec les intervalles suivants : (0h, 2h, 4h, 18h, 24h, 72h). Pour ce faire un flacon de 100 ml de bouillon MRS est inoculé par 10 ml d'une culture jeune d'une $DO_{620} = 0,5$ ensuite le volume du flacon est réparti dans des tubes à raison de 10 ml par tube, et en incube à 37°C jusqu'au 72h. **(Essid et al, 2009)**.

III.3.4. Activité protéolytique

Le milieu utilisé ici c'est YMA (Yeast Milk Agar) il nous permet de mettre en évidence l'hydrolyse de la caséine par les protéases. L'ensemencement de ce milieu est réalisé par la méthode des spots (contact direct). L'incubation aura lieu au bout de 24h à 48h à 37°C, puis on note la présence ou non des zones d'hydrolyse autour des spots.

III.3.5. Activité amylolytique

Dans un milieu à base d'amidon, et après la répartition et la solidification du milieu dans les boîtes de Pétri, on imbibe un coton tige stérile dans une suspension bactérienne, et on ensemence par une seule strie sur la surface du milieu. L'incubation des boîtes s'effectuera à 37°C pendant 4jour.

- ☞ Lors de la lecture, on ajoute une solution de lugol, l'hydrolyse de l'amidon se traduit par une zone claire autour des stries.

III.3.6. Activité lipolytique

Les lipases d'origines microbiennes permettent de transformer les triglycérides en glycérides partiels (mono et di glycérides) et en acides gras (**Choisy & al., 1984**).

Ce test a été réalisé par la méthode de spot sur un milieu contenant du beurre naturel ou du Tween 80 et Tween 20. Les boîtes seront incubées à 37°C durant 3 à 5 jours. La lipolyse est révélée par une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt après l'ajout d'une solution de sulfate de cuivre.

III.3.7. Pouvoir texturant

Chaque culture jeune (MRS bouillon 18H, 37°C. $DO_{620}=0,5$) de la souche à tester est ensemencées en stries sur gélose hypersaccharosée déjà coulée et solidifier. Après incubation à 37°C pendant 24h, la production des exopolysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (**Leveau et al., 1991**).

III.3.8. Pouvoir épaississant

Ce test a été réalisé par ensemencement de 20ml du lait écrémé stérile reconstitué à 12% additionné de saccharose à 12%, par 500µl de culture jeune 18h ($DO_{620}=0,5$). L'incubation est faite à 37°C pendant 24h. La souche possède un pouvoir épaississant si le gel formé présente une certaine rhéologie visqueuse.

III.3.9. Pouvoir aromatisant

La capacité des souches à produire des composés aromatisants au cours du processus de fermentation peut être mise en évidence sur lait écrémé stérile 10%. Pour ce faire, chaque tube contenant du lait écrémé stérile a été ensemencé par 500µl d'une culture de 18h ($DO_{620}=0,5$), puis incubé à 30°C.

Après incubation pendant 24h et coagulation du lait, 5 gouttes de deux réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII sont ajoutés à chaque tube, Après un délai de 10min. une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoine sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l' α -naphtol (VPI) en donnant un complexe rouge. Un VP positif signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylénglycolique. (**Zourari et al., 1992**).

III.3.10. Pouvoir autolytique

L'activité autolytique est testée dans le tampon PBS (0,1M, pH 7, 2) chaque culture de 18h standardisée ($DO_{620}=0,2$) est transférée dans un microtube stérile. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 12000xg pendant 2min, puis lavées deux fois et ré-suspendues dans 1 ml de tampon PBS. Les cellules suspendues ont subi un cycle de congélation (-20°C pendant 24h) après décongélation, le milieu est incubé a 37°C pendant 24h.

L'activité autolytique est déterminée par le pourcentage d'abaissement de l'absorbance a 620 nm après intervalle de temps, elle est définie selon **(Piraino et al., 2008)**.

$$AA = (A_i - A_t) * 100 / A_i$$

Où :

A_i : Absorbance initiale.

A_t : Absorbance après t jour d'incubation.

III.4. Caractérisation sanitaire des entérocoques

III.4.1. Recherche de la gélatinase

Dans cette méthode, on a utilisé du bouillon nutritif avec 12% de gélatine (**Marra et al., 2007**). Des cultures pures ont étéensemencées aseptiquement par piqure centrale dans ce bouillon, puis sont incubées pendant 24 à 72 h à 37 °C, après elles sont maintenues à 4 °C pendant 30 min avant lecture. Dans les tubes où un organisme produit une gélatinase suffisante, la gélatine reste liquéfiée après refroidissement.

III.4.2. Recherche du type d'hémolyse (la cytolysine)

La méthode de recherche du type d'hémolyse a été décrite précédemment dans la partie d'identification.

III.4.3. Recherche de la résistance des entérocoques aux antibiotiques

a) Principe

Ce test a été réalisé selon les standards de l'institut international des laboratoires cliniques (CLSI) en utilisant la méthode décrite par **Kirby Bauer (CLSI, 2014)**. L'antibiogramme par diffusion permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques.

b) Protocole

A partir des cultures des souches d'entérocoques pures de 24 à 48 heures on a prélevé quelques colonies bactériennes et on les a transférés dans 5 mL d'eau physiologique pour obtenir une suspension d'une opacité équivalente à celle de l'étalon 0,5 MacFarland (environ 1.5×10^8 cellules /mL).

Couler le milieu Mueller – Hinton dans des boites de Pétri à raison de 20 ml par boite. et laisser solidifier puis ensemencer par écouvillonnage. Et laisser quelques minutes pour se sécher.

Appliquer les disques des antibiotiques à l'aide d'une pince stérile (5 disques dans une boite). Puis incubé à 37°C pendant 24h.

c) Lecture et interprétation

Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle et le comparer aux diamètres des concentrations critiques inférieure et supérieure afin de déterminer les caractères sensible, intermédiaire ou résistant de la bactérie vis-à-vis de chaque antibiotique.

III.4.4. La recherche des gènes de résistance aux antibiotiques par la méthode PCR Multiplex

La PCR Multiplex permet d'identifier les quatre génotypes de résistance aux glycopeptides décrits pour les entérocoques (*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, et *vanC-2*) ainsi que l'identification au niveau de l'espèce des quatre espèces des entérocoques cliniquement importantes (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*). [Dutka-Malen et al., 1995]

Les amorces utilisées dans cette technique sont citées ci-dessous dans le tableau :

Tableau 14 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance selon [Dutka-Malen et al., 1995].

Gènes amplifiés	Taille du produit PCR (pb)	Oligodésoxynucléotides		Position	Contenu GC%
		Couple	Séquence (5' __ 3') ^a		
<i>vanA</i>	732	A1 A2	+GGGAAAACGACAATTGC -GTACAATGCGGCCGTTA	175-191 907-891	53 53
<i>vanB</i>	635	B1 B2	+ATGGGAAGCCGATAGTC -GATTCGTTCCCTCGACC	173-189 807-791	53 53
<i>vanC-1</i>	822	C1 C2	+GGTATCAAGGAAACCTC -CTCCGCCATCATAGCT	246-272 1067-51	53 50
<i>vanC-2, vanC-3</i>	439	D1 D2	+CTCCTACGATTCTCTTG -CGAGCAAGACCTTTAAG	455-486 885-869	47 47
<i>ddlE</i> , <i>Faecalis</i>	941	E1 E2	+ATCAAGTACAGTTAGTCT -ACGATTCAAAGCTAACTG	98-116 1038-21	38 39
<i>ddlE</i> , <i>Faecium</i>	550	F1 F2	+TAGAGACATTGAATATGCC -TCGAATGTGCTACAATC	NA ^b NA	37 39

^a+, Amorce sens -, Amorce anti-sens

^b NA, non applicable.

a) Milieu réactionnel

La réaction d'amplification par PCR Multiplex est réalisée dans des micro-tubes PCR de 0.2 ml avec un volume final de 100 µl. la composition du milieu réactionnel est citée dans le tableau suivant :

Tableau 15 : composition du milieu réactionnel pour la recherche des gènes de résistance par la PCR Multiplex (Dutka-Malen et al., 1995).

Constituants	Concentration stock	Volume a prélevé	Concentration finale
Tampon (Green GoTaq)	5X	20µl	2X
dNTPs Mix (Désoxyribonucléotides)	10 mM (chaque dNTP)	5µl	0.5 mM
Taq polymérase (GoG2)	1U/µl	2µl	2 U
MgCl ₂	25 mM	16 µl	4 mM
Amorces	20µM (pour chacune)	2.5µl	0.5 µM
ADN matrice (génomique)		10µl	>= 250 ng
Eau bidistillée stérile		42µl	

b) Conditions d'amplification

Les conditions d'amplification de la PCR Multiplex pour la recherche des gènes de résistance sont citées dans le tableau suivant selon (Dutka-Malen et al., 1995).

Tableau 16 : Les étapes d'amplification pour la recherche des gènes de résistance par PCR Multiplex.

Etapas de PCR	Dénaturation initiale 1 cycle	35 cycles			Elongation finale 1 cycle
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	
T°C/Durée	94°C/2min	94°C/1min	50°C/1min	72°C/1 min	72°C/10 min

N.B. La programmation d'une dernière étape de conservation d'un seul cycle à +4°C.

c) Visualisation et traitement des produits PCR sur gel d'agarose

Après achèvement de l'amplification, un volume de 10 µl de chaque produit PCR mélangé avec 5 µl du tampon de charge est chargé dans un gel d'agarose préalablement préparé à une concentration de 1.5% [voir préparation du gel].

Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse, et l'appareil est mis en marche sous une tension de 100V pendant 40 min.

Après fin de la migration, le gel d'agarose est coloré comme il a été décrit précédemment. Ensuite il est visualisé et photographié avec le transilluminateur Bio-Print TX4.

III.4.5. La recherche des gènes de virulence par la PCR multiplex

Plusieurs facteurs de virulence ont été décrits chez les entérocoques, par exemple, les substances d'agrégation, la gélatinase, la cytolysine, la protéine de surface des entérocoques, et une hyaluronidase.

La PCR multiplex est un essai rapide et pratique qui permet l'amplification simultanée de plus d'un locus dans la même réaction et qui est utilisé dans les laboratoires cliniques et de recherche. Dans cette étude on a utilisé les amorces citées dans le tableau ci-dessous selon un protocole décrit par **Vankerckhoven & al., (2004)**.

Tableau 17 : Séquences et caractéristiques des amorces pour la détection des gènes de virulence. [Vankerckhoven & al., 2004].

Gènes	Facteur de virulence	Nom de l'amorce	Séquence 5' ____ 3'	Taille du produit (pb)
<i>asa1</i>	Substance d'agrégation	ASA 11 ASA 12	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375
<i>gelE</i>	Gélatinase	GEL 11 GEL 12	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213
<i>cylA</i>	Cytolysine	CYT I CYT IIb	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688
<i>Esp</i>	Protéine de surface des entérocoques	ESP 14F ESP 12R	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510
<i>Hyl</i>	Hyaluronidase	HYL n1 HYL n2	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276

a) Milieu réactionnel

La réaction d'amplification par PCR Multiplex est réalisée dans des micro-tubes PCR de 0.2 ml avec un volume final de 50 µl. la composition du milieu réactionnel est détaillée dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Composition du milieu réactionnel pour la recherche des gènes de virulence par la PCR Multiplex (Vankerckhoven & al., 2004).

Constituants	Concentration stock	Volume a prélevé	Concentration finale
Tampon (Green GoTaq)	5X	10 µl	1X
dNTPs Mix (Désoxyribonucléotides)	10 mM (chaque dNTP)	1.5 µl	0.2 mM
Taq polymérase (GoG2)	1U/µl	1.5 µl	1.5 U
MgCl ₂	25 mM	2 µl	1 mM
Amorces	5 µM (pour chacune)	1µl (<i>asa 1, gelE, hyf</i>) 2µl (<i>cylA, esp</i>)	0.1µM 0.2µM
AND matrice (génomique)		5 µl	>= 250 ng
Eau bidistillée stérile		20 µl	

b) Conditions d'amplification

Les conditions d'amplification de la PCR Multiplex pour la recherche des gènes de virulence sont citées dans le tableau suivant selon (Vankerckhoven & al., 2004).

Tableau 19 : Les étapes d'amplification pour la recherche des gènes de virulence par PCR Multiplex.

Etapes de PCR	Dénaturation initiale 1 cycle	35 cycles			Elongation finale 1 cycle
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	
T°C/Durée	95°C/5min	94°C/1min	56°C/1min	72°C/1 min	72°C/10 min

N.B. La programmation d'une dernière étape de conservation d'un seul cycle à +4°C.

c) Visualisation et traitement du produit PCR sur gel d'agarose

Après achèvement de l'amplification, un volume de 20 µl de chaque produit PCR mélangé avec 5µl du tampon de charge (voir annexe) est chargé dans un gel d'agarose préalablement préparé à une concentration de 1.5% (voir préparation du gel).

Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse, et l'appareil est mis en marche sous une tension de 100V pendant 40 min. Après fin de la migration, le gel d'agarose est coloré comme il a été décrit précédemment. Ensuite il est visualisé et photographié avec le transilluminateur Bio-Print TX4.

Partie III

Résultats & Discussion

IV.1. Etude physicochimique et microbiologique du lait de chamelle

IV.1.1. Résultats & discussions

IV.1.1.1. Analyses physicochimiques

Les résultats des analyses physicochimiques sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 20 : Valeurs moyennes des paramètres physicochimiques du lait de chamelle

Paramètres physico-chimiques	pH	Acidité dornic (°D)	Densité	EST (g/l)	Taux de cendre (g/l)	Teneur en protéines totales (g/l)	Matière grasse (g/l)
Moyenne (n=40)	6,8	18,7	1028,06	118,6	7,8	29,6	40,4
	±0.2	±0.1		±0.1	±0.1	±0.2	±10

Les valeurs de pH mesurées pour les échantillons du lait de dromadaire se situent entre 6,26 – 6,95. Ces valeurs confirment que globalement le pH du lait camelin est légèrement acide, la valeur moyenne est de 6,8.

Ces valeurs obtenues sont en corrélation à celles citées dans maints travaux. **Lombarkia et al (2007)** ont signalé une valeur de pH se situant dans la même gamme 6,51 et 6,69. **Gorban et Izzeldin (1997)** ont constaté que le pH varie en fonction de l'alimentation et de la disponibilité de l'eau. D'autre part, **Yagil (1985)**, estime que le pH du lait camelin peut être attribuable à la richesse de ce lait en acides organiques divers.

L'acidité totale du lait cru est exprimée en degré Dornic (D°), la moyenne est 18,7 D°, avec une variation de 15 – 24 D°, cette acidité est semblable à l'acidité de lait de vache qui est de l'ordre de 17,12 D°. L'acidité titrable, qui témoigne de l'état de fraîcheur du lait et de sa richesse relative en caséines, phosphates, citrate, hydrogénocarbonate et lactates, varie en sens inverse avec le pH.

Notons que l'acidité a peu d'influence sur le pH, dont l'abaissement conséquent est relativement lent. Cette constatation expérimentale, signalée par de nombreux auteurs, est due à l'effet du pouvoir tampon du lait camelin, relativement ; plus important par rapport aux laits d'autres espèces.

On parle aussi de l'acidité développée du lait qui est due à la transformation du lactose en acide lactique par les bactéries (acidité titrable = acidité apparente + acidité développée).

Après avoir mesuré la densité des échantillons du lait camelin examiné, on a déterminé une moyenne de l'ordre de 1028,06. Elle est comparable aux valeurs, 1025-1038 rapportées par la **FAO (1995)** d'après une compilation de diverses sources. **Farah (1993)** a cité une fourchette de 1025-1032 avec une moyenne de 1029, **Daget & Lhost (1995)** avec 1026, **Kamoun (1995)** avec $1028,0 \pm 0.002$ et **Larsson-Raznikiewicz & Mohamed (1994)** avec 1.026 à 15°C.

La densité dépend directement de la teneur en matière sèche, liée fortement à la fréquence d'abreuvement. Ce qui explique la variabilité des valeurs entre les différents échantillons de lait analysés et entre celles citées dans la littérature.

La teneur en matière grasse des échantillons du lait de chamelle varie de 19 à 50 g/l, avec une moyenne générale de 40,4 g/l. Elle semble légèrement plus élevée que celle du lait bovin qui est de l'ordre de $32,5 \text{ g/l} \pm 9,118$ et plus faible que celle des humains (45 g/l). Elle se situe entre des valeurs extrêmes, relevées pour la race Somali (56 g/l) selon **(Karue., 1994)** et pour la race Wadah (24.6 g/l) selon **(Mehaia & al., 1995)**.

Il s'est avéré qu'en dehors de la race, le rang de la traite influe sur le taux de la matière grasse. En effet, la traite du matin donne un lait relativement pauvre en matière grasse par rapport à celui des autres traites, bien qu'il soit quantitativement plus important **(Kamoun., 1994)**. La répartition des valeurs montre qu'il existe quelques échantillons avec des concentrations élevées.

La teneur en matière sèche totale des échantillons analysés est égale à 118,6 g/l avec un maximum de 146 g/l et un minimum de 77,3 g/l. Cette moyenne est un peu inférieure à celle du lait bovin qui est de l'ordre de 128 g/l, et humain 129 g/l. Elle se situe dans la fourchette des travaux menés à travers le monde, à savoir 121 à 150g/l **(Bayoumi, 1990)**. Elle semble par ailleurs, du même ordre de grandeur que celles rapportées pour la race Hamra ($116 \text{ g/l} \pm 11$) selon **Mehaia & al., (1995)** et pour les races Majaheim et Somali (121.5 g/l) selon **Abu-lehia, (1994)** et plus élevée que celles rapportées par **Gnan et al., (1994)** (95.6 g/l) et par **Bengoumi et al., (1994)** ($69.5 \text{ g/l} \pm 2.7$).

L'une des principales caractéristiques du lait camelin est en effet, sa teneur en matière sèche réduite par rapport à celle des laits d'autres espèces **(Ramet., 1994)**. En été, la teneur en eau du lait augmente et donc sa matière sèche diminue davantage sous l'effet du stress hydrique. En outre, il a été montré que le passage d'un régime hydraté à un régime pauvre en eau entraîne une chute de la teneur en matière sèche totale de 14.3 à 8.8 % et qu'en cas de privation ou d'abreuvement insuffisant, la teneur en eau du lait

camelin augmente et passe de 87 à 91 %. Ceci constitue selon **Yagil et Etzion (1980)**, une réponse physiologique au stress hydrique permettant d'assurer la survie du chamelon. La teneur en matière sèche du lait varie également en fonction du stade de lactation (**Bengoumi et al., 1994**). Ainsi, elle diminue durant le mois suivant le vêlage, puis augmente suite à l'accroissement des taux de matière grasse et azotée (**FAO., 1995**).

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessus indiquent une teneur moyenne en protéines totales égales à 29,6 g/l. Celle-ci est inférieure de celle du lait bovin (32 g/l) et est environ, deux fois plus élevée par rapport à celle du lait humain (12 g/l). Le taux que nous avons relevé lors de la présente étude se situe dans la fourchette des travaux cités par **Mohamed et al (1989)** et **Gnan et al, (1994)** à savoir 46g/l et 21.5 g/l respectivement. Il est inférieur à la valeur trouvée par **Kamoun (1994)** soit 34.3 g/l \pm 4.4. Cependant, il est semblable à celles rapportées par **Mehaia et al,(1995)** pour les races Majaheim et Hamra [29.1 g/l et 25.2 g/l].

Concernant la variation de la teneur protéique, **Yagil et Etzion, (1980)** signalent qu'elle est maximale juste après le part et arrive à atteindre 11.6 %, puis elle diminue et atteint des valeurs comprises entre 4.6 et 5.7 % en régime hydraté ou entre 2.5 et 3.3 % en régime peu hydraté. Quant à sa composition, elle varie en fonction des stades de lactation. Selon **Kamoun, (1994)**, les deux premiers mois de lactation se caractérisent par une diminution des taux, protéinique et butyreux du lait camelin. Ces derniers atteignent une valeur minimale coïncidant avec le pic de lactation, puis retrouvent, en fin de lactation, un niveau comparable à celui de départ.

Il est important de rappeler que la matière azotée du lait camelin en l'occurrence, existe sous forme d'azote protéique majoritaire (90 % de l'azote total) et d'azote non protéique (10% en moyenne de l'azote total). Le lait camelin renferme cependant plus d'acides aminés libres et d'autres composés azotés non protéiques (NPN) que le lait bovin. (**Abu-Taraboush & al., 1998**)

IV.1.1.2. Analyses microbiologiques

Le tableau ci-dessous récapitule les différents résultats des analyses microbiologiques.

Tableau 21 : Valeurs moyennes des attributs microbiologiques du lait de chamelle

Paramètres microbiologiques	FAMT (ufc/ml)	Coliformes totaux/ml	Coliformes thermotolérants/ml	Streptocoques fécaux/ml	Levure & Moisissures UF/ml
Moyenne (n=40)	$3,36 \times 10^5$	$8,65 \times 10^4$	$5,81 \times 10^3$	44	$1,34 \times 10^3$

FAMT : Flore aérobie mésophile totale

D'après les résultats obtenus, les échantillons présentaient une charge importante en FAMT avec des variations légères entre les échantillons. Ces résultats se rapprochent de celles rapportées par certains auteurs à savoir **Semereab et Molla., (2001)** (4×10^5 UFC/ml) ; **Sela et al., (2003)** ($8.0 \times 10^4 - 5.3 \times 10^5$ UFC/ml) ; **Younan, (2004)** ($10^3 - 10^5$ UFC/ml). D'ailleurs, la moyenne de dénombrement des FAMT ($3,36 \times 10^5$ UFC/ml) est plus ou moins acceptable par rapport à la norme algérienne appliquée sur le lait de vache (**NA 35/1998**). Ceci est expliqué par les résultats de pH et de l'acidité Dornic qui ont été corrélés avec le taux des FAMT. Ceci pouvait provenir de l'absence des mesures d'hygiène rigoureuses lors de la traite, la non-disponibilité de l'eau dans les zones d'élevage, et peut être la distance des sites d'échantillonnage.

D'après les données du dénombrement des coliformes totaux, il apparaît que la moyenne de ce comptage est inférieure à celles cités dans d'autres travaux à savoir : **Tourette, (2002)** (3.55×10^4 CT/ml) ; **Benkerroum, et al., (2003)**, (1.6×10^4 CT/ml) ; **Siboukeur, (2008)** (10^5 à 10^6 CT/ml). Néanmoins, ces germes sont absents dans les échantillons E1, E2, E3, E4, E5, E8, E9, ce résultat peut suggérer que cette flore est absente ou probablement inhibée par d'autres facteurs présents dans le lait tels que les protéines et peptides à activités antimicrobiennes qui sont produits par la flore lactique. En effet, la présence de ces facteurs dans le lait camelin et leur rôle a été signalée par plusieurs auteurs à savoir **Desmazeaud & Roissard, (1994)**, et **Kamoun, (1994)**. Même si leur nombre varie entre un échantillon et un autre du fait de la différence dans la période, l'origine et les conditions de prélèvement du lait, cela témoigne d'un niveau de contamination fécale. Cette contamination peut être la conséquence d'une multiplication rapide et massive de la flore fécale initialement présente dans le lait cru qui peut être transmis par les mains du trayeur, par l'animal lors de la traite, par la queue et les éclaboussures (**Hamama, 1989 ; Faye et Loiseau, 2002**).

Les données relatives au dénombrement des streptocoques dans le lait camelin collectés révèlent que ces laits présentent une moyenne inférieure à celle rapportée par la norme algérienne concernant le lait de vache (**NA 35/98**). En outre l'absence totale des streptocoques dans quelques échantillons peut être expliquée par l'absence d'une contamination d'origine fécale. En plus, le rapport **coliformes thèrmotolérants /Streptocoques fécaux** est en général supérieur à 1, ceci indique qu'il y a une contamination d'origine humaine (**Cuq, 2007**).

D'après les résultats obtenus sur la recherche des ASR dans les échantillons du lait camelin, on a trouvé qu'ils sont exemptés des ASR. L'absence totale des ASR, explique

l'absence d'une contamination tellurique (**Cuq, 2007**). Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet antimicrobien du lait camelin. En effet les chamelles de la région ne sont pas alimentées avec l'ensilage ou d'autres concentrés industriels connus qui peuvent être la source principale de contamination de lait avec les spores bactériennes (**Benkerroum et al., 2003**).

La recherche des Salmonelles et Shigelles révèle l'absence totale de ces germes dans les échantillons du lait analysés.

Les raisons les plus fréquentes de leur absence dans le lait sont expliquées par l'absence des origines de contamination, le lait de chamelle analysé ne provient pas d'animaux malades ou porteurs, le lait n'est pas contaminé par des individus porteurs ou malades au moment de la traite.

En outre, les troupeaux de chameaux bénéficient rarement de soins vétérinaires avec le manque d'une désinfection appropriée entre les intervalles de la traite, ce qui pourrait améliorer la colonisation microbienne.

Les champignons ont été détectés dans les échantillons analysés avec une moyenne de $1,34 \times 10^3$ UFC/ml. En effet, les données acquises au dénombrement des levures et moisissures dans les échantillons de lait camelin montrent que ce résultat ne s'accorde pas avec les travaux de **Benkerroum et al., (2003)** (7.94×10^4 UFC/ml), ceci peut être interpréter par le fait que le pH normal du lait de chamelle faisant prédominer des bactéries de celle des levures et moisissures (**El-Ziney & Al-Turki, 2007**).

IV.2. Isolement et identification des entérocoques

IV.2.1. Isolement et identification des souches étudiées

IV.2.1.1. Résultats d'identification morphologique

L'étude des caractères morphologiques des souches isolées nous a permis de sélectionner 123 isolats appartenant aux entérocoques. Après incubation de ces isolats ensemencés dans le bouillon BHI, à 37°C pendant 24h nous avons obtenu un trouble homogène. L'observation macroscopique des cultures en milieu solide BHIA montre la présence de grandes colonies rondes d'un diamètre d'environ 2 à 5mm, lisse de couleur blanche crémeuse, et d'un contour régulier. Sur le milieu CATC les colonies sont sous forme ronde de contour régulier, ayant une couleur rouge ou rose, avec un diamètre de 1mm. L'état frais montre que tous les isolats sont sous forme sphérique et sont immobiles. Ils sont des cocci Gram positifs, isolées, en diplocoque, ou sont parfois associées en courtes chaînettes.

IV.2.1.2. Résultats de l'identification physiologique des isolats

Pour l'identification des entérocoques, il est primordial de les différencier des autres cocci Gram positifs, catalase négative. Les caractères physiologiques et biochimiques des souches soumises à l'identification figurent dans l'**annexe E**.

Cent-vingt-trois souches ont été isolées sur milieu BHIA. Les colonies obtenues sur milieu CATC au chlorure de triphényltétrazolium (T.T.C.), étaient régulières, rondes, lisses, à centre rouge foncé ou rose entouré d'une auréole blanche. Elles présentaient presque toutes les caractères phénotypiques indiqués dans le tableau ci-dessous qui sont couramment utilisés pour distinguer les entérocoques des autres cocci Gram positifs, ils sont facultativement anaérobies, ont la capacité de croître en présence de 65 g de NaCl / l, à pH 9,6 et à 10 et 45 ° C. alors que la croissance à 10 ° C n'a pas été observée dans 23 des 123 isolats. Tous ces caractères montrent que toutes les souches isolées étaient bien des entérocoques.

IV.2.1.3. Résultats de l'identification biochimique des isolats

Les méthodes traditionnelles pour identifier les espèces d'*Enterococcus* avec les essais biochimiques conventionnels dans les tubes à essai sont laborieuses et demande plus de temps, tandis que l'utilisation des systèmes commerciaux d'identification peut sauver le temps et l'effort. Le système API 20 Strep (bioMérieux) a été utilisé depuis longtemps pour identifier les entérocoques au niveau de l'espèce. L'API 20 Strep est un système d'identification standardisé avec 20 tests biochimiques conçus pour l'identification

des espèces de *Streptococcus* et d'*Enterococcus*. Il peut être utilisé pour identifier seulement *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, et *E. gallinarum*.

Le résultat de l'identification par l'API 20 STREP de nos isolats est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 22 : Représentation globale du résultat de l'API 20 STREP

Espèce	Fréquence	Pourcentage / (n=123 isolats)
<i>E. faecium</i>	78	63,4%
<i>E. gallinarum</i>	18	14,6%
<i>E. faecalis</i>	14	11,4%
<i>E. avium</i>	07	5,7%
<i>A. viridans 1</i>	03	2,4%
<i>S. uberis</i>	02	1,6%
<i>L. lactis ssp lactis</i>	01	0,8%
Total	123	100%

Ce tableau ci-dessus représente la distribution des isolats identifiés en fonction des espèces. La plupart des isolats ont été attribués aux espèces *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, et *E. avium* avec des pourcentages de 63,4%, 14,6%, 11,4%, 5,7% respectivement, ainsi on a signalé la présence de six isolats qui n'appartiennent pas au genre *Enterococcus*. D'après cette identification on constate qu'il y a une dominance de l'espèce *E. faecium* dans les échantillons du lait de chamelle. En revanche il semble que le système API 20 Strep ne soit pas approprié pour être appliqué avec succès avec d'autres espèces d'entérocoques (*E. mundtii*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* ou *E. malodoratus*...) puisque les galeries API Strep ne contiennent pas les tests nécessaires pour différencier la plupart de ces entérocoques. Des tests supplémentaires sont nécessaires, mais ceux-ci ne sont souvent pas inclus dans les galeries.

IV.2.1.4. Identification par le SDS-PAGE

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) des polypeptides cellulaires totaux solubilisés par un traitement avec du dodécylsulfate de sodium (SDS), a été utilisée pour l'identification et le typage des bactéries. Cette technique permet l'étude comparative d'un grand nombre de protéines codées par une partie importante du génome et, par conséquent, a un potentiel très élevé pour mesurer les relations entre les isolats. Les protéines sont séparées en fonction de leurs poids moléculaires, car le SDS, un agent dénaturant solubilise les protéines en les rendant linéaires et leur donnant une charge négative. Par cette méthode il apparaît ainsi de détecter des relations taxonomiques plus large, en particulier au niveau des espèces et sous-espèces, que les

méthodes basées sur des paramètres de charge. Nous avons essayé d'appliquer cette technique pour l'identification de 23 isolats pour voir si elle convient pour ce type d'espèce.

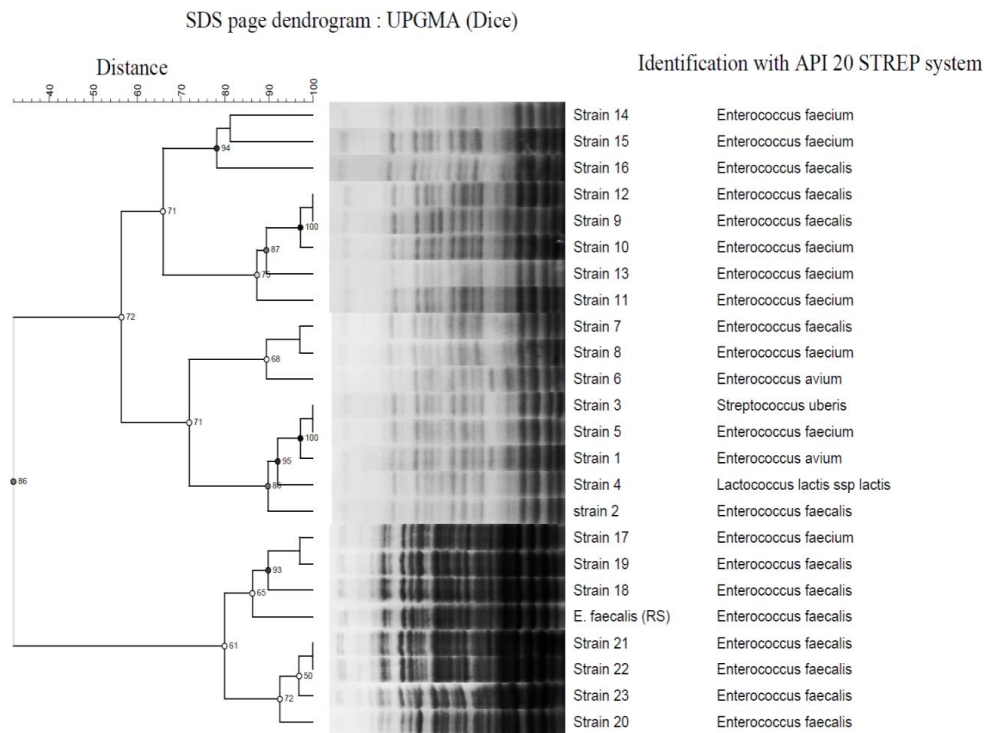


Figure 7 : Profils électrophorétiques des extraits cellulaires des protéines totales des isolats d'*Enterococcus*; le coefficient moyen de corrélation (r) est représenté sous forme d'un dendrogramme, et est calculé par l'algorithme de regroupement des moyennes des paires non pondérées (UPGMA) des isolats par rapport à la souche de référence. (RS indique la souche de référence).

La limitation du nombre des isolats identifiés par cette méthode (23 isolats) dans ce cas est due au fait qu'elle nécessite un très grand nombre de souches de références (dans le cas du genre *Enterococcus*, on a besoin de toutes les souches de référence pour arriver à identifier précisément tous nos isolats).

IV.2.1.5. Identification moléculaire

IV.2.1.5.1. Extraction de l'ADN selon Pitcher et al., (1989).

Après l'extraction de l'ADN de nos isolats et après leur visualisation sur gel d'agarose à 0.8% nous avons obtenu les résultats montrés dans la **figure 8**.

D'après le gel il apparait clairement que tous les isolats possèdent la même taille de l'ADN génomique, ce qui est justifié par l'alignement des bandes dans la même position sur

le gel. La différence entre ces bandes réside dans leurs intensités (épaisseur), ce qui signifie une différence de rendement d'extraction pour chaque isolat.

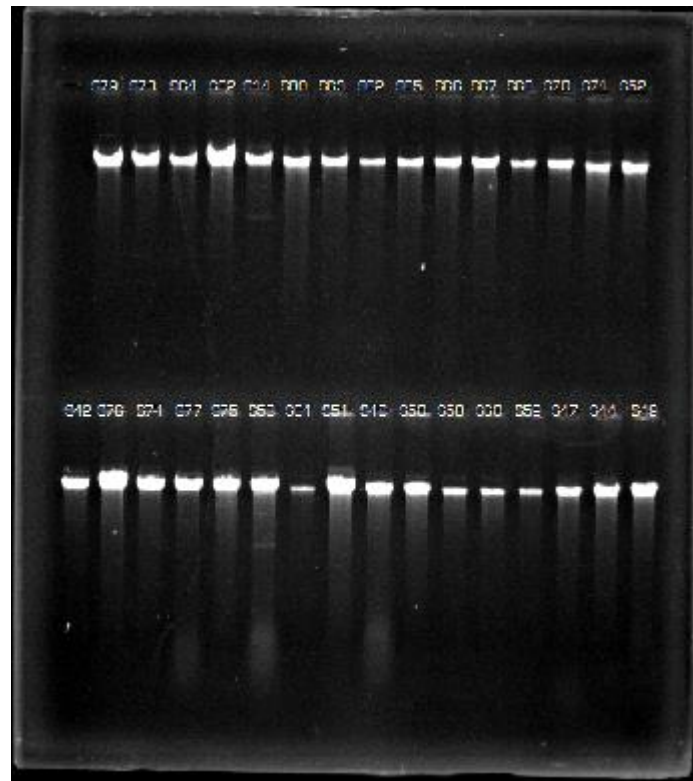


Figure 8 : Un exemple de visualisation de l'ADN génomique des isolats d'entérocoques sur gel d'agarose à 0.8% (Photos visualisées par le Transilluminateur-UV BioPrint TX4)

Cette méthode d'extraction d'ADN à montrer une fiabilité importante, car elle nous a donné des rendements élevés avec une bonne pureté de l'ADN génomique des isolats, ainsi elle est rapide et ne nécessite pas beaucoup d'étapes, ni utilisation des solvants chimiques dangereux (phénol...).

IV.2.1.5.2. Identification des souches par la technique ERIC-PCR

La réaction d'amplification en chaîne par polymérase des séquences intergéniques répétitives entérobactériennes (ERIC-PCR) est souvent utilisée pour analyser la diversité des bactéries entériques (**Wilson & Sharp 2006**). La position et le nombre des séquences ERIC dans les bactéries varient de sorte qu'ils peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques pour étudier la diversité des isolats bactériens. Après visualisation des produits générés par la méthode ERIC-PCR (**Figure 9**) on a constaté l'existence de différences notables dans le nombre et la taille de ces produits. **Meacham (2003)** a signalé que la différence dans le nombre et la taille des profils ERIC-PCR décrivent la diversité génétique parmi les isolats bactériens.

Nos isolats ont donné des profils électrophorétiques contenant entre 2 à 8 amplicons avec des masses moléculaires allant de 100 à 2500 pb (**figure 9**). Ces résultats sont ensuite traités et analysés par le logiciel BioNumerics v 7.6 (**Applied Maths. Belgium, 2016**). Sur la base des profils ERIC-PCR, un arbre phylogénétique qui décrit la diversité génétique des isolats a été construit par ce logiciel en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) et en se basant dans le calcul sur l'utilisation du coefficient de similarité « **Dice** » (**figure 10**).

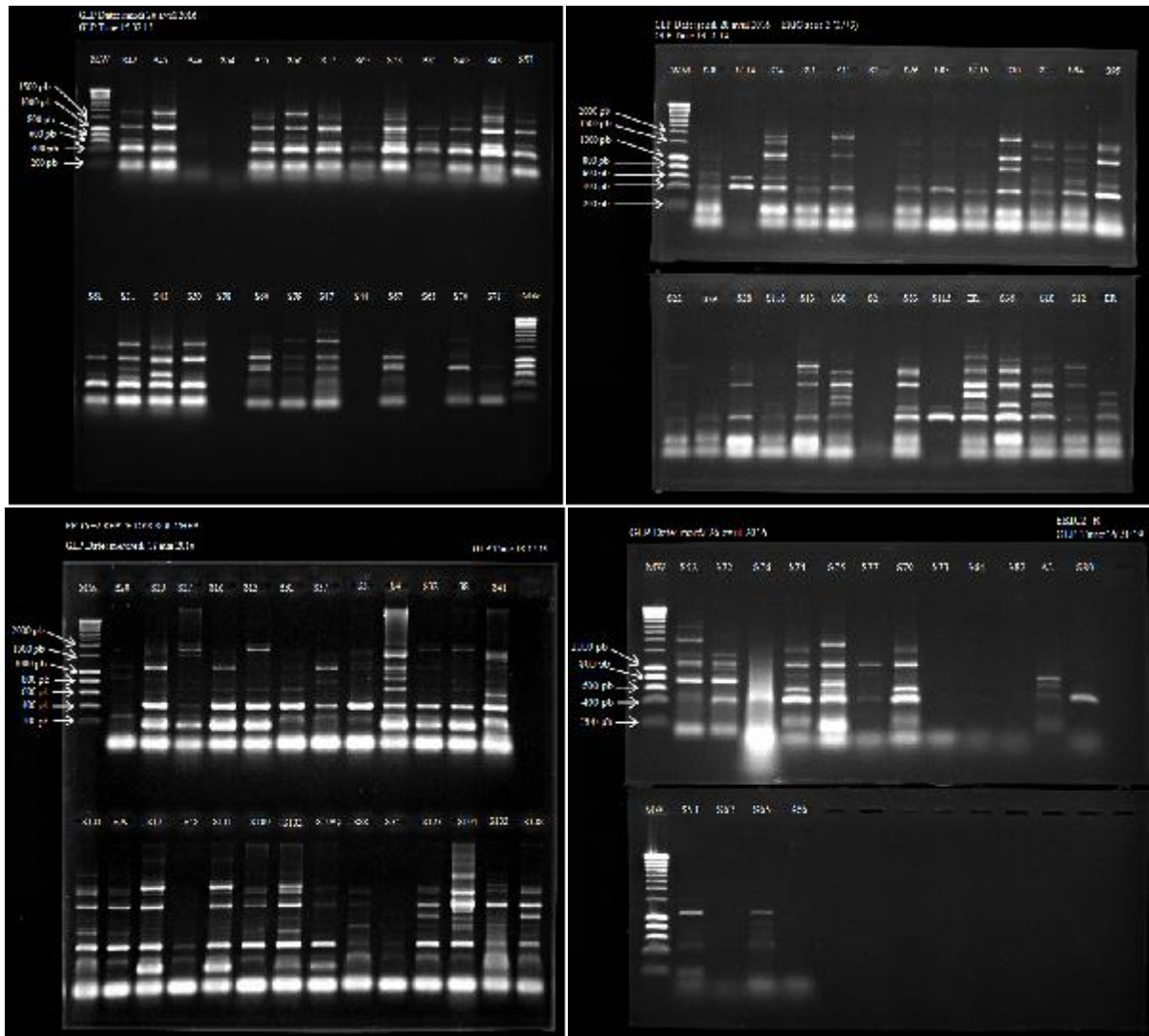


Figure 9 : Amplicons des isolats générés par la méthode ERIC- PCR et visualisés sur gel d'agarose (Photos visualisées par le Transilluminateur-UV BioPrint TX4)

En plus du dendrogramme montré dans la figure ci-dessous on a combiné les résultats d'identification par la galerie API20 STREP, pour faire une comparaison entre les deux méthodes d'identification.

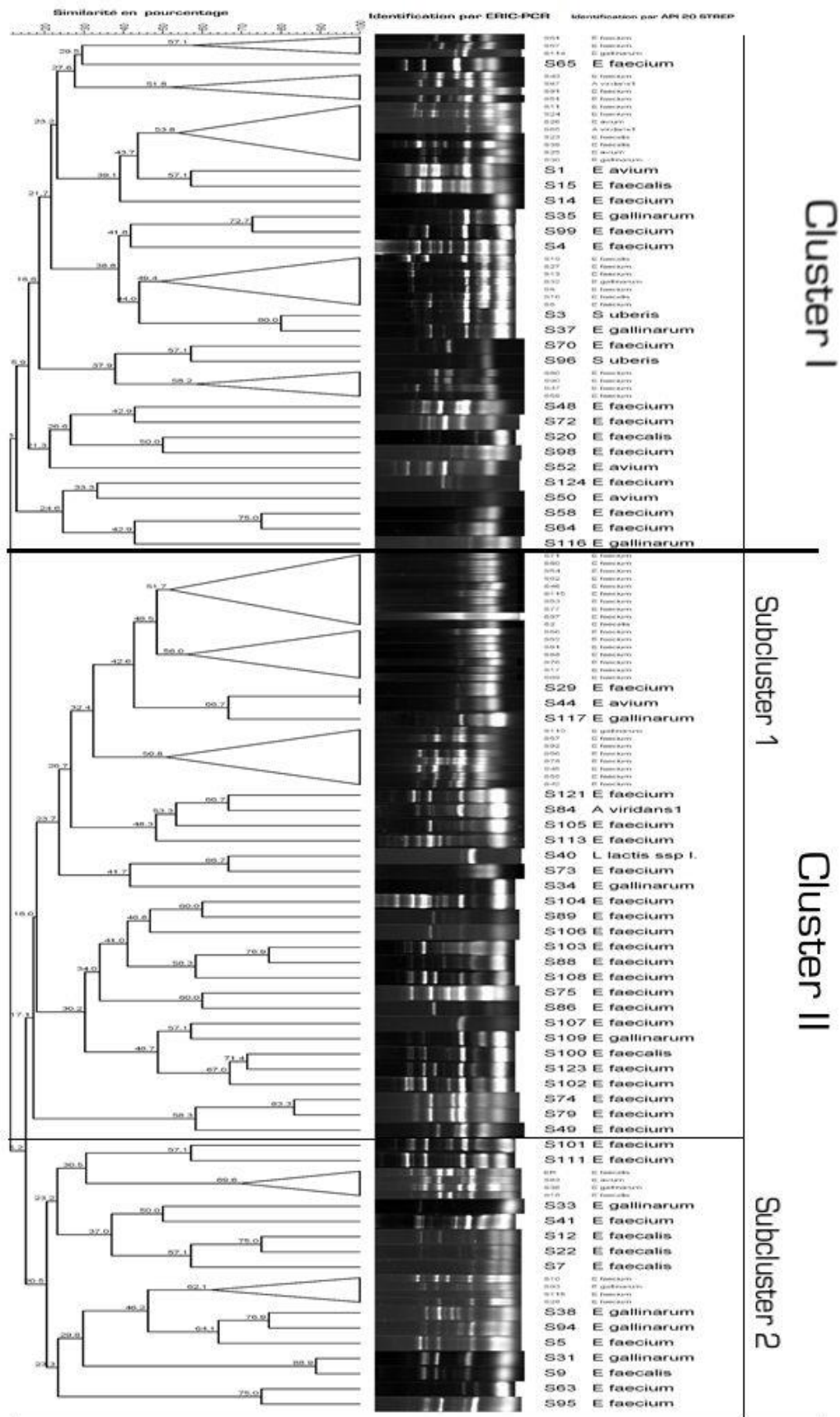


Figure 10 : Dendrogramme d'identification des isolats des entérocoques par la méthode ERIC-PCR (calculé par la méthode UPGMA en utilisant le coefficient de similarité « Dice »)

Les profils ERIC-PCR ont été analysés en utilisant la méthode UPGMA. Comme il est montré dans la **figure 10**, le dendrogramme ERIC-PCR est divisé en 2 clusters majeurs, Cluster I et II.

Le cluster I regroupe 47 isolats, et il est divisé en plusieurs sous-groupes, ainsi il est caractérisé par une grande diversité génétique, dans ce cluster 55,32% des isolats ont été identifiés par l'API 20 STREP comme étant des *E. faecium*, le reste est réparti entre *E. faecalis* 12,76%, *E. gallinarum* 12,76%, *E. avium* 10,64%, *A. viridans* et *S. uberis* 04,25% pour chacune.

Le cluster II est subdivisé en deux sous-groupes (subcluster), dans le premier sous-groupe on a recensé 52 isolats avec une dominance d'*E. faecium* 82,7%, suivi par *E. gallinarum* 07,69%, *E. faecalis* 03,85%, et le reste est distribué à titre égal (05,76%) entre *E. avium*, *A. viridans*, et *L. lactis subsp lactis*, le deuxième sous-groupe constitué de 22 isolats parmi eux se trouve la souche de référence *E. faecalis* ATCC 29212, pareillement, dans ce sous-groupe il y a une dominance d'*E. faecium* 40,9%, suivi par *E. faecalis* et *E. gallinarum* avec 27,27% pour chacune, et *E. avium* 04,54%.

D'après cette constatation et le fait qu'il n'y a pas assez de souches de référence pour bien juger l'identification de nos isolats, il est présumé que cette méthode (ERIC-PCR) nous a permis de regrouper la plupart des isolats en deux espèces bien distinctes *E. faecium* qui est représenté par le sous-groupe 1 du cluster II, et *E. faecalis* représenté par le sous-groupe 2 du même cluster, avec une troisième possibilité *Enterococcus spp* regroupée dans le cluster I et qui nécessite plus d'analyse pour affilier correctement les différents isolats.

IV.3. Caractérisation technologique des entérocoques

IV.3.1. Etude des aptitudes technologiques

IV.3.1.1 Pouvoir acidifiant, et cinétique de croissance

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries des levains est leur aptitude à l'acidification qui dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acidité développée. Afin de n'étudier et de ne conserver que les souches présentant une aptitude acidifiante suffisante, l'ensemble des isolats ont été éprouvé par une mesure du pH, et de l'acidité titrable des cultures sur lait écrémé stérilisé par tyndallisation, après des intervalles de temps d'incubation à 37° C allant jusqu'à 72 h.

Au cours de l'étude de ces paramètres, nous avons mis en évidence des différences notables dans l'aptitude à l'acidification des souches d'entérocoques identifiées. Ces différences sont illustrées par les histogrammes de fréquence des figures **11** et **12** qui correspondent respectivement à l'ensemble de la collection (fig.), et à chacune des espèces (fig.). On observe ainsi sur les cultures de 72 h à 37°C des valeurs de pH qui oscillent entre 5,48 et 6,73 pour l'ensemble des souches, avec une moyenne générale de 5,94 et un écart type de 0,288. Il est à noter que le pH initial du lait écrémé était de 7,45 en moyenne. Comme on remarque que plus de la moitié (>50%) des souches ont abaissé le pH au bout de ces 72 heures au-dessous de la moyenne [5,94] (voir figure ci-dessous).

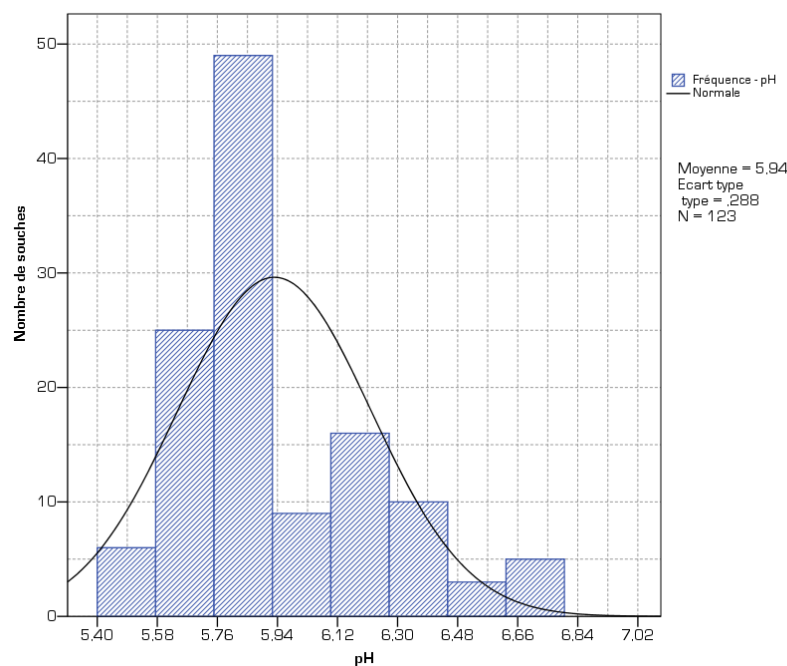


Figure 11 : Distribution des isolats d'entérocoques en fonction de leur pH mesuré après 72 h d'incubation dans le lait écrémé stérile.

Et pour chacune des espèces une moyenne a été enregistrée, pour *E. faecium* 5,85, pour *E. avium* 5,93, *E. gallinarum* 5,97, et pour *E. faecalis* 6,45 (**figure 12**). Un très petit nombre des espèces entérocoques est capable d'acidifier le lait écrémé stérile à un pH inférieur à 5,5.

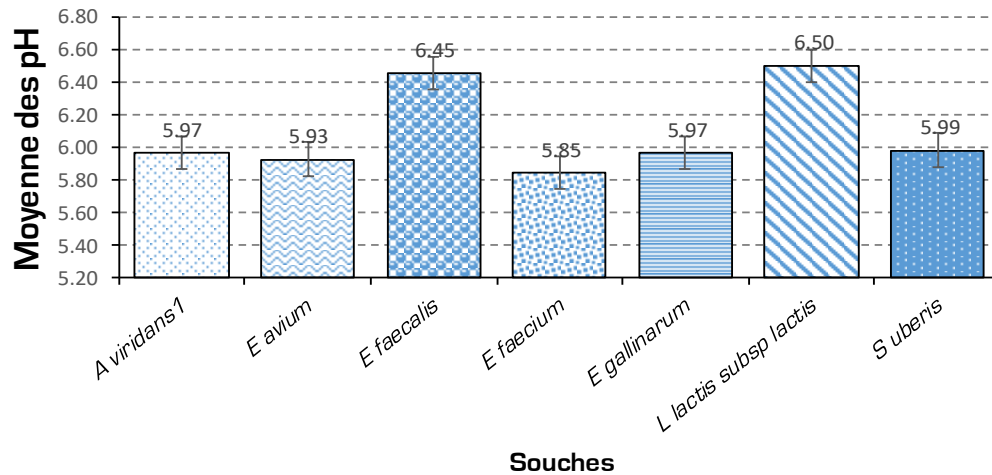
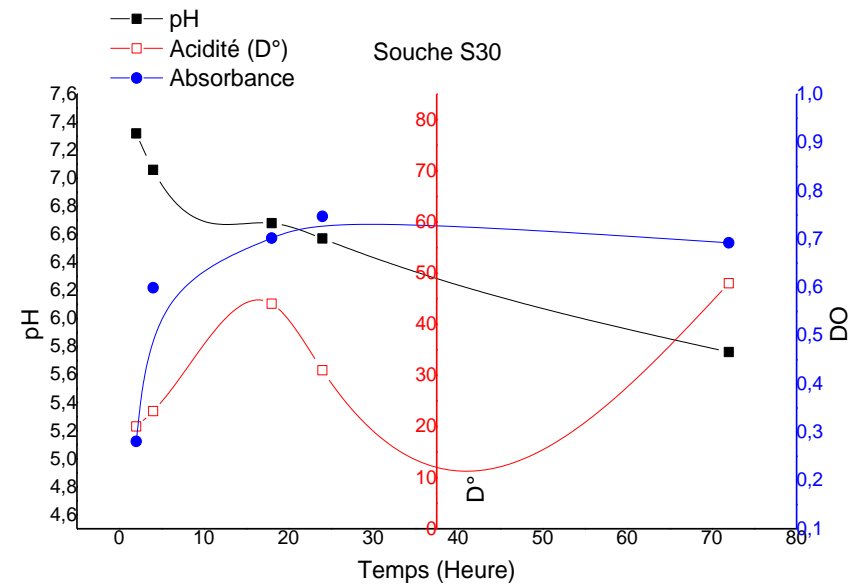
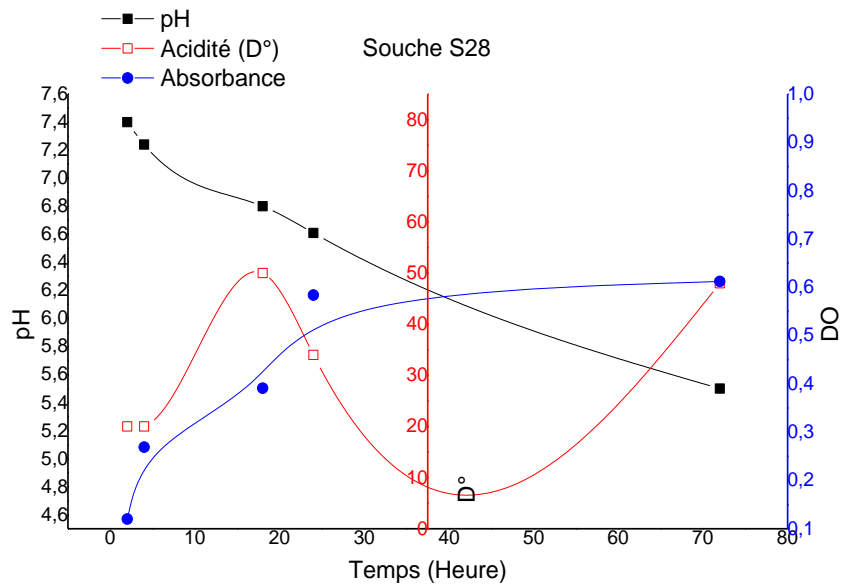
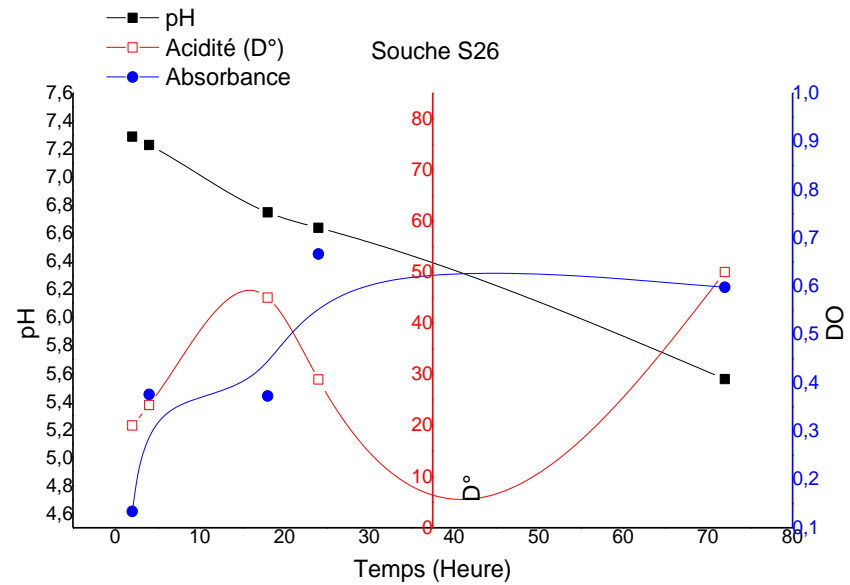
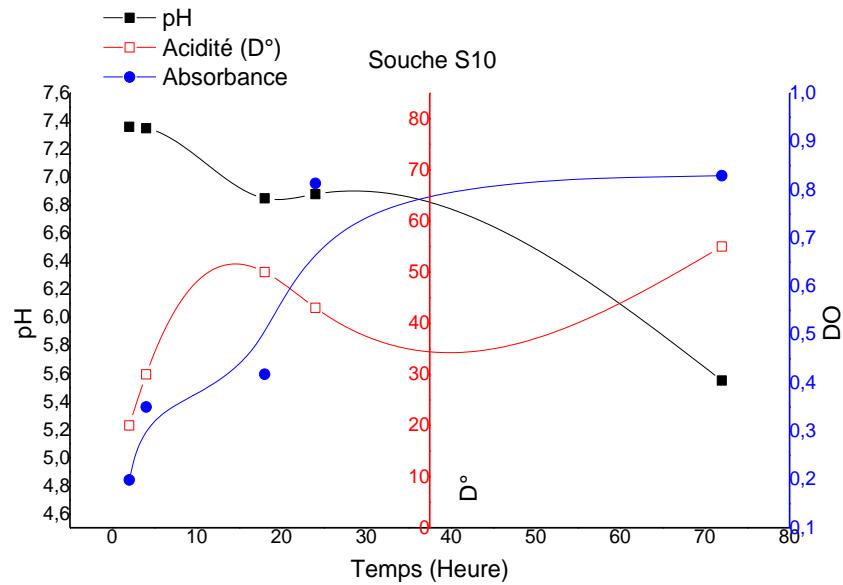


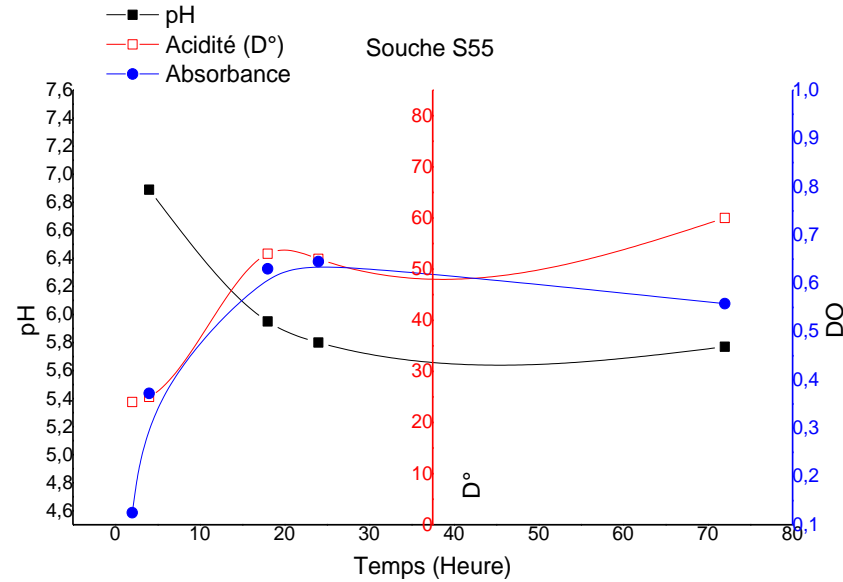
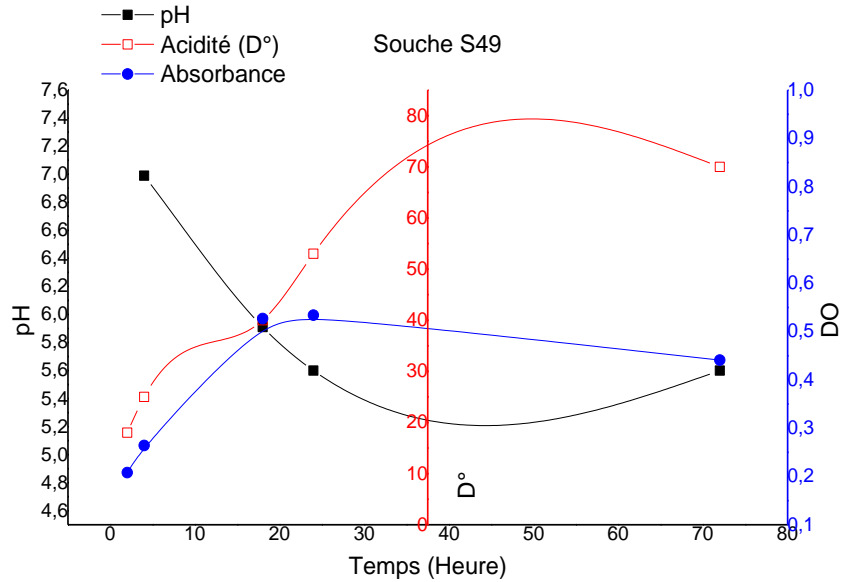
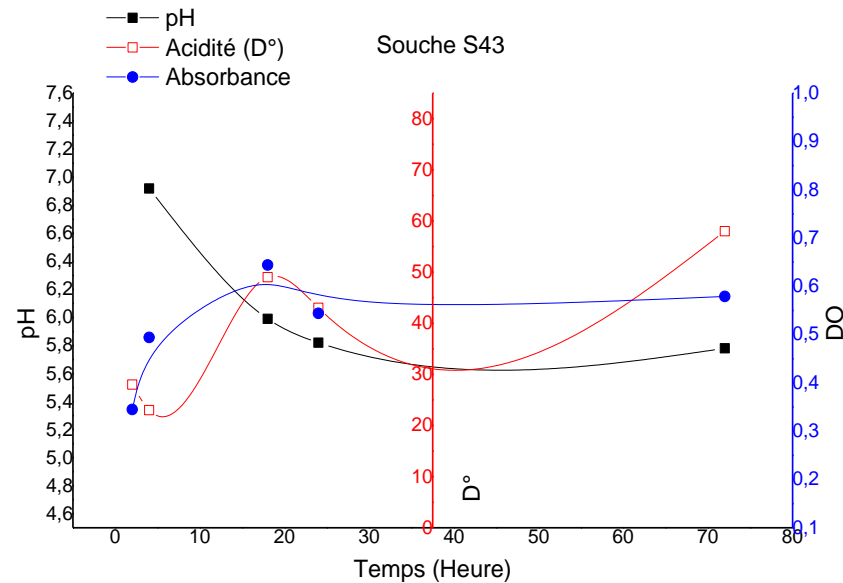
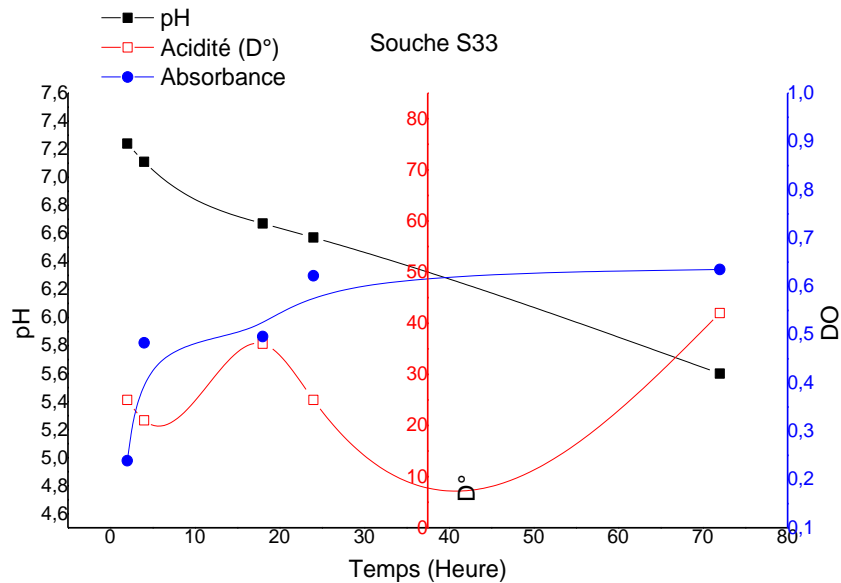
Figure 12 : Comparaison des moyennes de pH mesurés après 72h entre les différentes souches identifiées.

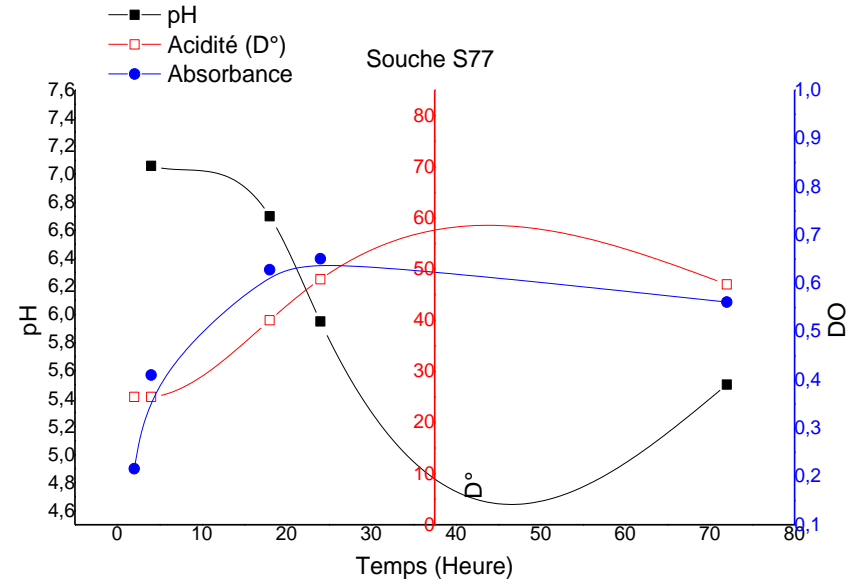
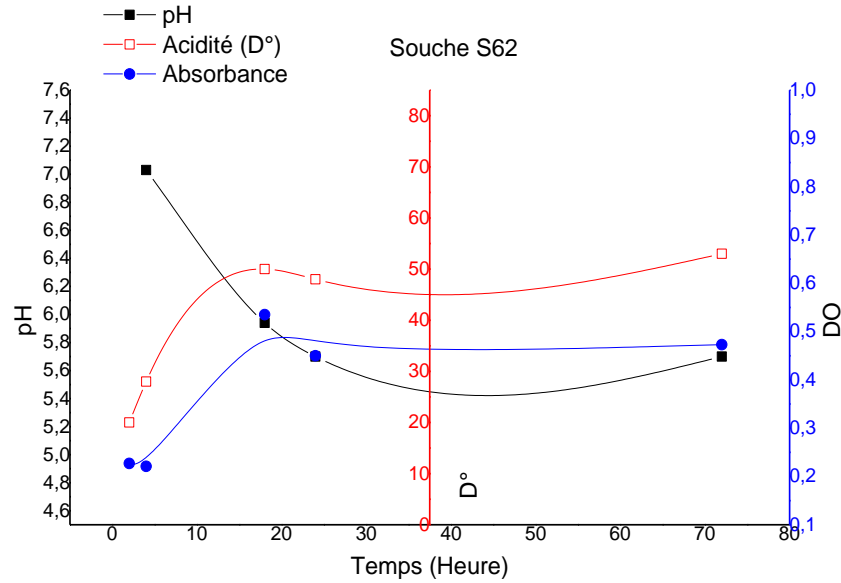
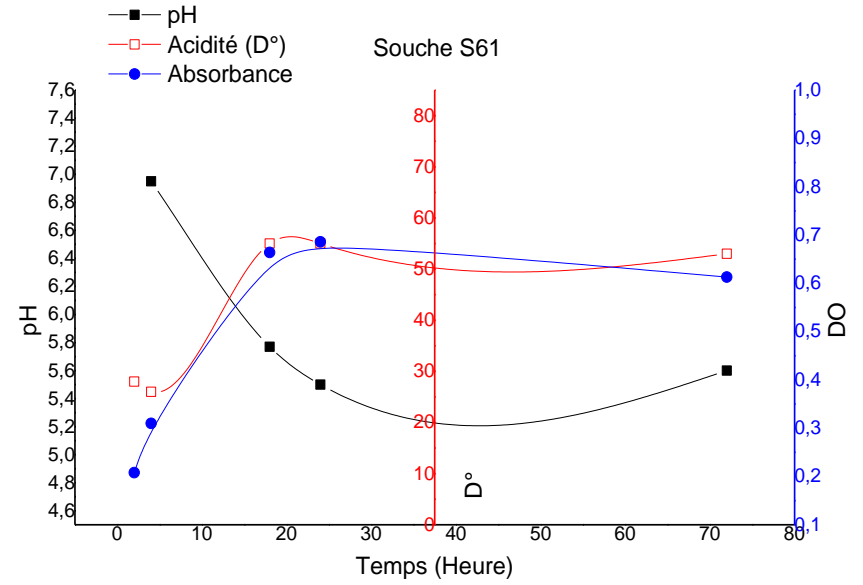
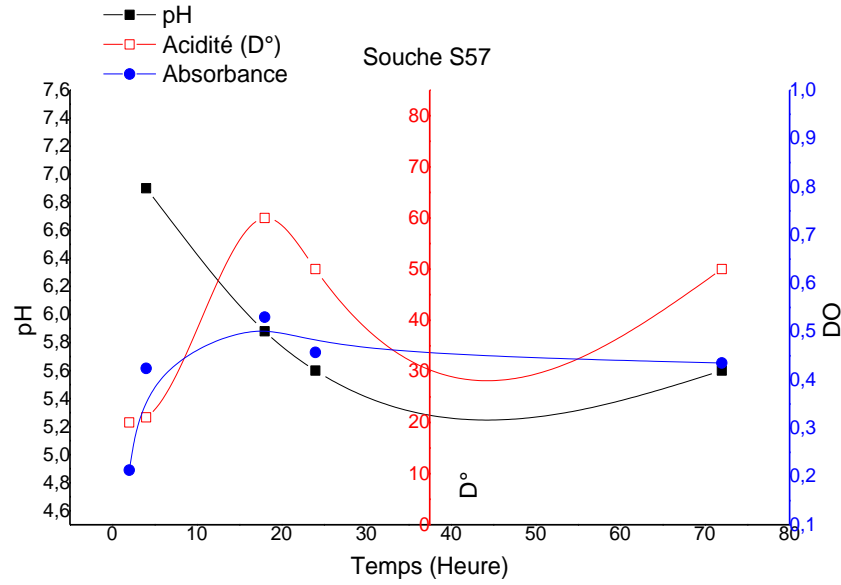
Il semble que la plupart des espèces identifiées dans cette étude n'arriveront pas à abaisser le pH au-dessous de 5,5, et ceci après 72 heures d'incubation. Ce qui laisse suggérer que la plupart des souches ont une faible habileté à acidifier le lait écrémé stérile. L'épreuve de sélection a finalement permis de retenir 18 souches d'entérocoques qui répondent aux conditions fixées, à savoir : aptitude à acidifier le lait à pH inférieur ou égal à 5,8 (**Tableau 25**).

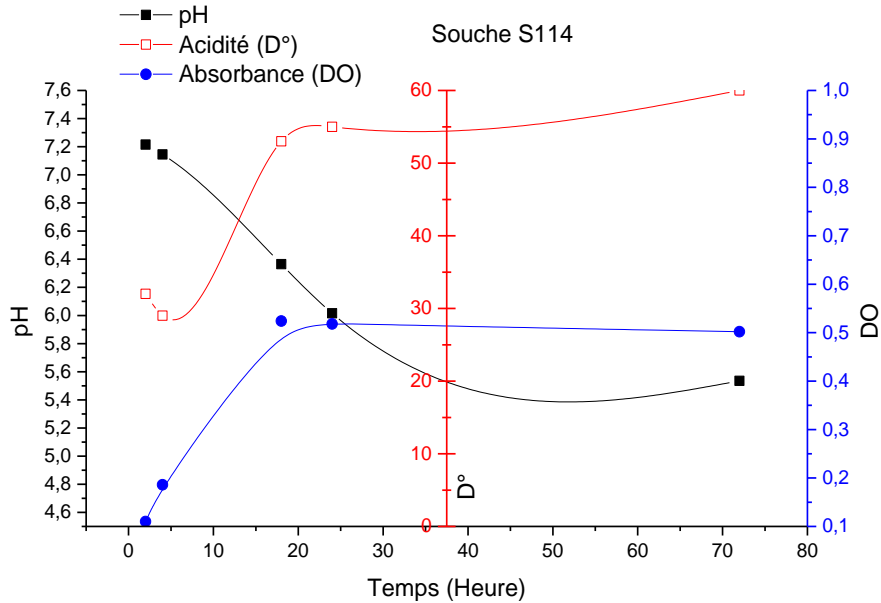
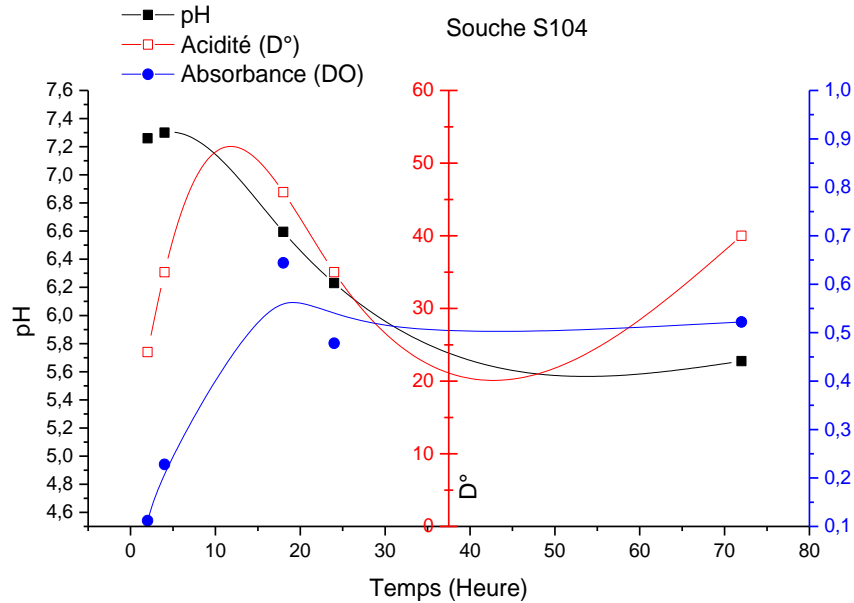
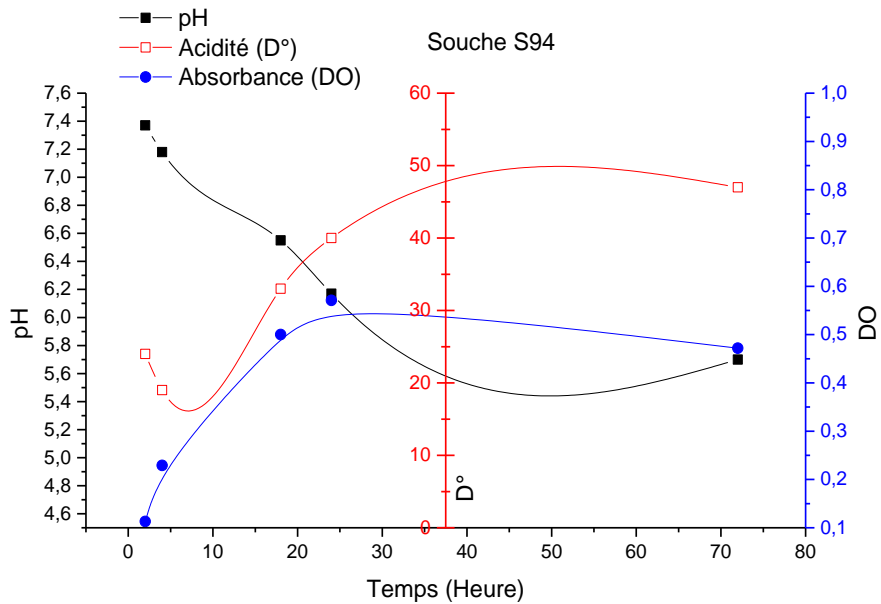
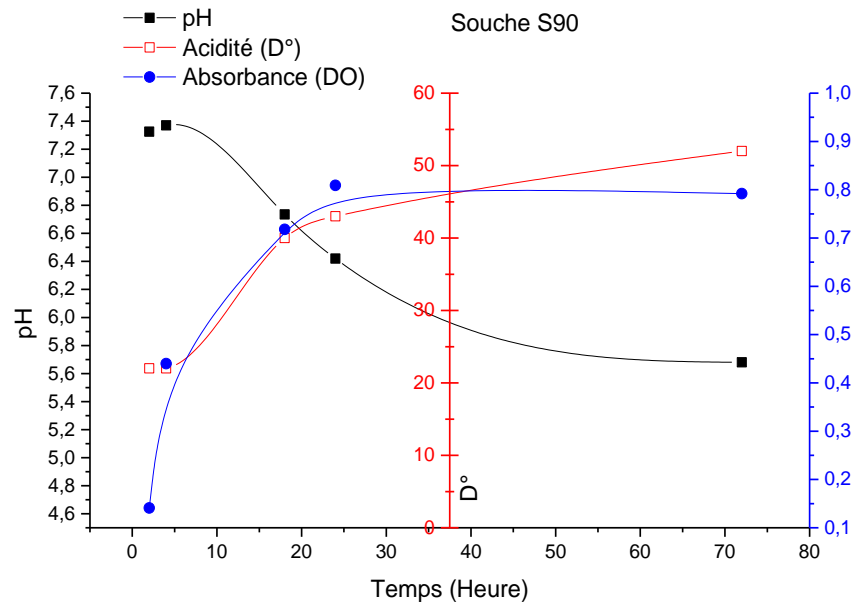
Tableau 23 : Les souches sélectionnées pour effectuer la recherche des aptitudes technologiques. (Le pH initial du lait écrémé est de 7,45).

Codes souches	ID souches API 20 STREP	ID souches par ERIC-PCR	72h d'incubation à 37°C	
			pH	Acidité °D
S10	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	5,55	55
S26	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	5,56	48
S28	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	5,50	35
S30	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	5,76	33
S33	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	5,60	38
S43	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	5,78	58
S49	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,60	70
S55	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,77	60
S57	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,60	50
S61	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	5,60	53
S62	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,70	53
S77	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,50	47
S90	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	5,68	52
S94	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	5,70	47
S104	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,68	40
S114	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	5,54	60
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	5,48	75
S117	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	5,69	40









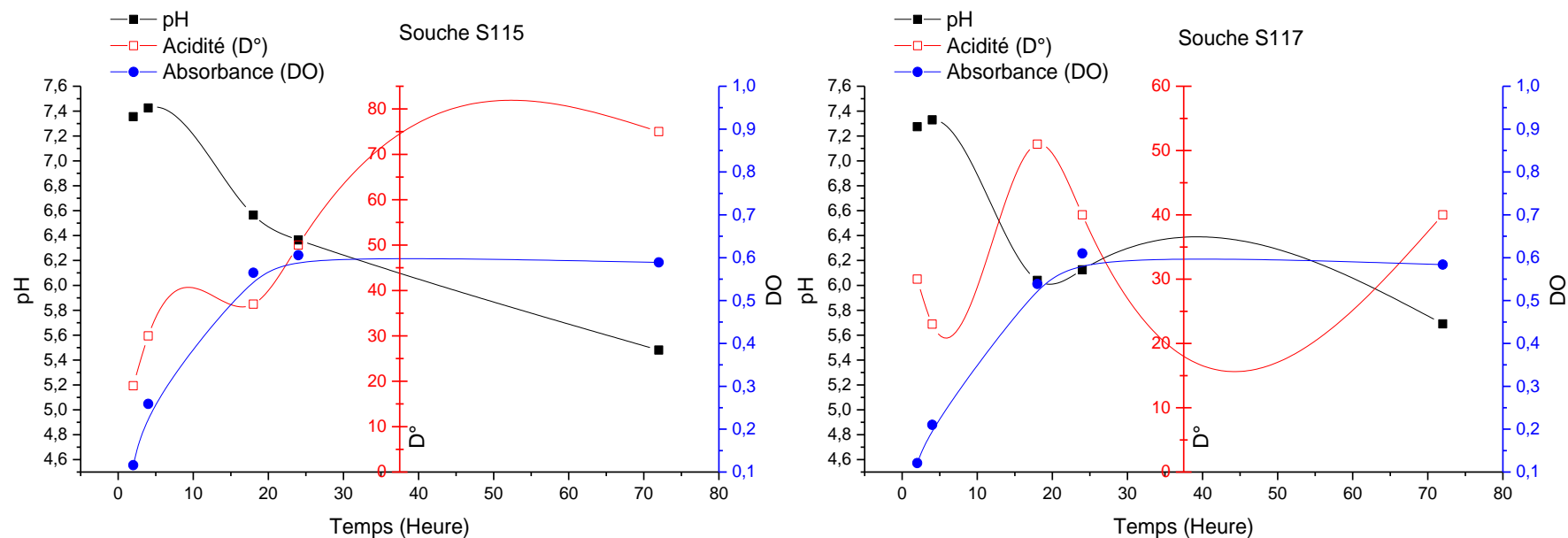


Figure 13 : Courbes moyennes d'acidification et de la cinétique de croissance des différents isolats d'entérocoques sélectionnés.

Parmi les aptitudes technologiques des souches, l'un des premiers critères de choix est naturellement l'aptitude à l'acidification. Il nous fallait donc fixer un pH limite assez bas, mais ce pH devait cependant être compatible avec le pouvoir acidifiant de chaque espèce afin de conserver un nombre suffisant de souches en vue de l'étude d'autres caractères. Le **tableau 25** rend compte des souches sélectionnées sur cette base. Après on a établi les courbes moyennes de pH, de l'acidité titrable, et de la cinétique de croissance, pour chaque espèce sélectionnée (**figure 13**). Ces graphiques mettent clairement en évidence les différences d'aptitude à l'acidification de chacune des espèces d'entérocoques, différences qui n'apparaissent non pas tant sur le pH final des cultures que sur la vitesse d'acidification, l'espèce *E. faecium* (S115) étant de ce point de vue particulièrement active ; toutefois, dans les 18 heures de culture, les entérocoques sont aptes à provoquer une acidification plus rapide du milieu. Il y a là un facteur favorable pour leur emploi dans les levains. Une observation qu'on a faite sur les courbes d'acidité titrable de 11 souches, c'est qu'il y a une diminution de l'acidité à la fin de la phase exponentielle de chacune de ces souches, suivies par une augmentation de cette acidité de novo ! au cours de la phase stationnaire, sans qu'il y ait effet sur le pH.

IV.3.1.2. Pouvoir coagulant

Pour la plupart des souches, le coagulum formé a une consistance pâteuse, il s'écoule lentement et il est friable. Le volume de lactosérum mesuré pour ces souches varie de 9,5 % jusqu'au 53 % du volume total du lait écrémé utilisé dans chaque flacon. Les souches S49, S114, et S115 ont donné un aspect différent du coagulum, il s'agit d'un liquide lisse non homogène et qui coule lentement en formant un filet, le volume du lactosérum mesuré pour ces souches-là est de 35 %, 24 %, et 32 % respectivement. Le tableau suivant résume l'aspect des gels formés après incubation à 37 °C des souches sélectionnées dans le lait écrémé pendant 48 h, et le volume en pourcentage de la synérèse produite dans ces laits.

Tableau 24 : Aspects rhéologiques des coagulums obtenus par les souches sélectionnées.

Souches	ID souches API 20 STREP	ID souches par ERIC-PCR	Aspect du gel	Synérèse (%)
S10	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Ferme, friable et visqueux	31
S26	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Ferme, friable et visqueux	10,5
S28	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Ferme, friable et visqueux	9,5
S30	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Ferme, friable et visqueux	12,5
S33	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Ferme, friable et visqueux	9,5
S43	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Ferme, friable et visqueux	50
S49	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Filant, lisse et non homogène	35
S55	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Ferme, friable et visqueux	44
S57	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Ferme, friable et visqueux	29
S61	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Ferme, friable et visqueux	33
S62	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Ferme, friable et visqueux	20
S77	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Ferme, friable et visqueux	18
S90	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Ferme, friable et visqueux	53
S94	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Ferme, friable et visqueux	42
S104	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Ferme, friable et visqueux	36
S114	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Filant, lisse et non homogène	24
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Filant, lisse et non homogène	32
S117	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	Ferme, friable et visqueux	26

IV. 3.1.3 Activité protéolytique

L'action protéolytique des entérocoques peut se manifester soit par une production d'enzymes exo-cellulaires qui accompagne le développement microbien, soit par une libération d'enzymes endo-cellulaires après la lyse des corps bactériens. La dégradation de

la caséine du lait par les entérocoques est d'une grande importance pour la maturation des fromages. Des données contradictoires sur l'activité protéolytique des entérocoques suggèrent une remarquable variation d'une souche à l'autre (**Arizcun & al., 1997 ; Durlu-Ozkaya & al., 2001 ; Delgado & al., 2002 ; Giraffa, 2003**). Bien qu'il y ait des exceptions, l'activité protéolytique des entérocoques semble généralement faible.

Dans cette étude presque la majorité des souches sélectionnées (77,8%) ont montré une activité protéolytique positive moyenne, qui varie d'une souche à l'autre et qui se traduit par des zones de protéolyse d'un diamètre oscillant de 14 mm à 31 mm. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 25 : Activité protéolytique sur gélose YMA des souches sélectionnées calculée en mm du diamètre de la zone de protéolyse.

Souches	ID souches API 20 STREP	ID souches par ERIC-PCR	Diamètre calculé (mm)	Evaluation de test
S10	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	20	+
S26	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	00	-
S28	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	00	-
S30	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	00	-
S33	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	16	+
S43	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	19	+
S49	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	18	+
S55	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	08	-
S57	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	15	+
S61	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	20	+
S62	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	20	+
S77	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	17	+
S90	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	31	+
S94	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	24	+
S104	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	21	+
S114	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	14	+
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	18	+
S117	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	15	+

IV.3.1.4. Activité lipolytique et amylolytique

En ce qui concerne l'activité lipolytique des entérocoques, des données limitées et souvent contradictoires existent dans la littérature.

Les résultats obtenus lors de ce travail sont résumés dans le **tableau 28**. Il ressort du tableau que les souches étudiées présentent une croissance sur les milieux MRS tween20 et 80, et gélose à l'amidon, mais sans aucune activité.

Tableau 26 : Résultat de l'activité lipolytique et amylolytique des souches sélectionnées.

Souches	Activité lipolytique	Activité amylolytique
	MRS - tween ^{20, 80}	Gélose à l'amidon
S10	Croissance sans dépôt (-)	-
S26	Croissance sans dépôt (-)	-
S28	Croissance sans dépôt (-)	-
S30	Croissance sans dépôt (-)	-
S33	Croissance sans dépôt (-)	-
S43	Croissance sans dépôt (-)	-
S49	Croissance sans dépôt (-)	-
S55	Croissance sans dépôt (-)	-
S57	Croissance sans dépôt (-)	-
S61	Croissance sans dépôt (-)	-
S62	Croissance sans dépôt (-)	-
S77	Croissance sans dépôt (-)	-
S90	Croissance sans dépôt (-)	-
S94	Croissance sans dépôt (-)	-
S104	Croissance sans dépôt (-)	-
S114	Croissance sans dépôt (-)	-
S115	Croissance sans dépôt (-)	-
S117	Croissance sans dépôt (-)	-
+ : test positif ; - : test négatif.		

IV .3.1.5. Pouvoir texturant (Détection des colonies larges et gluantes sur gélose hypersaccharosée)

Un attribut sensoriel clé de la production de yaourt est la texture, principalement entraînée par la coagulation protéique due à l'acidification par les bactéries lactiques. Les exopolysaccharides sont des polysaccharides exo-cellulaires qui peuvent être trouvés soit fixés à la paroi cellulaire sous la forme de capsules ou sécrétés dans le milieu extracellulaire, les EPS jouent un rôle très important dans l'industrie laitière, car ces biomolécules améliorent la texture et peuvent agir comme épaississant, stabilisant, agent viscosifiant, émulsifiant ou gélifiant « naturel ».

Les souches sélectionnées sont capables de se développer sur le milieu hypersaccharosé, mais seulement six souches (S30, S33, S77, S104, S114, et S115) peuvent donner un aspect large et gluant des colonies sur ce milieu. L'apparition des colonies larges et gluantes sur le milieu hypersaccharosé renseigne sur la production des EPS par ces souches.

Tableau 27 : Résultats du pouvoir texturant des souches sélectionnées

Souches	ID souches API 20 STREP	ID souches par ERIC-PCR	Aspects des colonies	Evaluation de test
S10	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Colonies petites et normales	-
S26	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Colonies moyennes et normales	-
S28	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Colonies moyennes et normales	-
S30	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Colonies larges et gluantes	+
S33	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Colonies larges et gluantes	+
S43	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Colonies moyennes et normales	-
S49	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies moyennes et normales	-
S55	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies moyennes et normales	-
S57	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies petites et normales	-
S61	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Colonies moyennes et normales	-
S62	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies petites et normales	-
S77	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies larges et gluantes	+
S90	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Colonies moyennes et normales	-
S94	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Colonies moyennes et normales	-
S104	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies larges et gluantes	+
S114	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Colonies larges et gluantes	+
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies larges et gluantes	+
S117	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	Colonies moyennes et normales	-

IV. 3.1.6 Pouvoir épaisissant

L'aspect épais dans les cultures du lait est utilisé aussi pour identifier les souches productrices d'EPS. La présence de ce type de polymères améliore la texture des laits fermentés, empêche la synérèse et peut augmenter la rétention d'humidité. D'après la méthode utilisée ici, on a calculé l'épaisseur du lait écrémé ensemencé par les souches sélectionnées dans des tubes à essai, par rapport à un témoin. Bien sûr, ça nous renseigne approximativement sur la production et la quantité d'EPS libérée par ces souches. Les résultats montrent qu'il y a une augmentation du volume du lait écrémé ensemencé dans tous les tubes, et que cette élévation d'épaisseur varie de 10 mm jusqu'au 25 mm. La valeur maximale a été obtenue par la souche S43 (25mm) avec un aspect épais et ferme du gel formé. La plupart des souches ont donné des gels thixotropiques.

Tableau 28 : Résultats de test de pouvoir épaississant

Souches	ID souches API 20 STREP	ID souches par ERIC-PCR	Aspects des coagulums	Epaisseur (mm)
S10	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Coagulant épais et ferme	16
S26	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Coagulant épais et ferme	18
S28	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Coagulant épais et semi liquide	10
S30	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Coagulant épais et ferme	10
S33	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Coagulant épais et solide	13
S43	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Coagulant épais et ferme	25
S49	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	10
S55	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	16
S57	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	20
S61	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Coagulant épais et ferme	21
S62	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et semi liquide	23
S77	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	12
S90	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Coagulant épais et ferme	15
S94	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	Coagulant épais et ferme	10
S104	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	17
S114	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	Coagulant épais et ferme	12
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	20
S117	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	Coagulant épais et ferme	13

IV.3.1.7. Pouvoir aromatisant

De nombreux auteurs ont montré que l' α -acétolactate est un composé instable, il peut se transformer spontanément en diacétyle et/ou en acétoïne (**Monnet et al., 2008**). D'après **Phalip et al., (1994)**, l'acétoïne est l'une des molécules aromatiques du catabolisme des acides aminés [acide aspartique], comme il peut avoir comme origine la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique.

La production d'acétoïne se traduit après l'ajout des réactifs VPI et VP II par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu. Nos résultats révèlent que tous les isolats produisant de l'acétoïne est sont (VP+). Ce test a été confirmé par le test VP de l'API 20 STREP.

IV.3.1.8. Activité autolytique

Il est admis que l'autolyse entraîne la libération des constituants endo-cellulaire y compris les enzymes endo-cellulaire, dont elles peuvent avoir dans le cas des entérocoques, un impact sur la flaveur et l'arôme des fromages au cours de leur maturation. L'activité autolytique est classée selon **Ayad & al. (2004)** de bonne 70-96%, faible 40-69% et pauvre 0-39%.

On a testé l'activité autolytique des isolats sélectionnés dans le tampon PBS pH 7,2. D'après les résultats figurants dans le tableau ci-dessous, et selon l'échelle proposée par **Ayad & al. (2004)** 33,3% des souches ont une bonne activité autolytique, 44,5% des souches ont une faible activité, et 22,2% ont une pauvre activité autolytique. L'activité autolytique maximale a été enregistrée pour la souche S114 (87,6%)

Tableau 29 : Activité autolytique des isolats sélectionnés.

Souches	Absorbance (A_{620})		Activité autolytique (%)
	A initiale	A de 24h à 37°C	
S10	0,200	0,032	84
S26	0,115	0,073	36
S28	0,155	0,053	66
S30	0,173	0,062	64
S33	0,142	0,069	51
S43	0,113	0,074	34,5
S49	0,146	0,021	85,6
S55	0,206	0,104	49,5
S57	0,141	0,094	33
S61	0,166	0,113	32
S62	0,133	0,079	40,6
S77	0,158	0,049	69
S90	0,053	0,0136	74
S94	0,104	0,023	77,8
S104	0,126	0,043	65,9
S114	0,291	0,036	87,6
S115	0,139	0,033	76
S117	0,184	0,086	53

IV.4. Caractérisation sanitaire des entérocoques

IV.4.1. Etude des caractères d'intérêt sanitaire

IV.4.1.1. Recherche de la gélatinase

La gélatinase est l'un des facteurs de virulence largement étudiée chez *E. faecalis* (Del Papa et al., 2007), il s'agit d'une Zinc-métalloprotéase extracellulaire qui agit sur une variété de substrats tels que la chaîne β de l'insuline, le collagène des tissus, le vasoconstricteur endothéline-1, ainsi que des phéromones sexuelles et leurs peptides inhibiteurs (Waters & al., 2003 ; Fisher et al., 2009). En outre, la gélatinase contribue au processus de formation de biofilm, ce qui peut accroître la capacité des entérocoques à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (Del Papa et al., 2007).

Les résultats de recherche de la gélatinase dans notre étude sont mentionnés ci-dessus dans le **tableau 22**. Il ressort de cela que 18,7% des isolats dégradent la gélatine, ce qui signifie que ces isolats possèdent le phénotype [GEL], une protéase (la gélatinase) capable d'hydrolyser la gélatine. 65,2% de ces isolats [GEL] ont été identifiés comme étant des *E. faecium*.



Gélatinase positif

Gélatinase négatif

Figure 14 : Résultat de test d'hydrolyse de la gélatine

IV.4.1.2. Recherche du type d'hémolyse (la cytolysine)

L'activité hémolytique [cytolytique] des isolats a été observée comme une zone de lyse entourant les colonies, parmi les 123 isolats testés nous n'avons recensé que 10 isolats β hémolytiques ce qui fait une fraction de 08,13 %. Ce résultat est cité dans le **tableau 22**

IV.4.2. Résistance aux antibiotiques (Antibiogramme).

Les antibiotiques analysés comprennent (1) des inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire tels que les glycopeptides (vancomycine) et β -lactames (ampicilline, et pénicilline G) ; (2) des inhibiteurs de la synthèse protéique bactérienne inhibant la sous-unité ribosomale 30 S tels que les tétracyclines (tétracycline) et les aminoglycosides (gentamicine) ; (3) les inhibiteurs de la synthèse protéique bactérienne inhibant la sous-unité ribosomale 50 S tels que les macrolides (érythromycine) ; (4) les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques bactériens tels que les rifampicines (rifampicine).

L'analyse des résultats obtenus du test de la sensibilité aux antibiotiques a montré que presque la majorité des isolats présentait une sensibilité élevée pour tous les antibiotiques testés, selon les normes CLSI. Malgré ça nous avons enregistré des cas de résistance à tous les antibiotiques testés.

Tableau 30 : Résultat global de l'antibiogramme des isolats

Antibiotiques	Résultats en (%) pour n=123 isolats		
	Résistants (%)	Intermédiaire (%)	Sensible (%)
Ampicilline (Amp)	6 (5)	22 (18)	94 (77)
Pénicilline (Pen)	10 (8)	2 (2)	110 (90)
Erythromycine (Ery)	5 (4)	33 (27)	84 (69)
Rifampicine (Rif)	2 (2)	1 (1)	119 (97)
Tétracycline (Tet)	3 (3)	2 (2)	117 (95)
Gentamicine (Gen)	2 (2)	0 (0)	121 (98)
Vancomycine (Van)	5 (4)	1 (1)	116 (95)

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, on note une faible prévalence de résistance aux différents antibiotiques testés. 8%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 2% pour la pénicilline, l'ampicilline, l'érythromycine, la vancomycine, la tétracycline, la gentamicine, et la rifampicine respectivement. En plus on a signalé 18%, et 27% des isolats qui ont une sensibilité intermédiaire à l'ampicilline, et à l'érythromycine respectivement.

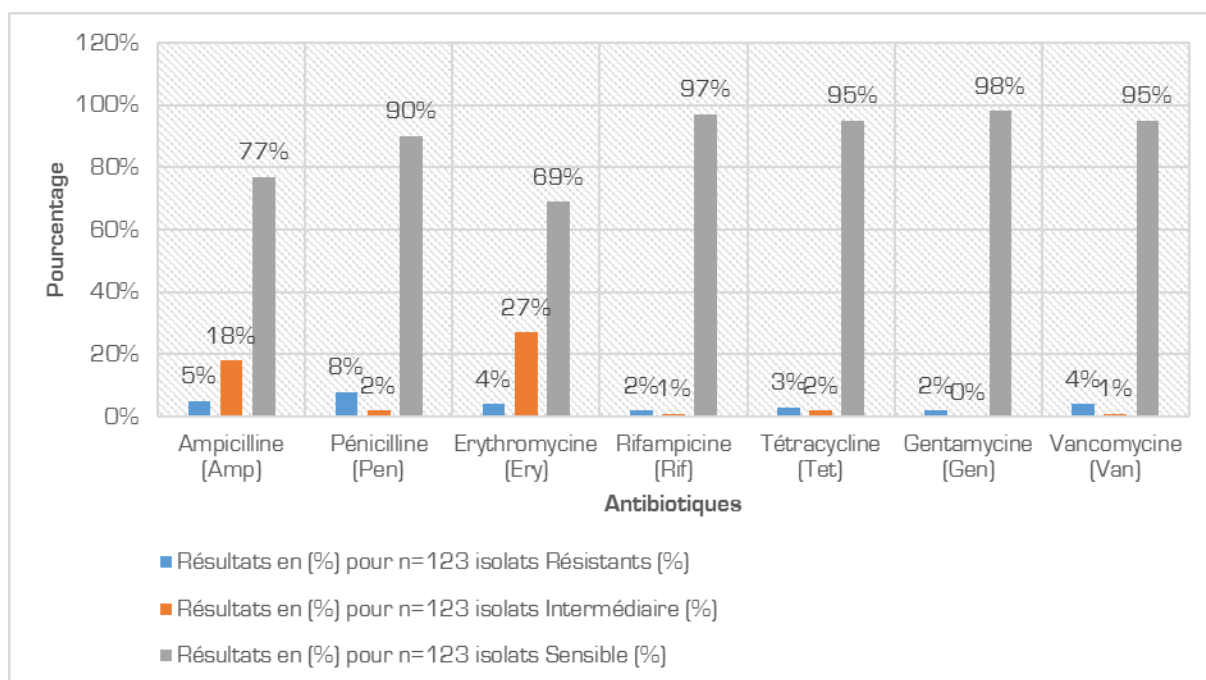


Figure 15 : Distribution des fréquences de sensibilité et de résistance de tous les isolats (n=123).

D'après cette distribution (fig.), il est clair que la plupart des isolats sont sensibles aux différents antibiotiques avec des fréquences oscillantes de 69 % jusqu'au 98 %. La résistance à la vancomycine considérée comme l'agent du dernier ressort dans les infections sévères des germes à Gram positif a été la plus surprenante. En dépit d'être plus bas (4 %), ça nous laisse poser la question sur l'origine de cette résistance, sachant que ces isolats résistants ont été isolés à partir d'un environnement (le lait de chamelle) où l'utilisation des différents antibiotiques est d'une faible fréquence et peut être presque inexistante, ainsi que les sources de contamination dans cet environnement sont limitées.

Les profils de résistances aux antibiotiques testés des groupes d'espèces identifiées dans cette étude sont résumés dans le tableau ci-dessous. Dont on a observé que les isolats identifiés comme étant *E. faecium* ont présenté une prévalence de résistance élevée par rapport aux autres groupes d'espèces. Dans ce groupe d'*E. faecium* on a obtenu cinq (5) isolats résistants à la pénicilline, trois (3) à la vancomycine, deux (2) à l'érythromycine, un isolat à l'ampicilline, et un à la gentamicine. En deuxième place vient le groupe des isolats identifiés comme étant *E. faecalis* qui a montré une résistance à six antibiotiques ; la pénicilline (4), la tétracycline (2), la rifampicine (1), l'érythromycine (1), l'ampicilline (1), et la vancomycine (1). Et à moindre degré le groupe des isolats identifiés en tant que *E. gallinarum* qui n'a présenté une résistance que pour quatre (4) antibiotiques ; l'ampicilline

(2), la pénicilline (1), l'érythromycine (0), et la rifampicine (1). Le tableau suivant récapitule les résultats de l'antibiogramme en fonction des groupes des espèces identifiées.

Tableau 31 : Résultats de l'antibiogramme pour chaque groupe d'espèces identifiées.

		Souches selon identification par API 20 STREP						
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. avium</i>	<i>A. viridans</i>	<i>S. uberis</i>	<i>L. lactis ssp lactis</i>
		N=78	N=14	N=18	N=07	N=03	N=02	N=01
Van	S	75	13	18	7	2	1	1
	I	0	0	0	0	1	0	0
	R	3	1	0	0	0	1	0
Gen	S	77	14	18	7	3	1	1
	I	0	0	0	0	0	0	0
	R	1	0	0	0	0	1	0
Amp	S	66	6	13	6	2	1	1
	I	11	7	3	1	0	0	0
	R	1	1	2	0	1	1	0
Ery	S	64	4	10	5	1	0	1
	I	12	9	7	2	1	2	0
	R	2	1	1	0	1	0	0
Tet	S	78	12	17	7	2	1	1
	I	0	0	1	0	0	1	0
	R	0	2	0	0	1	0	0
Pen	S	73	9	17	6	3	2	1
	I	0	1	0	1	0	0	0
	R	5	4	1	0	0	0	0
Rif	S	78	13	16	7	3	2	1
	I	0	0	1	0	0	0	0
	R	0	1	1	0	0	0	0

Les profils de la multirésistance des isolats sont présentés dans le **tableau 32**. On a recensé dans cette étude six isolats résistants à deux ou plus de deux antibiotiques. Dont quatre isolats sont résistants à deux antibiotiques, un isolat est résistant à trois antibiotiques, et un autre isolat est résistant à quatre antibiotiques. On a remarqué aussi que parmi ces isolats trois ont une résistance à la vancomycine. Ainsi on a constaté que cette résistance multiple ne dépend pas de l'espèce, car différentes espèces ont montré une multirésistance.

Tableau 32 : Les isolats phénotypiquement multi-résistants.

Codes souches	ID souches par API 20 STREP	ID souches par ERIC-PCR	Phénotype de résistance
S12	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	PEN, TET
S18	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	AMP, ERY, RIF, VAN
S39	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	PEN, TET
S84	<i>A. viridans</i>	<i>E. faecium</i>	AMP, TET
S96	<i>S. uberis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	AMP, GEN, VAN
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	AMP, VAN

ID : identification des...

IV.4.3. Recherche des gènes de virulence par la technique PCR multiplex

Pour la recherche des gènes de virulence nous avons choisi les isolats phénotypiquement positifs pour des caractères de virulence telle que la gélatinase et l'hémolysine [cytolysine]...

Une PCR multiplex développée pour la détection simultanée des gènes entérocoques codant pour la substance d'agrégation (*asa1*), la gélatinase (*gelE*), la cytolysine (*cylA*), la protéine de surface d'entérocoque (*esp*) et l'hyaluronidase (*hyl*), a été décrite précédemment par **Vankerckhoven & al, (2004)**. Le protocole multiplex pour ces cinq gènes fournit une alternative fiable et rapide aux tests phénotypiques et aux PCR uniplex. Par cette technique, nous avons testé 26 souches pour la présence des cinq facteurs de virulence. Les résultats sont mentionnés dans les figures et les tableaux ci-dessous.

Après migration des produits d'amplification de la recherche des facteurs de virulence, sur gels d'agarose à 1,5% il y avait apparition des bandes discrètes d'un nombre et d'intensité variables selon les souches testées. L'analyse de ces gels en utilisant le logiciel vision Capt de Vilber Lourmat, associé à l'appareillage de visualisation a abouti aux résultats présentés dans les tableaux (33, 34).

Dans le tableau 33 on note des bandes de taille fluctuante de 42 pb jusqu'à 710 pb, ainsi pour le tableau 34 la taille des bandes varie de 50 à 815 pb. Ces bandes-là correspondent à des produits différents, et par comparaison avec la taille de chaque facteur de virulence tel qu'elle est citée dans la littérature, on a pu estimer approximativement le profil de virulence de chaque souche testée et pour uniquement les facteurs sus-cités. Ces profils sont récapitulés dans le **tableau 35**.

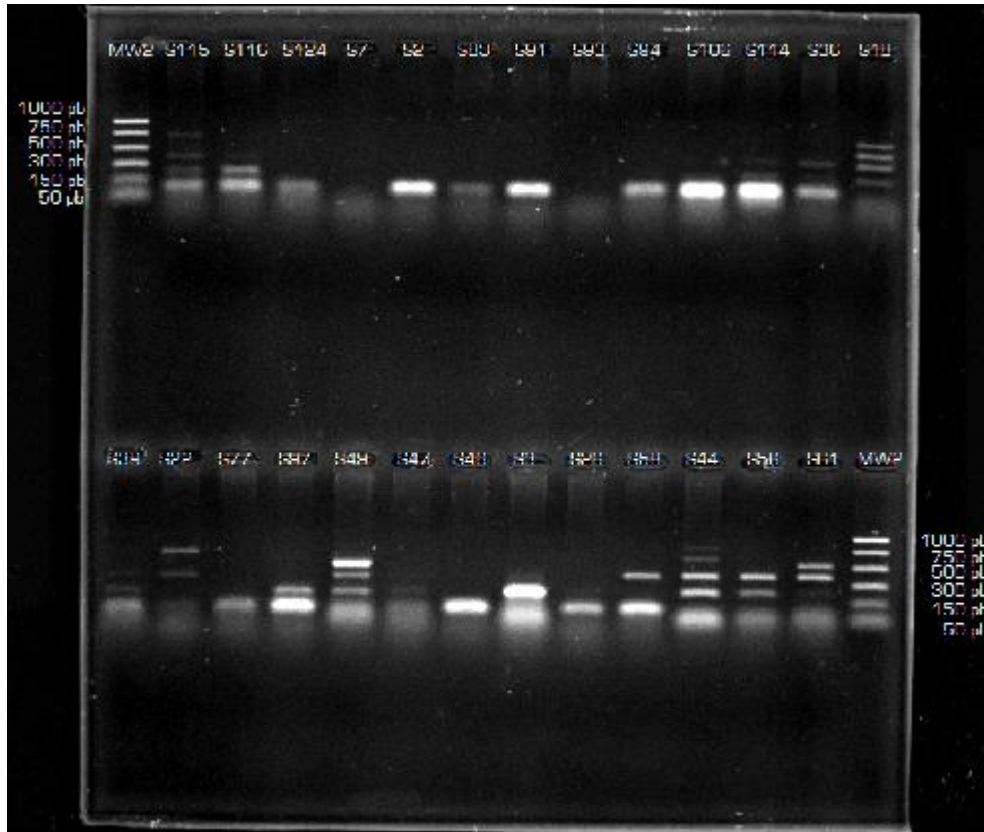


Figure 16 : Profils électrophorétiques des produits de la PCR multiplex des 26 isolats d'entérocoques pour la recherche des facteurs de virulence.

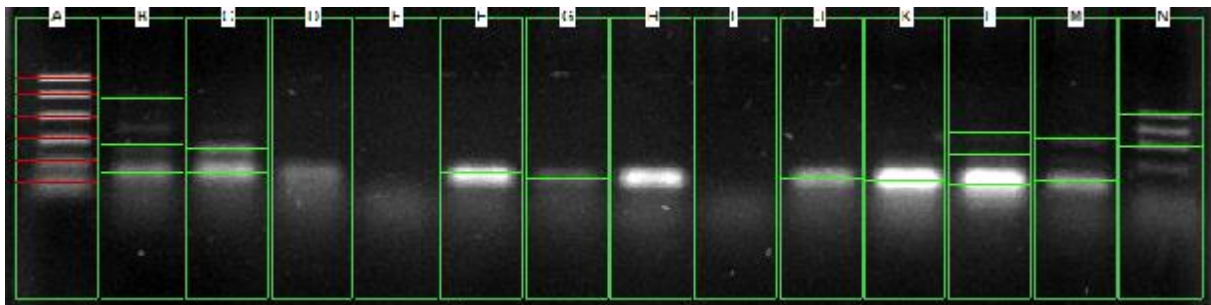


Figure 17 : Analyse des profils électrophorétiques des produits de la PCR multiplex par logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, et détection des bandes correspondantes aux facteurs de virulence [gel 1].

Tableau 33 : Les tailles des bandes détectées après analyse des produits de la PCR multiplex du gel 1

A Marqueur PCR	B S115	C S116	D S124	E S7	F S2	G S83	H S91	I S93	J S94	K S106	L S114	M S36	N S18
1000	710	372	72		94	64	72		64	57	342	300	518
750	372	227									186	168	372
500	250	94									42	57	238
300	94												117
150													
50													

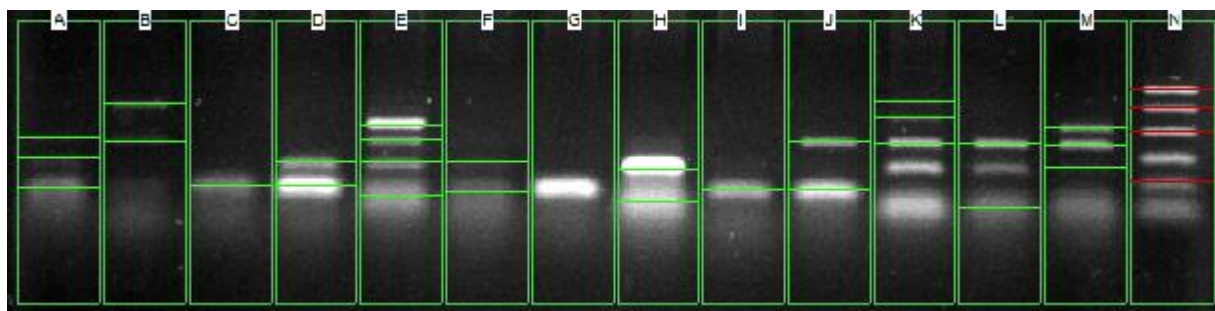


Figure 18 : Analyse des profils électrophorétiques des produits de la PCR multiplex par logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, et détection des bandes correspondantes aux facteurs de virulence (gel 2).

Tableau 34 : Les tailles des bandes détectées après analyse des produits de la PCR multiplex du gel 2

A S39	B S22	C S77	D S97	E S49	F S47	G S46	H S3	I S26	J S58	K S44	L S56	M S61	N Marqueur PCR
444	815	135	265	567	265	121	212	114	417	837	403	533	1000
288	417		135	430	108		72		114	638	222	390	750
128				265						403	55	232	500
				95						222		50	300
										50			150

Il ressort du tableau ci-dessous que sur les 26 souches testées 17 (65,4 %) possèdent au moins un facteur de virulence. Autrement dit, on a trouvé un seul facteur de virulence chez 5 (19 %) isolats, deux facteurs chez 5 (19 %) isolats, trois facteurs chez 6 (23 %) isolats, et quatre facteurs chez 1 (4 %) isolat. Comme on a remarqué que la distribution de ces facteurs de virulence entre les isolats est indépendante de l'espèce, ç à dire il n'y a pas une particularité des gènes de virulence pour une espèce à l'autre.

Il semble aussi que le déterminant génétique de virulence *asa1* avec une fréquence de 46 % soit le facteur prédominant parmi les cinq facteurs étudiés., suivi par le facteur *gelE* (42,3 %), puis *hyl* (30,8 %), *esp* (15,4 %), et d'une moindre fréquence *cylA* (7,7 %).

29,5 % des souches virulentes ont été identifiées par la méthode ERIC-PCR en tant que *E. faecium*, et c'est le seul groupe qui a montré la présence du gène *cylA*. 23,5 % des souches virulentes se sont des *E. faecalis*, et parmi ces souches on trouve la souche S18 qui possède le nombre le plus élevé des facteurs de virulence (4), en plus elle a montré une résistance multiple vis-à-vis les antibiotiques testés. Le reste des souches virulentes 47 % ont été classées par la méthode ERIC-PCR dans le groupe d'*Enterococcus spp.*

Tableau 35 : Résultats de la recherche des gènes de virulence.

Codes	ID souches par API 20 STREP	ID par ERIC-PCR	<i>asa1</i>	<i>gelE</i>	<i>cyl A</i>	<i>esp</i>	<i>hyl</i>
S2	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-
S3	<i>S. uberis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	-	+	-	-	-
S7	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	-
S18	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+
S22	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	-
S26	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	-	-	-	-	-
S36	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	+
S39	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	-	+	-	-	+
S44	<i>E. avium</i>	<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	-
S46	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-
S47	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	-	-	-	-	+
S49	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+	+
S56	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	-
S58	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	+	-	-	-	-
S61	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	+	+	-	+	-
S77	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-
S83	<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-
S91	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	-	-	-	-	-
S93	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-
S94	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-
S97	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+
S106	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-
S114	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	+	+	-	-	-
S115	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	+	-	+	-	+
S116	<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus spp</i>	+	+	-	-	-
S124	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus spp</i>	+	+	-	-	+

IV.4.4. Résultats d'amplification des gènes de résistance

La détection des génotypes de résistance aux glycopeptides a été réalisée par PCR multiplex comme il a été décrit précédemment (**Dutka-Malen & al., 1995**). Le choix des souches à tester a été basé sur le phénotype de résistance des souches. On a inclus dans cette expérience tous les isolats présentant un phénotype de résistance et/ou de sensibilité intermédiaire aux antibiotiques utilisés. Comme on a inclus aussi quelques souches susceptibles, pour avoir une idée sur la relation entre le phénotype et le génotype de résistance à la vancomycine de ces isolats.

Les gènes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, et *vanC2-vanC3* ont été recherchés par amplification de l'ADN des isolats sélectionnés en utilisant les amorces correspondantes à chaque gène. Les résultats d'amplification d'ADN des 33 isolats choisis sont présentés dans les figures

19, 20, 21, 22, 23, 24 et les génotypes de résistance à la vancomycine et d'identification par les amorces *ddl* sont détaillés dans le **tableau 40**.

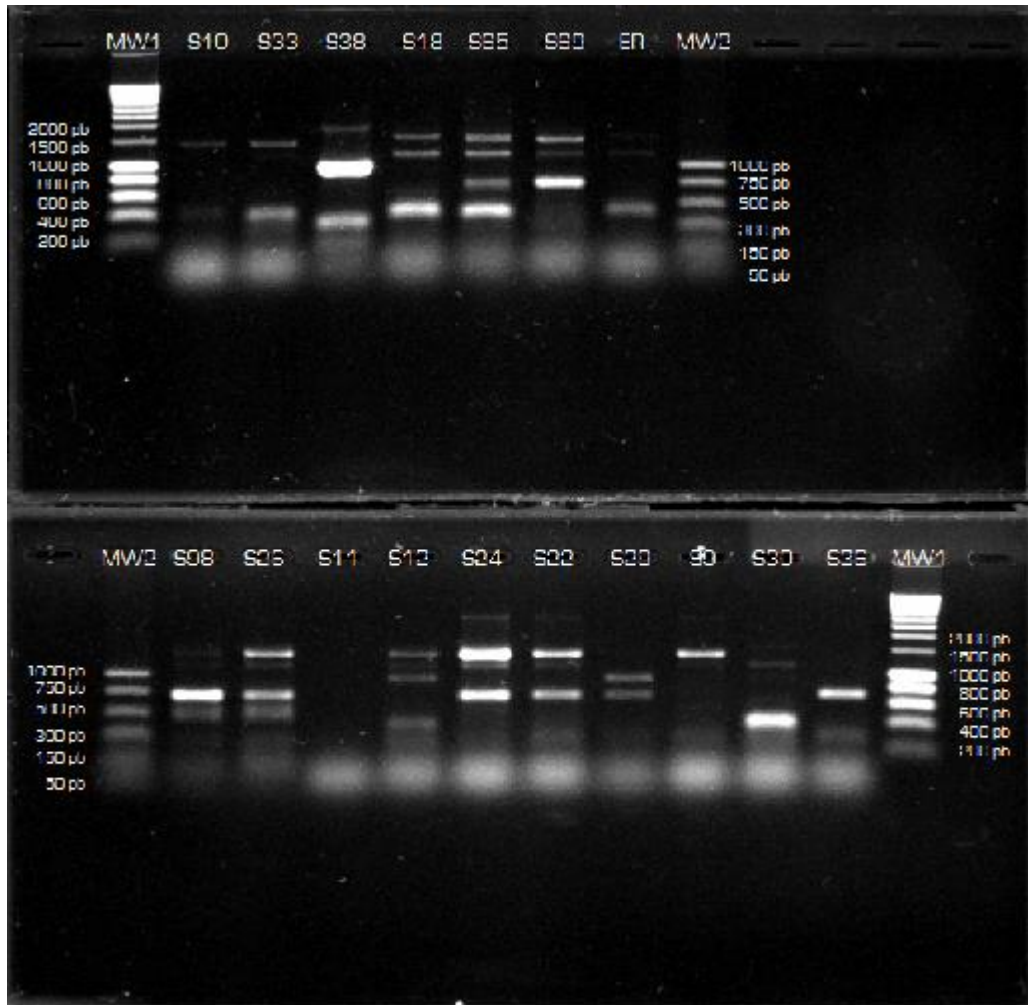


Figure 19 : Profils génotypiques de la résistance à la vancomycine et identification par *ddl* des souches sélectionnées (gel1 supérieur et gel2 inférieur).

Les gels 1 et 2 (**figure 19**) représentent les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR multiplex des gènes de résistance à la vancomycine et des gènes *ddl* d'identification.

On a constaté l'apparition des bandes diverses, d'un nombre variable de un à cinq bandes selon les isolats, et aussi d'une taille variable. Cependant on a signalé l'absence des bandes pour quelques isolats.

L'apparition des bandes avec des tailles qui correspondent aux gènes de résistance à la vancomycine ; *vanA*, *vanB*, *vanC1*, et *vanC2-vanC3* (**tableau 40**), confirme la détection de ces gènes. En parallèle, l'apparition des bandes de taille équivalente à la taille des gènes

ddl_{E. faecalis}, ou *ddl_{E. faecium}* confirme l'appartenance de l'isolat à *E. faecalis* ou bien *E. faecium*, respectivement, sinon c'est une autre espèce entérocoque.

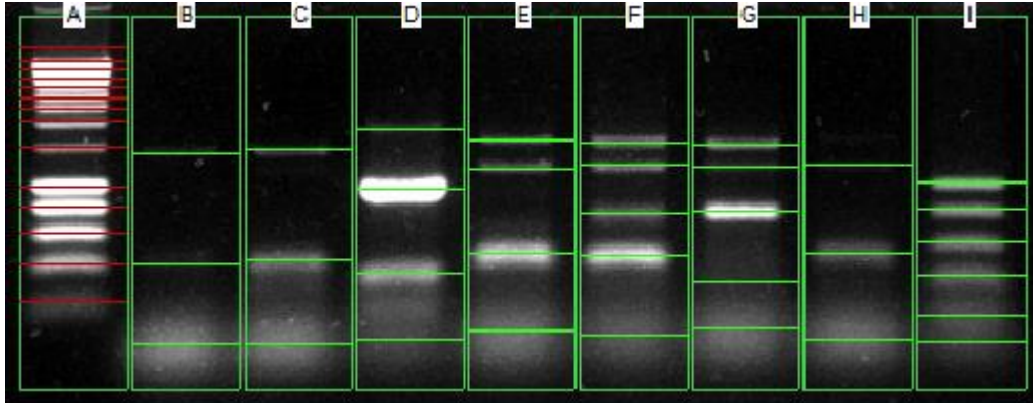


Figure 20 : Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, **(gel 1)**.

Le tableau ci-dessous représente les résultats de l'analyse du gel 1 par le logiciel Vision Capt, la taille des bandes détectées varie entre 302 à 1824 pb. Les résultats des bandes correspondants aux gènes recherchés sont mentionnés dans le **tableau 40**.

Une remarque toujours dans le tableau ci-dessous, c'est que la plupart des souches ont généré des fragments avec des tailles inattendues [toutes les bandes qui ont une taille > 941 pb et <439 pb] qui nécessitent d'être séquencés.

Tableau 36 : Les tailles en paires de base des différentes bandes détectées dans le gel 1

A Marqueur 1Kb	B S10	C S33	D S38	E S18	F S65	G S69	H ER
200 - 10000 pb	1412	1471	1824	1614	1575	1537	1268
	400	426	977	1212	1268	1240	467
			350	467	749	766	
					453	302	

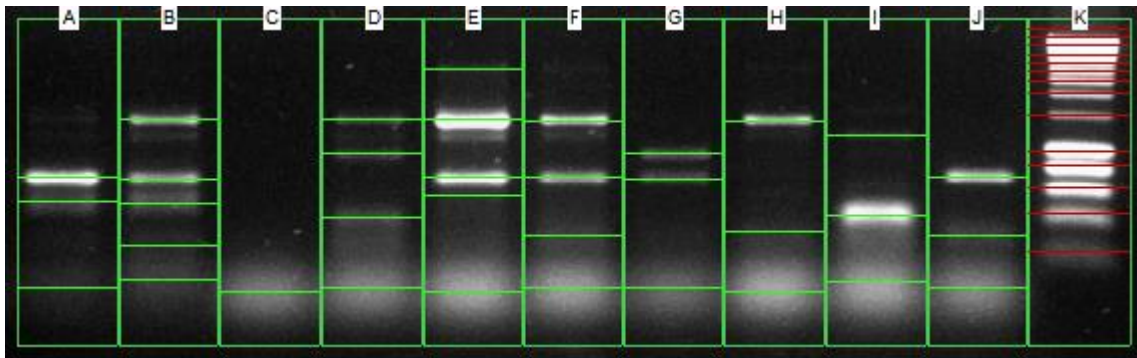


Figure 21 : Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, **[gel 2]**.

Le tableau ci-dessous représente les résultats de l'analyse du gel 2 par le logiciel Vision Capt, la taille des bandes détectées varie entre 227 à 1447 pb. Les résultats des bandes correspondants aux gènes recherchés sont mentionnés dans le **tableau40**.

L'isolat S11 n'a donné aucune bande, les autres isolats ont donné des fragments avec des tailles inattendues, même remarque que le tableau précédent.

Tableau 37 : Les tailles en paires de base des différentes bandes détectées dans le gel 2

A S98	B S26	C S11	D S12	E S24	F S22	G S29	H S9	I S30	J S36	K Marqueur 1Kb
700	1447		1447	1447	1420	969	1420	1230	700	200-10000 pb
487	683		969	700	700	683	295	387	275	
	472		374	535	275					
	227									

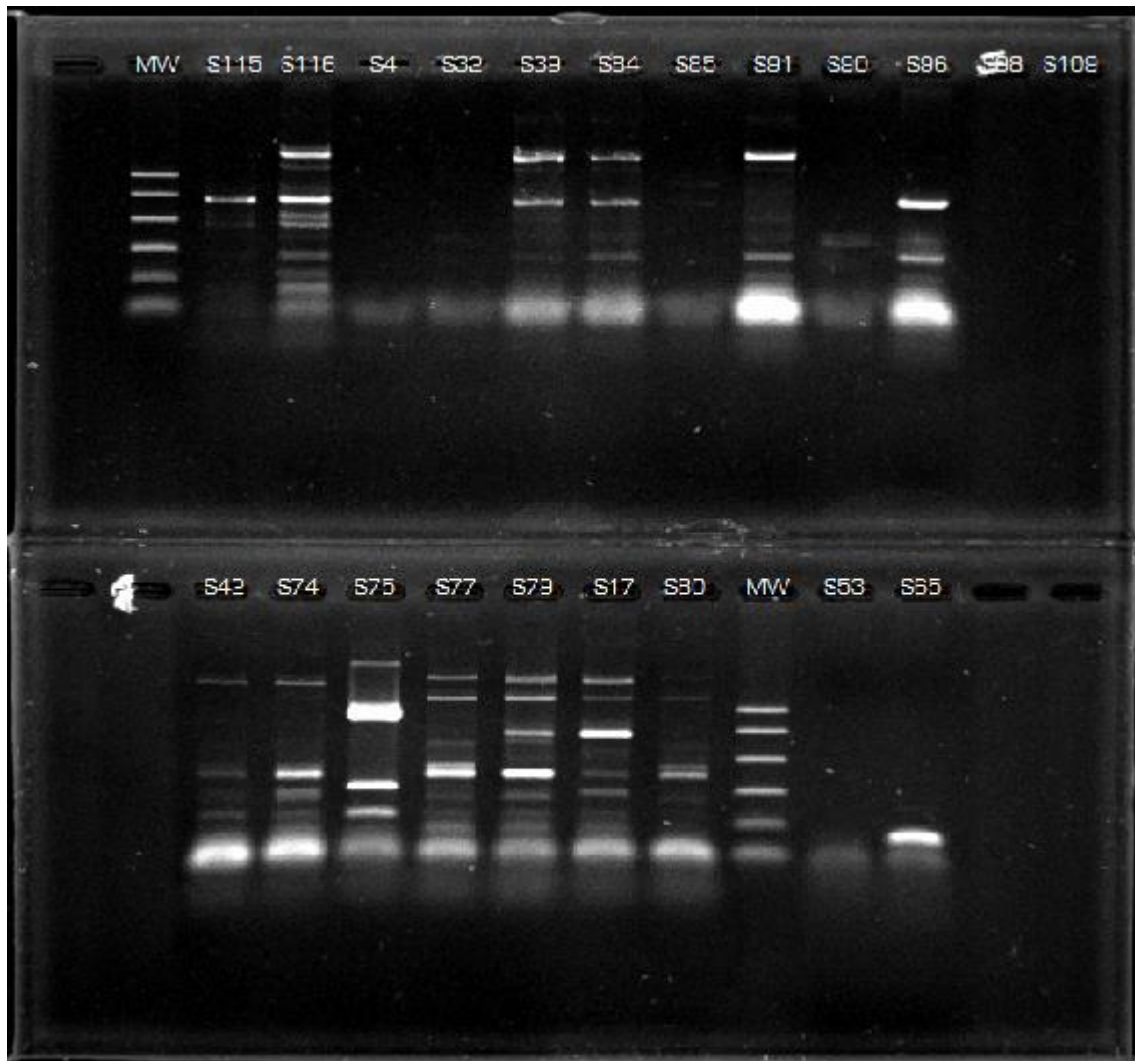


Figure 22 : Profils génotypiques de la résistance à la vancomycine et identification par *ddl* des souches sélectionnées [gel 3 supérieur et gel 4 inférieur].

Les gels 3 et 4 (**figure 22**) représentent les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR multiplex des gènes de résistance à la vancomycine et des gènes *ddl* d'identification.

On a eu la même constatation que le gel 1 et 2 sauf qu'il y a ici plus de bandes qui sont apparues que dans les deux gels précédents (gel 1 et 2), et qu'il y a trois isolats n'ont pas donnés de bandes ce qui se traduit par l'absence des gènes de résistance à la vancomycine dans le génome de ces isolats.

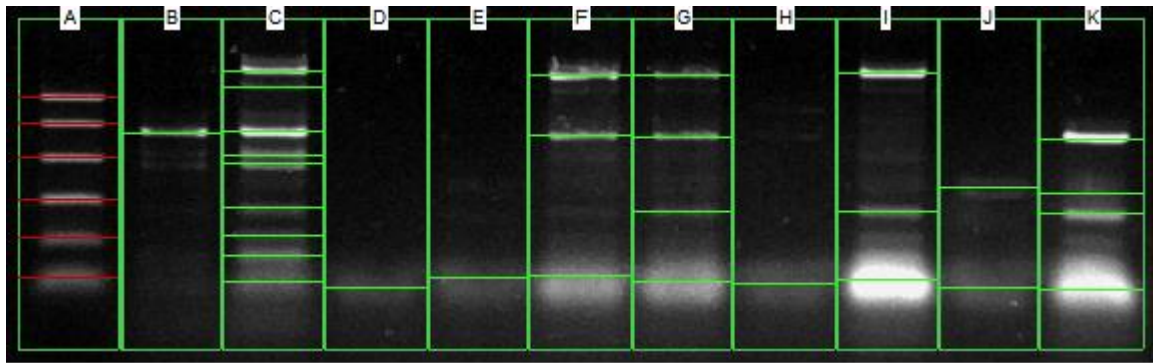


Figure 23 : Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, **(gel 3)**.

Le tableau ci-dessous représente les résultats de l'analyse du gel 3 par le logiciel Vision Capt, la taille des bandes détectées varie entre 100 à 1250 pb. Les résultats des bandes correspondants aux gènes recherchés sont mentionnés dans le **tableau 40**.

Les isolats S4, S32, et S85 n'ont donné aucune bande, les autres isolats ont donné des fragments avec des tailles inattendues. Les bandes qui leurs tailles sont équivalentes à celle de tel ou tel gènes de résistance à la vancomycine, confirment la présence de ces gènes dans les génomes de ces isolats.

Tableau 38 : Les tailles en paires de bases des différentes bandes détectées dans le gel 3

A Marqueur PCR	B S115	C S116	D S4	E S32	F S39	G S84	H S85	I S91	J S90	K S96
1000	672	1250			1211	1211		1231	357	626
750		687			656	641		247		328
500		513				246				238
300		469								
150		264								
		156								
		100								

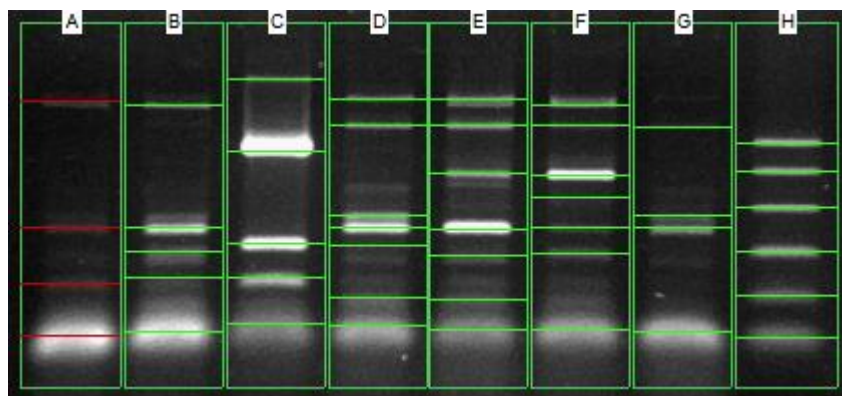


Figure 24 : Analyse des profils génotypiques de la résistance à la vancomycine par le logiciel Vision Capt de Vilber Lourmat, (gel 4).

Le tableau ci-dessous représente les résultats de l'analyse du gel 4 par le logiciel Vision Capt, la taille des bandes détectées varie entre 139 à 1393 pb. Les résultats des bandes correspondants aux gènes recherchés sont mentionnés dans le **tableau 40**. On note toujours la présence des isolats qui ont donné des fragments avec des tailles inattendues. En plus ce gel a révélé le nombre le plus élevé des bandes par rapport aux autres gels. Mais la plupart de ces bandes n'ont pas une signification vis-à-vis la résistance à la vancomycine.

Tableau 39 : Les tailles en paires de bases des différentes bandes détectées dans le gel 4

A S42	B S74	C S75	D S77	E S79	F S17	G S80	H Marqueur PCR
1375	1339	925	1393	1393	1339	1143	1000
405	405	333	1161	1161	1161	462	750
185	300	204	462	736	722	405	500
	204		405	396	573		300
			325	284	405		150
			144	139	292		

Le **tableau 40** récapitule l'ensemble des résultats obtenus par les quatre gels de la séparation électrophorétique des produits de la PCR multiplex des gènes de résistance à la vancomycine de 33 isolats choisis. Les gènes *vanA*, *vanB*, et *vanC2-vanC3* ont été détectés respectivement dans 8, 7, et 12 des 33 isolats d'entérocoques sélectionnés. Aucun isolat ne contenait le gène *vanC1*. Les 15 isolats résistants à la vancomycine qui présentaient un mécanisme de résistance acquis (avec *vanA* ou *vanB*) ont été identifiés comme *E. faecium* (6 isolats), *E. faecalis* (4 isolats), *E. gallinarum* (deux isolats), *E. avium* (un isolat), *S. uberis* (un isolat), et *A. viridans* (un isolat). Et les 12 isolats résistants à la vancomycine qui présentaient un mécanisme de résistance intrinsèque (avec *vanC2-vanC3*) ont été identifiés par l'API 20 STREP et les gènes *ddl*, en tant que ; *E. faecium* (8 isolats), *E. faecalis* (2 isolats),

E. gallinarum (un isolat), et *E. avium* (un isolat). Par confrontation de ces résultats génotypiques aux résultats phénotypiques de la résistance à la vancomycine des cinq isolats (S18, S65, S69, S96, et S115), on a constaté effectivement la possession d'un ou deux gènes de résistance à la vancomycine par ces isolats, et par conséquent la confirmation du caractère phénotypique.

Tableau 40 : Détermination des génotypes de résistance à la vancomycine et de l'identification des souches par les gènes *ddl*.

Souches	<i>van A</i>	<i>van B</i>	<i>van C-1</i>	<i>vanC-2, vanC-3</i>	<i>ddlEf</i>	<i>ddlEfc</i>	Identification par <i>ddl</i>	Identification API 20 strep
S4	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S9	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S10	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S11	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S12	-	-	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
S17	+	-	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
S18	-	-	-	+	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
S22	+	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S24	+	-	-	-	-	+	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
S26	-	+	-	+	-	-	-	<i>E. avium</i>
S29	-	+	-	-	-	+	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
S30	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. gallinarum</i>
S32	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. gallinarum</i>
S33	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. gallinarum</i>
S36	+	-	-	-	-	-	-	<i>E. gallinarum</i>
S38	-	-	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>
S39	-	+	-	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S42	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S65	+	-	-	+	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
S69	+	-	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
S74	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S75	-	-	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
S77	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S79	+	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S80	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S84	-	+	-	-	-	-	-	<i>A. viridans</i>
S85	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. viridans</i>
S90	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S91	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S96	-	+	-	-	-	-	-	<i>S. uberis</i>
S98	+	-	-	+	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S115	-	+	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S116	-	+	-	+	-	+	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>

IV.5. Discussion

Le lait est une finalité des plus importantes de l'élevage du dromadaire. Il constitue depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomades qui le consomment habituellement à l'état cru. Le lait de chamelle, comme celui des autres mammifères, est un milieu de composition chimique et physique complexe. Jamais l'apport du dromadaire n'a été envisagé, même dans les régions arides et semi-arides. Cet animal n'est exploité que de façon extensive pour la production de viande, et le peu de lait produit est consommé localement, l'éleveur n'étant pas capable de le transformer en beurre ou en fromage, ou de le commercialiser.

Cette étude avait comme objectifs, l'évaluation de la qualité physicochimique et microbiologique du lait de chamelle, la caractérisation des entérocoques présents dans le lait de chamelle, en passant après isolement par une identification physiologique, biochimique, et génétique, suivie par la recherche des souches d'intérêt technologique en recherchant des fonctionnalités essentielles, et en terminant par une caractérisation sanitaire d'où il y avait étude de la résistance aux antibiotiques, et recherche des facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité de ce groupe bactérien. Le choix des entérocoques a été établi en fonction de leur capacité à résister à des conditions hostiles telles que le séchage, le stress thermique et l'irradiation UV qui prévalent dans les régions d'où les échantillons de lait de chamelle ont été prélevés.

La composition physico-chimique du lait de chamelle a été analysée. Les valeurs des paramètres physicochimiques (pH, acidité Dornic, extrait sec total, taux de cendre, teneur en protéines, et taux de la matière grasse) enregistrées de nos échantillons de lait de chamelle corroborent les valeurs normales rapportées dans la littérature (**Farah, 1993 ; Konuspayeva & al., 2009**). Les variations observées dans la composition du lait de chamelle pourraient être attribuées à plusieurs facteurs tels que les conditions d'alimentation et les systèmes de production (**Nabag et al., 2006 ; Bakheit et al., 2008**), les saisons (**Haddadin et al., 2008, Konuspayeva et al., 2008**), les races, le stade de lactation, et le nombre de vêlages (**EIAmin et al., 2006, Zeleke, 2007, Konuspayeva et al., 2010**).

Musaad et al. (2013) ont conclu que la composition du lait de chamelle présentait une grande variabilité de ses constituants en fonction des facteurs physiologiques, génétiques et environnementaux.

De toutes les données présentées il est clair que la chamelle produit un lait nutritif pour la consommation humaine.

Néanmoins, le lait de chamelle est produit de façon traditionnelle, et est habituellement recueilli, manipulé et transporté dans de mauvaises conditions sanitaires. En outre, les troupeaux de chameaux bénéficient rarement des soins vétérinaires et, par conséquent, les mammites sont fréquentes chez les femelles allaitantes (**Obeid et al., 1996**). Cependant, le lait produit est susceptible de causer des intoxications alimentaires et les facteurs antimicrobiens naturels ne peuvent fournir qu'une protection limitée contre des pathogènes spécifiques et pour une courte période. Ce risque est plus élevé lorsque le lait est consommé à l'état cru, comme cela est couramment pratiqué par les éleveurs.

Les échantillons analysés étaient généralement fortement contaminés et les comptages microbiens étaient nettement variables selon les échantillons. Les moyennes du dénombrement, de la flore mésophile totale ($3,36 \times 10^5$ ufc/ml), et des coliformes totaux ($8,65 \times 10^4$ coliformes/ml) se rapprochent de celles rapportées par **Semereab & Molla, (2001)** (4×10^5 UFC/ml) ; **Sela. & al., (2003)** ($8.0 \times 10^4 - 5.3 \times 10^8$ UFC/ml), et **Younan, (2004)** ($10^3 - 10^5$ UFC/ml), et pour les coliformes de celles obtenues par **Tourette, (2002)** (3.55×10^4 coliformes /ml) ; **Benkerroum & al., (2003)** ($1.6 \cdot 10^4$ coliformes /ml) ; **Siboukeur, (2008)** a trouvé une moyenne un peu élevée (10^5 à 10^6 coliformes /ml).

En revanche, le résultat obtenu du dénombrement des levures et moisissures dans les échantillons du lait camelin ($1,34 \times 10^3$ UFC/ml) ne s'accorde pas avec ce qui a été cité dans les travaux de **Benkerroum & al., (2003)** (7.94×10 UF/ml), et d'**El-Ziney & Al-Turki, (2007)** (1×10^7 UF/ml) ceci peut être interpréter par le fait que le pH normal du lait de chamelle faisant prédominer des bactéries de celle des levures et moisissures (**El-Ziney & Al-Turki, 2007**).

Des études récentes ont montré que le lait de chamelle est une source naturelle des microorganismes probiotiques (**Al-Otaibi & al., 2013**). La microflore dominante et bénéfique dans le lait de chamelle représenté par les bactéries lactiques est une source biologique potentielle à utiliser dans la technologie laitière (**Khedid & al., 2009**). Les souches lactiques sont caractérisées par leur aptitude à transformer le lactose, à améliorer la digestibilité (**Weinberg & al., 2007**) et à préserver les produits laitiers fermentés (**Abdelbasset & Djamila, 2008**). Ils ont également été utilisés pour améliorer le goût, la texture et la viscosité dans la fabrication des produits laitiers (**Soukoulis & al.,**

2007). Les entérocoques sont des bactéries Gram positives et s'inscrivent dans la définition générale des bactéries lactiques (**Franz & al., 1999**).

Les entérocoques sont résistants au stress thermique et ont une bonne compétitivité spécifique dans l'environnement avec une microflore complexe, de sorte qu'ils peuvent facilement s'adapter au climat chaud qui prévaut dans les régions d'où la plupart de nos échantillons ont été prélevés. La présence des entérocoques peut également être la cause d'une mauvaise hygiène pendant la traite (**Khedid & al., 2009 ; Stiles & Holzapfel, 1997**). Pour de nombreux auteurs, la présence d'entérocoques témoigne d'une éventuelle contamination fécale et donc d'un risque pour les consommateurs, car bien que ces souches soient connues pour leur faible virulence, elles posent de sérieux problèmes de santé en raison de l'émergence de nombreuses souches résistantes aux antibiotiques (**Giraffa & al., 2000**).

Dans cette étude nous avons pu isoler cent-vingt-trois (123) isolats, L'utilisation du milieu CATC s'est révélée très efficace car aucune autre colonie à part les colonies d'entérocoques rouge ou rose n'apparaissait sur ce milieu confirmant sa sélectivité élevée pour les entérocoques (**Domig et al., 2003**). Les 123 isolats d'entérocoques sélectionnés à partir du milieu CATC étaient Gram positif et de forme cocci ou ovoïde.

L'analyse des résultats des tests physiologiques et biochimiques a été effectuée pour déterminer les caractéristiques qui sont habituellement considérées comme typiques pour le genre *Enterococcus*, tel que la croissance à 45 °C, 10 °C, pH 9,6 et 6,5% de NaCl, et de permettre une caractérisation préliminaire des isolats. Nos isolats ont donné les mêmes résultats des tests physiologiques qui permettent de les affilier tous au genre *Enterococcus* sans exception, alors que les résultats des tests biochimiques obtenus à partir du système API 20 STREP ont montré une certaine divergence entre les isolats, dont 78 (63,4%) isolats ont été identifiés comme *Enterococcus faecium*, 18 (14,6 %) comme *Enterococcus gallinarum*, 14 (11,4 %) comme *Enterococcus faecalis*, 7 (5,7 %) comme *Enterococcus avium*, 3 (2,4 %) comme *Aerococcus viridans*, 2 (1,6 %) comme *Streptococcus uberis*, et 1 (0,8 %) comme *Lactococcus lactis ssp lactis*.

Un certain nombre d'études sur la méthode API 20 STREP ont montré que la majorité des souches *E faecalis*, *E faecium*, *E avium* et *E durans* isolées d'origine clinique sont correctement identifiées (**Winston & al., 2004**). Cependant, parce que ce système a été développé avant les récentes modifications taxonomiques, certaines identifications peuvent être erronées, en particulier pour les espèces autres que *E faecalis* (**Maria & al., 2002**).

Bien que certaines caractéristiques phénotypiques du genre *Enterococcus* soient valables pour toutes les espèces entérocoques, bon nombre des espèces entérocoques récemment décrits présentent des écarts. De toute évidence, une identification fiable des entérocoques à l'échelle d'espèce et au niveau de la souche par des tests physiologiques et biochimiques apparaît souvent difficile. En plus d'être très long, ce type de travail donne des résultats qui, en termes d'identification taxonomique, ne correspondent pas toujours aux résultats obtenus par d'autres méthodes. Cependant, étant donné la variabilité des traits biochimiques et phénotypiques des entérocoques, les méthodes moléculaires sont essentielles pour une identification fiable et rapide.

L'analyse par SDS-PAGE des extraits protéiques entiers des cellules est utile pour distinguer clairement une multitude d'espèces de bactéries lactiques (**Descheemaeker & al., 2000**). Il est également possible avec cette technique de différencier et d'identifier les entérocoques d'origine alimentaire (**Merquior & al., 1994**).

Pour préciser l'identification de nos isolats, une analyse électrophorétique des protéines totales cellulaires a été réalisée. Les profils générés sont présentés dans la **figure 8**. Les résultats obtenus montrent des différences entre les résultats phénotypiques conventionnels, l'API 20 STREP et le profil SDS-PAGE.

Merquior & al. (1994) ont utilisé et évalué la méthode SDS-PAGE pour identifier des souches de référence d'*Enterococcus* d'origines humaine, animale et environnementale. Ils ont rapporté que chaque espèce d'*Enterococcus* avait un profil unique et distinguable. Cette technique permet l'étude comparative d'un grand nombre de protéines codées par une partie importante du génome, et par conséquent, a un potentiel très élevé pour mesurer les relations entre les isolats. Cependant, la limite de l'SDS-PAGE est qu'elle nécessite plusieurs souches de référence pour identifier précisément tous les isolats, le fait que nous n'avons pas suffisamment de souches de référence, notre étude s'est limitée à 23 isolats testés par cette méthode et une souche de référence *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Cette technique a ensuite été remplacé par la méthode ERIC-PCR,

Les séquences consensuelles intergéniques répétitives entérobactériennes (ERIC), également décrites comme des unités répétitives intergéniques, diffèrent de la plupart des autres répétitions bactériennes en étant distribuées dans les génomes de plusieurs espèces. Les séquences ERIC n'ont été trouvées que dans les régions intergéniques, apparemment seulement dans les régions transcrites. Le nombre de copies de la séquence ERIC varie d'une espèce à l'autre (**Hulton et al., 1991**),

Dans cette étude, nous avons utilisé des marqueurs ERIC afin d'amplifier l'ADN chromosomique des entérocoques isolés à partir du lait de chamelle ; nous avons également comparé le pouvoir discriminatoire de cette méthode avec les résultats obtenus par l'API 20 STREP. Les résultats obtenus par ERIC-PCR étaient reproductibles. Nos isolats ont donné des profils électrophorétiques contenant entre 2 à 8 amplicons avec des masses moléculaires allant de 0,1 Kpb à 2,5 Kpb (**figure 10**).

Les amorces utilisées dans l'ERIC-PCR ont généralement une longueur de 20 à 24 pb et cette technique donne des fragments d'ADN d'une taille de 0,5 à 5 kpb. Mais chez plusieurs espèces bactériennes où ERIC a été décrit, y compris les entérocoques, le nombre de copies des séquences répétitives, principalement ERIC, est limité et ces séquences sont également largement réparties dans tout le génome, avec des distances d'au moins 42 kbp (**Wilson et Sharp, 2006**). Par conséquent, il apparaît que les amorces se fixent au hasard et que l'amplification a lieu malgré les erreurs d'appariement, ce qui peut également expliquer le manque de reproductibilité de l'ERIC-PCR (**Meacham et al., 2003**). **Wei et al. (2004)** ont également signalé que les fragments amplifiés par leur protocole ERIC-PCR ne présentaient aucune similarité avec les séquences ERIC. Ceci indiquait que les amorces courtes pourraient se lier à des régions non spécifiques et probablement se lier arbitrairement.

Cette méthode nous a permis de regrouper nos isolats dans trois groupes, dont deux ont abouti à distinguer deux espèces ; *E faecalis* et *E faecium*, avec un troisième groupe hétérogène (*Enterococcus spp*) qui nécessite une identification approfondie.

Au cours des dernières décennies, on a soulevé un intérêt croissant en ce qui concerne l'utilisation des entérocoques ayant des propriétés technologiques et métaboliques souhaitables comme culture starter, culture adjuvante ou probiotiques, en raison de leur capacité à survivre et à rivaliser dans le tractus gastro-intestinal (**Franz & al., 2011 ; Martín-Platero & al., 2009**). Ce rôle bénéfique a conduit à l'inclusion des souches entérocoques dans certaines cultures starter (**Parente et al., 1989, Centeno et al., 1999, Menendez et al., 2004**).

Une certaine diversité des traits technologiques a caractérisé les entérocoques isolés dans notre étude.

La production d'acide est l'une des propriétés les plus pertinentes des cultures starter conduisant à une bonne coagulation du lait et évitant la croissance de microorganismes indésirables. Les résultats de la production d'acide lactique après des intervalles de croissance dans du lait écrémé à 37 °C sont montrés dans **le tableau (voir**

annexe). Le pH initial du lait était de 7,45. Nos souches n'arriveront pas à réduire le pH du lait écrémé durant les 18 h d'incubation de 0,9 unité de pH, ce qui signifie qu'elles ont une faible capacité d'acidification. Dans une étude plus systématique, **Villani & Coppola, (1994)** ont examiné la capacité acidifiante de 24 souches d'*E faecium* et de 60 souches d'*E faecalis* cultivées dans le lait écrémé pendant 6 h à 37 ° C. La plupart des souches pourraient réduire le pH du lait de seulement 0,4 à 0,8 unité, alors que les souches les plus acidifiantes appartenaient aux espèces *E faecalis*. Le potentiel acidifiant plus élevé d'*E faecalis* a également été confirmé par **Suzzi & al. (2000)**. Une bonne culture starter productrice d'acide réduira le pH du lait de sa valeur initiale de 6,6 à 5,3 en 6 h à 30 ° C (**Cogan & al., 1997**).

À cet égard, les isolats d'entérocoques pourraient être considérés comme des acidifiants lents ou moyens, comme indiqué ailleurs (**Sarantinopoulos & al., 2001**). Par conséquent, étant donné que l'un des objectifs de l'étude actuelle est d'isoler des entérocoques afin d'être utilisés dans la technologie laitière, seulement 18 des 123 souches qui ont montré une activité d'acidification acceptable ont été utilisées pour des recherches ultérieures. Pour plus d'explication, sur le pouvoir acidifiant des entérocoques voir **(II.5.1)** dans la synthèse bibliographique.

Le système protéolytique des entérocoques est essentiel pour une croissance optimale dans le lait par la libération d'enzymes protéolytiques. Les bactéries lactiques ont un système complexe de protéases et de peptidases, qui leur permettent d'utiliser la caséine de lait comme source d'acides aminés et d'azote. La variabilité intra et interspécifique de la protéolyse est communément rapportée aux isolats provenant des sources naturelles (**Franciosi & al., 2009**). L'activité protéolytique des isolats a été enregistrée par la présence d'un halo clair autour des colonies (résultat positif) sur la gélose YMA (Yeast Milk Agar) au lait écrémé à 10%, [77,8 %] des souches sélectionnées ont une activité protéolytique. L'activité protéolytique des souches comme critère de sélection pour La fabrication de laits fermentés peut ne pas être aussi cruciale que pour la production de fromage (c'est-à-dire l'évolution de la saveur pendant la maturation, et le développement des textures), mais les souches protéolytiques peuvent conduire à la formation de peptides à propriétés bioactives (antimicrobiens, antihypertenseurs) pendant la fermentation du lait (**Korhonen, 2009**). Pour plus d'information, voir **(II.5.2)**.

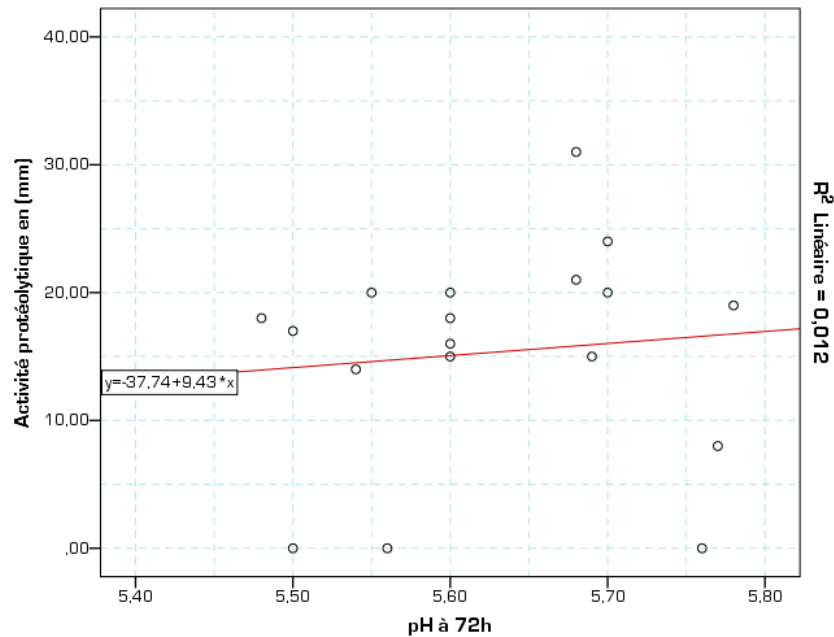


Figure 25 : Courbe de dispersion de l'activité protéolytique en fonction du pH calculé après 72 h d'incubation.

D'après la courbe de dispersion et le coefficient de corrélation de Pearson (0,107) calculé par le logiciel SPSS version 22.0, on n'a constaté aucune signification de corrélation entre l'activité protéolytique et la variation du pH de nos échantillons.

En ce qui concerne l'activité lipolytique des entérocoques, des données limitées et souvent contradictoires existent dans la littérature.

La lipolyse est un processus important principalement dans la maturation du fromage en raison de son rôle dans le développement du goût et de la texture du produit final (**Morandi & al., 2006**). Ceci est obtenu par hydrolyse enzymatique de triglycérides en acides gras, et qui peuvent être des précurseurs de composés aromatisants tels que des méthyl cétones, des alcools secondaires, des esters et des lactones. *E. faecalis* étant l'espèce la plus lipolytique, suivie par *E. faecium* et *E. durans* (**Giraffa, 2003**).

Les résultats obtenus dans cette étude ont confirmé que les souches d'entérocoques sélectionnées ont généralement une faible activité lipolytique, aucun des entérocoques testés ne donnant une zone. Une explication possible de l'absence d'activité lipolytique des souches testées est peut-être due à la composition différente des lipides du lait de chamelle par rapport à d'autres laits ou bien à la composition du milieu de culture utilisé pour rechercher cette activité. Contrairement à l'effet souhaitable de la lipolyse dans les fromages à pâte dure et les fromages à moisissures bleus, une lipolyse élevée dans des laits fermentés est indésirable. Par conséquent, la faible activité lipolytique des

entérocoques testés peut être considérée comme un avantage, car seule une légère lipolyse de la matière grasse du lait est suffisante pour induire une production d'arôme sans donner au produit final une saveur rance (**Herrero & al., 1996**). Voir (II.5.3).

En ce qui concerne la production des exopolysaccharides (EPS), la plupart des souches sélectionnées étaient capables de produire des EPS. La production d'EPS est considérée comme une caractéristique importante pour la sélection des bactéries lactiques, comme culture starter dans la technologie laitière, et en particulier dans les laits fermentés, puisqu'elles agissent en tant qu'épaississant, texturant ou stabilisant créant ainsi des produits crémeux lisses (**Parente & Cogan, 2004**). Outre leur rôle dans l'amélioration de la rhéologie des produits laitiers fermentés, les bactéries lactiques produisent probablement des EPS comme fonction protectrice dans leur environnement naturel, par exemple contre la dessiccation, la phagocytose, l'attaque des phages, le stress osmotique, les antibiotiques ou les composés toxiques (**Patel & Prajapat, 2013**).

En raison des risques de transmission des souches entérocoques potentiellement pathogènes dans la chaîne alimentaire et de leur contribution à la dissémination des facteurs de virulence et de résistance aux antimicrobiens, il a fallu évaluer non seulement leurs caractéristiques technologiques, mais aussi la sécurité des souches sélectionnés. D'après nos connaissances, cette étude fournit la première analyse détaillée sur l'écologie de la résistance aux antibiotiques et de la virulence chez les entérocoques isolés à partir du lait de chamelle cru produit en Algérie.

Ces dernières années, les entérocoques ont été impliqués dans les infections nosocomiales, et il est donc nécessaire d'évaluer les aspects de sécurité de ce groupe de microorganismes, notamment en ce qui concerne l'acquisition de nouveaux déterminants de la résistance aux antibiotiques, et en particulier la résistance aux glycopeptides.

Le test phénotypique de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé selon la méthode de diffusion en disque classique (méthode de diffusion sur disques Kirby-Bauer) recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI, 2014**).

En raison de la limitation des techniques utilisées pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques, certaines études ont été menées par **Lee et Chung (2015)**; **Edelmann et al. (2007)** et **Dickert & al. (1981)** pour déterminer la méthode la plus appropriée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et ils ont conclu que la méthode des disques est encore une technique valide et elle donne des résultats qui sont très similaires à d'autres techniques. Il est important de mettre au point une méthodologie facile à exécuter qui peut

être utilisée en routine au laboratoire, mais il faut tenir compte non seulement de la précision, mais aussi du coût et du volume du travail à réaliser.

Les entérocoques sont connus par leur acquisition d'une résistance à la plupart des antibiotiques utilisés dans la pratique clinique et d'être capable de diffuser ces gènes de résistance à d'autres espèces (**Kaçmaz et Aksoy, 2005**).

L'apparition de résistance aux antibiotiques chez les isolats d'origine laitiers semble être variable quelque peu d'une étude à l'autre et dépend souvent de la souche et de la région (**Čanžek et al., 2005**) ou peut être selon la méthode d'isolement (**Klein, 2003**).

La prévalence des entérocoques résistants aux antimicrobiens observés dans cette étude était inférieure à celle observée chez les autres animaux domestiques, cela peut être en partie attribué à l'utilisation d'antimicrobiens comme additifs alimentaires pour ces derniers (**Jung & al., 2007 ; Kwon & al., 2012 ; Hwang & al., 2009**). Les taux globaux de résistance et de multirésistance des entérocoques (26,83% et 4,8%, respectivement) détectés dans cette étude étaient également beaucoup plus faibles que ceux rapportés dans la littérature (**Singh, 2009**).

Nos résultats de sensibilité aux antibiotiques sont résumés dans les (**tableaux 31, 32, 33**). Les entérocoques sont considérés comme intrinsèquement résistants aux bêta-lactamines (**Lopes & al., 2005**). Les résultats obtenus dans la présente étude ne concordent pas avec cette généralisation, car 77 % des isolats testés étaient sensibles à l'ampicilline et 90 % à la pénicilline. D'autre part, il y a eu des études semblables à celles de nos résultats (**Valenzuela & al., 2010, Valenzuela et al., 2008, 2009**).

Il est aussi montré que 4%, 3%, et 2% de nos isolats entérocoques étaient résistants à, l'érythromycine (ERI), la tétracycline (TET) et la rifampicine (RIF) respectivement. Par contre **Teuber, et al. (1999)** ont trouvé respectivement 45% et 32% des isolats ayant une résistance à la tétracycline et à l'érythromycine, et ils ont conclu que la résistance des isolats d'*E. faecalis* à ces antibiotiques est une préoccupation majeure. **Tejedor et al., (2015)** ont isolé des entérocoques à partir des fèces des chameaux, et ils ont trouvé que 42,42% des isolats étaient résistants à la rifampicine.

La résistance à l'érythromycine comme représentant des antibiotiques macrolides est préoccupante. Bien que **De Fatima Silva Lopes & al. (2005)** ont rapporté qu'un pourcentage élevé de souches d'*E. Faecalis* (74%) avaient une susceptibilité intermédiaire ou une résistance à l'érythromycine. En Pologne **Wioleta Chajęcka-Wierzchowska et al.**

(2012) ont rapporté une prévalence supérieure de la résistance à la tétracycline (28,3% des souches isolées) à notre étude.

La résistance la plus répandue parmi les entérocoques laitiers dans la littérature était celle à la tétracycline qui a été détectée dans 30,8 % des souches, ce qui peut être attribué à l'utilisation généralisée et excessive de ces antibiotiques dans les pratiques vétérinaires **(Pieniz et al., 2015)**. **Huys et al. (2004)** ont également montré qu'une proportion significative des isolats résistants à la tétracycline présentaient une multiple résistance à l'érythromycine et/ou au chloramphénicol, ce qui suggère que la sélection des génotypes de résistance à la tétracycline peut fournir une base moléculaire appropriée pour la sélection supplémentaire des résistances multiples. Cependant, il convient de noter que la résistance à la tétracycline a peu d'importance clinique car il n'est pas un médicament de choix pour le traitement des infections humaines à entérocoque.

Bien que les entérocoques soient généralement considérés comme étant intrinsèquement résistants à de faibles taux de gentamicine, une résistance à la gentamicine de haut niveau a été détectée chez de nombreux isolats isolés du lait **(Giraffa, 2003 ; Hummel et al., 2007)**. 98 % des souches isolées dans notre étude étaient sensibles à la gentamicine.

L'émergence des entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) est une préoccupation majeure de santé. La vancomycine est considérée comme l'antibiotique du dernier recours pour traiter les infections graves dues aux bactéries Gram positives résistantes, et est administrée exclusivement dans un environnement clinique, lorsque tous les autres antibiotiques échouent. **(Naoual et al., 2010)**.

Il est important d'avoir une idée correcte sur la propagation des gènes de résistance à la vancomycine dans d'autres environnements que dans les environnements cliniques, notamment chez les entérocoques d'origine alimentaire car ce sont des microorganismes qui entrent en contact avec les microorganismes commensaux des humains, des animaux, avec ceux du sol, et des interfaces solides. Plusieurs études ont montré l'existence des entérocoques résistants à la vancomycine dans les aliments d'origine animale, en particulier les espèces *E. faecalis* et *E. faecium*, bien que la fréquence d'isolement semble être plus faible que dans les échantillons cliniques **(Klein, 2003)**. Une étude récente a montré que *E. faecium* d'origine animale peut facilement transférer des gènes de résistance à la vancomycine à la même espèce d'origine humaine dans le tractus gastro-intestinal des souris infectées, indiquant que la transmission des entérocoques

résistants, des animaux à l'homme devrait être gérée et surveillée pour ne pas menacer la santé humaine **(Moubareck & al., 2003)**.

L'apparition de la résistance des entérocoques aux glycopeptides, y compris la vancomycine et la téicoplanine, dans un grand nombre de pays développés, est attribuée à un double développement qui incluait l'utilisation clinique exorbitante des antibiotiques et la résistance croisée après l'utilisation de l'avoparcine comme promoteur de croissance animale **(Koluman et al.2009)**.

Dans notre cas, on a trouvé cinq (5) entérocoques résistants à la vancomycine qui représentent (4%) de toutes les souches isolées, dont trois (3) ont été identifiés comme *E faecium*, une (1) a été identifiée comme *E faecalis*, et une autre souche identifiée par l'API 20 STREP en tant que *Streptococcus uberis*. Selon **Morandi et al. (2006)** testant la sensibilité aux antibiotiques à la vancomycine par la méthode de diffusion sur disque fournissent des résultats similaires à ceux de la croissance dans du bouillon MRS contenant de la vancomycine.

Outre les analyses de susceptibilité à la vancomycine, les isolats sélectionnés ont été évalués pour la présence des gènes de résistance à la vancomycine. Les gènes *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2/3* ont été recherchés par PCR multiplex selon le protocole décrit par **Dutka-Malen et al., (1995)**, ce qui a entraîné la détection des gènes *vanA*, *vanB* et *vanC2/3* chez 24,24 %, 21,21 %, et 36,36 % des souches sélectionnées, respectivement, et l'absence du gène *vanC1*. Ainsi on a pu démontrer que les isolats phénotypiquement résistants à la vancomycine possédant les gènes de résistance. Pour le gène *vanA* deux isolats (S65, S69) identifiés par *ddl* en tant que *E faecalis*, pour le gène *vanB* deux isolats (S96, S115) une est identifiée comme *E faecium* et l'autre en tant que *S uberis*, et un isolat (S18) possède le gène *vanC2/3* identifié comme *E faecalis*. Comme on a signalé qu'il y a plusieurs isolats testés n'avaient pas de phénotype de résistance contiennent l'un des trois gènes déjà-cité (c.-à-d. que le gène de résistance existe dans ces isolats mais il n'est pas exprimé).

L'évaluation des gènes de résistance à la vancomycine dans les souches avec une utilisation possible dans l'alimentation animale est d'une importance capitale, puisque cet antibiotique n'est pas métabolisé par les animaux et reste sous forme active dans les intestins **(Yap et al., 2008)**.

La résistance à la vancomycine au sein des entérocoques d'origine laitiers reste controversée, bien que plusieurs études indiquent une très faible ou aucune occurrence des gènes de résistance *vanA* et *vanB* dans le génome des entérocoques isolés à partir de

fromage (**Jurkovic et al., 2006**). Dans un autre document, le gène *vanA* a été détecté chez 37% des entérocoques isolés du lait, mais tous étaient phénotypiquement sensibles à la vancomycine (**Ribeiro et al., 2007**). En Egypte, est pour la première fois des souches entérocoques résistantes à la vancomycine ont été découvertes dans des aliments d'origine animale (**Hammad et al., 2015**).

L'occurrence des gènes de résistance aux antibiotiques dans les microorganismes isolés du lait de chamelle jusqu'à présent n'a pas fait l'objet d'une étude systématique. Or la découverte dans cette étude des entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) dans le lait de chamelle nous a surpris, sachant que cet animal survit dans des zones éloignées de la zone urbaine. Les pasteurs des chameaux sont des nomades qui se déplacent dans une vaste région, et peuvent être le vecteur des entérocoques résistants à la vancomycine, il est possible que ces pasteurs portent des souches résistantes à la vancomycine, car ils sont le seul contact entre les centres urbains et les zones de pâturage où se trouvent les chameaux. Ou bien les entérocoques résistants isolés à partir du lait de chamelle sont intrinsèquement résistants à la vancomycine ce qui a été prouvé pour l'isolat S18 un *E faecalis* d'après l'identification par *ddl* et qui possède le gène de résistance *vanC2/3*. Neuf types de résistance aux glycopeptides ont été décrits chez les entérocoques : huit sont acquis (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* et *vanN*) et un, *vanC* est une propriété intrinsèque de *E casseliflavus*, *E gallinarum* et *E flavescens* (**Lebreton et al., 2011 ; Mayers, 2009**). Une ambiguïté qu'on a soulevée à propos de l'isolat S18, c'est que le gène *vanC2/3* n'est pas une propriété intrinsèque de l'espèce *E faecalis* !

La recherche des facteurs de virulence chez les entérocoques, et en particulier ceux isolés à partir des sources alimentaires, par des méthodes moléculaires et phénotypiques est nécessaire, en raison du risque de transfert génétique, car ces gènes sont d'habitude localisés sur des plasmides conjugués (**Eaton & Gasson, 2001**). La présence des facteurs de virulence dans les entérocoques peut grandement contribuer à augmenter la sévérité des infections nosocomiales. En se basant sur les tests phénotypiques de la recherche de la gélatinase et du type d'hémolyse, nous avons sélectionné des isolats afin de les tester pour la présence des gènes codant des facteurs de virulence potentiels. Les résultats sur les gènes de virulence sont représentés dans le **tableau 36**.

Selon les tests phénotypiques, seulement 10 sur 123 isolats présentaient une β -hémolyse. En outre, l'activité gélatinase a été détectée dans 18,7% des isolats, conformément aux résultats obtenus par **Eaton & Gasson, (2001)** et **Fisher & Phillips,**

(2009). L'activité de la gélatinase est principalement médiée par le produit du gène *gelE*. En effet, nous avons trouvé que la plupart des isolats gélatinase positive possèdent le gène *gelE*.

Onze isolats (42,3 %) étaient positifs pour le gène *gelE*, alors que sept (7) isolats ne produisaient pas de gélatinase dans les tests phénotypiques, ce qui est courant comme il a été signalé **(Eaton & Gasson, 2001, Mannu et al., 2003)**. Selon **Eaton et Gasson (2001)**, la perte d'activité gélatinase au cours des tests in vitro peut être attribuée à la forte influence de l'expression du gène *gelE* par les conditions environnementales et de culture en laboratoire. De plus, la présence du gène *gelE* pourrait ne pas être suffisante pour l'activité gélatinase, car l'opéron complet *fsr* semble être nécessaire pour son expression **(Lopes & al., 2006)**.

L'activité de la gélatinase est l'un des mécanismes de virulence la plus inquiétante des entérocoques. Car la gélatinase contribue au développement de l'endocardite et réduit l'affinité des neutrophiles au site d'infection par le clivage du complément d'anaphylatoxine C5a **(Thurlow & al., 2010)**. Cependant les gènes *gelE*, *esp*, et *asa1* ont été proposés pour être corrélés avec la capacité des entérocoques de former des biofilms **(Kristich & al., 2004 ; Tendolkar & al., 2004)**.

La présence des gènes impliqués dans la production d'hémolysine/cytolysine est considérée comme un facteur de risque. En ce qui concerne le gène *cyfA*, seuls 2 (7,7 %) isolats ont donné un résultat positif, mais selon des tests phénotypiques, une β -hémolyse a été observée chez 10 isolats. Le *cyf* peut être considéré comme un gène silencieux où son expression génique peut être influencée par les facteurs environnementaux et les conditions utilisées pour les tests phénotypiques **(Eaton & Gasson, 2001)**. Le transfert de l'opéron codant la cytolysine entre les souches peut se produire puisque cet opéron est situé sur des plasmides transmissibles et un îlot de pathogénicité mobile **(Van Tyne & al., 2013)**. L'expression de la cytolysine nécessite la fonctionnalité de huit gènes : *cyfLL* et *cyfLS*, qui codent pour les peptides structurels de cytolysine, *cyfM*, *cyfB*, *cyfA* et *cyfI*, qui codent pour les protéines responsables des modifications post-traductionnelles des peptides (sécrétion, activation extracellulaire, et l'immunité) et *cyfR1* et *cyfR2*, qui sont des régulateurs de l'expression de la cytolysine **(Cox et al., 2005)**. Un autre aspect à considérer est que l'opéron cytolysine pourrait être transcrit à de faibles niveaux en absence d'induction, comme dans le cas des tests in vitro. **Van Tyne et al. (2013)** ont déjà décrit la transcription de la cytolysine comme un système complexe fortement influencé par les conditions environnementales de la culture. *E. faecalis* et *E. faecium* isolés à partir

des aliments ont déjà été décrits comme capables de produire de la cytolysine, bien que cette caractéristique soit plus fréquente dans les isolats cliniques (**Eaton & Gasson, 2001**).

Le gène *esp*, est lié à la production de différentes substances impliquées dans la colonisation et l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques, et à l'évasion du système immunitaire de l'hôte. Le gène *esp* a été retrouvé dans 15,4 % des isolats sélectionnés. En outre, huit (30,8 %) isolats ont donné un résultat positif pour *hyl*, lié à la production d'hyaluronidase qui facilite la propagation des toxines et des bactéries à travers le tissu de l'hôte en provoquant des lésions tissulaires, et peut également interagir avec des récepteurs lymphocytaires induisant des maladies immunes (**Girish & Kemparaju, 2007; Sousa, 2003**).

La substance d'agrégation *asa1* a été détectée dans 12 isolats (46 %). *Asa1* est une protéine de surface codée par un plasmide répondant aux phéromones sexuelles, et elle favorise le transfert conjugué de ces plasmides par formation d'agrégats d'accouplement entre les cellules donneuse et receveuse. Les protéines *Asa1* ont été impliquées dans la liaison aux composantes de la matrice extracellulaire (CMEs), telles que la fibrine, la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine et le collagène de type I (**Rozdzinski & al., 2001**)

En guise de conclusion, le lait de chamelle est un écosystème très riche qui devrait être valorisé. En outre, il y a eu très peu d'études systématiques pour étudier la résistance acquise des antibiotiques chez les entérocoques du lait de chamelle.

Malgré que cette étude eût une limitation au niveau de la provenance et du nombre d'isolats testés, et donc certaines corrélations n'ont probablement pas pu être observées, elle est la première dans son genre, car elle a fourni la première caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir du lait de chamelle prélevé dans la région sud-ouest de l'Algérie. Nos résultats indiquent que 61% des isolats parmi ceux sélectionnés pour l'étude technologique, ont montré des performances technologiques intéressantes, et parmi ces isolats technologiquement importants 54,5% possèdent au moins un facteur de résistance ou de virulence. Ainsi on a détecté parmi nos isolats ceux qui peuvent contenir de la multirésistance aux antibiotiques (2 à 4) dont celles envers la vancomycine, et l'ampicilline étant la combinaison la plus commune.

Ces données supportent également l'importance d'une utilisation prudente des antibiotiques en médecine vétérinaire afin d'éviter la dissémination zoonotiques des isolats pathogènes. D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre l'origine de la

propagation de ces agents pathogènes. En dépit que l'occurrence des entérocoques résistants à la vancomycine dans le lait de chamelle soit très faible, mais elle doit être abordée par les programmes de surveillance nationaux afin d'explorer l'importance du réservoir animal dans l'évolution de la résistance des entérocoques.

V. Conclusion générale

Conclusion

Les nomades du Ahaggar au Sahara dépendent presque entièrement du lait pour leur subsistance, ils ont un dicton : « l'eau est l'âme ; le lait est la vie ». Le lait est donc précieux dans les régions touchées par la sécheresse, où aujourd'hui des millions de personnes sont au bord de la famine.

Dieu le Tout-Puissant, nous a « donné » le lait de chamelle pour être utilisé dans les zones arides et dures du monde où la faim est répandue. C'est une excellente source de nutriments et de fluides. Outre ce lait, constitue aussi un écosystème très favorable pour différents types de microorganismes, et il est susceptible de causer des maladies d'origine alimentaire et les facteurs antimicrobiens naturels du lait de chamelle ne peuvent fournir qu'une protection limitée contre de pathogènes spécifiques et pour une courte période. Ce risque est plus élevé lorsque le lait est consommé à l'état cru, comme cela est couramment pratiqué par les peuplades nomades. Les entérocoques avec leurs capacités d'adaptation et de résistance, retrouve dans le lait de chamelle un milieu propice pour leur prolifération.

Parlons des entérocoques, en parlant d'une situation paradoxale, car d'un côté et depuis des siècles, ce microorganisme procaryote a été utilisé dans la transformation des aliments, considéré comme bactérie lactique il a été inclus dans des cultures starter, et utilisé comme culture adjuvante, et même comme probiotique, de l'autre côté il est considéré comme un pathogène opportuniste, et il a reçu ces dernières années une attention considérable dans la bactériologie médicale en raison de son rôle croissant dans les infections nosocomiales. Un facteur important contribuant à ce phénomène a sans aucun doute été sa résistance naturelle (intrinsèque) et acquise aux antibiotiques fréquemment utilisés.

Cette étude avait comme objectif essentiel une caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle, pour arriver enfin à comprendre cette situation paradoxale des entérocoques. Malgré que cette étude eût une limitation au niveau de la provenance et du nombre d'isolats testés, et donc certaines corrélations n'ont probablement pas pu être observées, nous avons obtenu les résultats suivants :

- ☞ L'analyse physicochimique de lait de chamelle a montré que les paramètres physicochimiques étaient presque similaires à ceux du lait de vache sauf pour le taux des protéines qui était inférieur, et sa teneur en matière sèche réduite par rapport à celle des laits d'autres espèces.

- ⌘ L'analyse microbiologique a révélé le niveau de contamination un peu élevé est variable d'un échantillon à l'autre du lait de chamelle.
- ⌘ L'isolement des entérocoques a abouti à la collecte de 123 souches appartenant au genre *Enterococcus*.
- ⌘ L'identification biochimique par l'API 20STREP a permis de regrouper les isolats en sept espèces à savoir : *E. faecium* 63,4 % (n=78), *E. faecalis* 11,4 % (n=14), *E. gallinarum* 14,6 % (n=18), *E. avium* 5,7% (n=7), *Aerococcus viridans* 2,41% (n=3), *Streptococcus uberis* 1,6 % (n=2), *L. lactis ssp lactis* 0,8% (n=1).
- ⌘ Par contre l'utilisation de la méthode moléculaire (ERIC-PCR) a permis de distinguer trois groupes phylogénétiquement distincts, dont deux sont bien identifiés en tant que *E faecium* (52 isolats) et *E faecalis* (22 isolats), et le troisième groupe *Enterococcus spp* très hétérogène, nécessite des analyses approfondies.
- ⌘ L'étude des aptitudes technologiques des isolats sélectionnés a démontré que 61% des isolats avaient des performances technologiques intéressantes, et parmi ces isolats technologiquement importants 54,5 % possèdent au moins un facteur de résistance ou de virulence, pour la plupart des isolats ces activités technologiques se sont exprimées d'une manière très hétérogène et ceci n'a pas permis de classer et de ressortir celles qui sont plus performantes, et de présenter également une discriminatoire assez puissante pour trier et élire la ou les souches les plus performantes parmi un ensemble de souches montrant des profils d'intérêts technologiques.
- ⌘ L'étude de la susceptibilité aux antibiotiques a révélé que la plupart des souches isolées étaient sensibles, cependant nous avons enregistré des cas de résistance à tous les antibiotiques testés ; (8 %, 5%, 4 %, 4 %, 3 %, 2 %, 2 % pour la pénicilline, l'ampicilline, l'érythromycine, la vancomycine, la tétracycline, la gentamicine, et la rifampicine respectivement) ; ainsi nous avons détecté six souches multirésistantes à au moins deux antibiotiques.
- ⌘ La recherche des déterminants génétiques de la résistance à la vancomycine : *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2/3* par la technique de la PCR multiplex selon le protocole décrit par **Dutka-Malen et al., (1995)**, a abouti à la détection des gènes *vanA*, *vanB* et *vanC2/3* chez 24,24 %, 21,21 %, et 36,36 % des souches sélectionnées, respectivement, et l'absence du gène *vanC1*. Ainsi on a pu démontrer que les isolats phénotypiquement résistants à la vancomycine possédant les gènes de résistance.
- ⌘ La recherche des déterminants génétique de la virulence ; *asa1*, *gelE*, *esp*, *hyl*, *cylA* a rendu compte que sur les 26 souches sélectionnées et testées 17 (65,4 %)

avaient au moins un facteur de virulence, et que le déterminant génétique de virulence *asa1* avec une fréquence de 46 % soit le facteur prédominant parmi les cinq facteurs étudiés., suivi par le facteur *gelE* (42,3 %), puis *hyl* (30,8 %), *esp* (15,4 %), et d'une moindre fréquence *cyfA* (7,7 %). On a observé aussi qu'il y avait une corrélation significative entre la multirésistance des souches et l'acquisition des facteurs de virulence, la souche S18 étant un exemple concret.

En fin de compte, il est important de rappeler l'importance nutritionnelle du lait de la chamelle en tant qu'aliment précieux dans les zones arides et désertiques, et en tant que réservoir de microorganismes d'intérêt technologique ou sanitaire, et il est très important de maintenir le contrôle et la surveillance de la résistance aux antibiotiques au niveau phénotypique et génotypique.

Perspectives

Ce projet pourra avoir comme perspectives :

- ☞ Elargir le nombre des échantillons et des isolats pour permettre d'établir toutes les corrélations possibles, et de répondre ainsi aux différentes questions concernant l'utilisation des entérocoques dans l'alimentation humaine et animale.
- ☞ Utiliser d'autres techniques moléculaires d'identification, pour identifier correctement et avec précision tous les isolats d'entérocoques.
- ☞ Caractériser les gènes de résistance et de virulence détectés dans cette étude par le séquençage.
- ☞ Localiser les gènes de virulence et de résistance s'ils sont chromosomiques ou portés sur des plasmides, et s'il le fallait une caractérisation de ces plasmides.
- ☞ Faire un screening des autres facteurs de risques impliqués dans la virulence et la résistance des entérocoques isolés de lait de chamelle.
- ☞ Tester la pathogénicité des isolats virulents et résistants sur des modèles animale, et étudier la possibilité du Transfer horizontal de ces déterminants génétiques entre des espèces microbiennes des origines différent (par exemple animal/homme).
- ☞ Exploiter les souches inoffensives qui sont technologiquement performantes, en étudiant leur comportement dans différentes matrices alimentaires.
- ☞ Amasser une plus grande collection de souches cliniques humaines et animales afin d'effectuer une analyse comparative plus approfondie. Les souches collectées devront avoir des éléments permettant d'extrapoler un lien potentiel tels que la région, l'hôte, la date et l'origine d'isolement (souche commensale, environnementale, alimentaire ou clinique).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abdelbasset, M. & Djamila, K. (2008)**. Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb". *Afr. J. Biotechnol.* 7: 2908-2914.
2. **Abdelgadir, W., Nielsen, D.S., Hamad, S. & Jakobsen, M. (2008)**. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius subsp. Infantarius*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 215-219.
3. **Abdelguerfi, A., Ramdane, M. S. A., (2003)**. Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture bilans des expertises. Bilans des Expertises sur « La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31.
4. **Abu-Lehia, I. H., (1994)**. Recombined camel's powder. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
5. **Abu-Taraboush, H.M., Al-Dagal, M.M., Al-Royli, M.A., (1998)**. Growth, viability, and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.* 81, 354-361.
6. **ACNFP., (1996)**. Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. MAFF Advisory Committee on Novel Foods and Processes, Report, Ergon House c/o Nobel House, 17 Smith Square, London SW1 3JR, UK.
7. **AFNOR., (1996)**. Analyses microbiologiques. Tome I : Méthodes horizontales, contrôle de qualité des produits alimentaires. ISBN 2-12-190861-1.
8. **AFNOR., (1980)**. Lait. Détermination de la matière sèche. NF V04 207, In AFNOR (Ed.), Recueil de normes françaises. Laites et produits laitiers. Méthodes d'analyse. Paris : Normalisation française. P. 33-34. De qualité des produits alimentaires. ISBN 2-12-190861-1.
9. **AFNOR, (1986)**. Fromages, détermination de la matière sèche (méthode par étuvage). NF V04 282, in : AFNOR (Ed.), Recueil de normes françaises. Laites et produits laitiers. Méthodes d'analyse, Paris La Défense. P 104-105.
10. **Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., et al. (2010)**. Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie [synthèse bibliographique]. *J of microbiological methods*, vol. 16, no. 1, p. 89-105.
11. **Alborn, W. E, Jr., Allen, N. E., Preston, D. A. (1991)**. Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ;35(11):2282-2287. [PubMed: 1666494]
12. **Alloui-Lombarkia, O., Ghennam, E.H., Bacha, A., & Abededdaim, M. (2007)**. Caractéristiques physicochimiques et biochimiques du lait de chamelle et séparation de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamides. Laboratoire de Technologie Alimentaire, Dépt. D'Agronomie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Algérie. p 108.
13. **Al-Otaibi, M. M., Al-Zoreky, N. S. & El-Dermerdash, H. A. (2013)**. Camel's milk as a natural source for probiotics. *Res. J. Microbiol.* 8: 70-80.

14. **Alou H., (1985).** Contribution à l'étude de l'élevage camelin au Niger: situation actuelle, proposition d'amélioration, perspectives d'avenir. Thèse: Méd. Vét. : Dakar; 10.
15. **Andersen RN, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE., (1993).** Cloning of the *Streptococcus gordonii* PK488 gene, encoding an adhesin which mediates coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK606. *Infect Immun*;61(3):981-987. [PubMed : 8432618]
16. **Andrewes F., Horder TJ., (1906).** A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* 1906 ;ii:708-13.
17. **Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., (2001).** Phenotypic and genetic diversity of *Enterococci* isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research* 68, 303- 316.
18. **Arbeloa A., Segal H., Hugonnet J. E., Josseaume N., Dubost L., Brouard J. P., et al., (2004).** Role of class A penicillinbinding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*;186(5):1221-1228. [PubMed: 14973044]
19. **Arduino, RC., Murray, BE., Rakita, RM., (1994).** Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of *Enterococci*. *Infect Immun*;62(3):987-993. [PubMed: 8112874]
20. **Arias CA, Murray BE., (2012).** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*;10(4):266-278. [PubMed: 22421879]
21. **Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P., (1997).** Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus spp.* isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology* 38, 17- 24.
22. **Ashmaig, A., Hasan, A. & El Gaali, E., (2009).** Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *African Journal of Microbiology Research* 3, 451-457.
23. **Aslangul, E., Massias, L., Meulemans, A., Chau, F., Andremont, A., Courvalin, P., & al., (2006).** Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50(11):3615-3621. [PubMed: 17065620]
24. **Ayad, E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., & El-Soda, M. (2004).** Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21, 715e725.
25. **Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, LS., Hugas, M., Garriga, M., Nes, IF. (1996).** Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* ;62(5):1676-1682. [PubMed : 8633865]
26. **Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D., Kihal, M., (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21, 579-588.
27. **Bakheit, S. A., Majid, A. M. & Abu-Nikhila, A. M. (2008).** Camels (*Camelus dromedarius*) under pastoral systems in North Kordofan, Sudan: Seasonal and parity effects on milk composition. *J. Camelid Sci.* 1:32-36.

28. **Balla, E., Dicks, LM., Du Toit, M., Van Der Merwe, MJ., Holzapfel, WH. (2000).** Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol*;66(4):1298–1304. [PubMed: 10742203]
29. **Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K.H. (1992).** The prokaryotes second Ed – vol 11. Springer Verlage, New York.
30. **Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Frerisch, W.M. & Al-Nakhli, H.M. (1984).** Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: relation to whey lysozyme and stage of lactation. *Journal of Food Protection* 47, 838–840.
31. **Bayoumi, S. (1990).** Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *K. Milchwirtschaftliche Forsch.*, 42, 3-8.
32. **Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Perez-Pulido, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A. (2004).** Functional and safety aspects of *Enterococci* isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 118–130.
33. **Ben-Aissa, M., (1989).** Le dromadaire en Algérie. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires (02)*, 19-28.
34. **Bengoumi, M., Faye, B., Tressol, J.C. (1994).** Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
35. **Benguedouar A., (2000).** Etude de la symbiose : Rhizobium; Essai de la caractérisation de l'espèce Rhizobium *Hedysarum coronarium*. Thèse de doctorat; université de Constantine. Algérie.
36. **Benkerroum, N., Boughdadi, A., Bennani, N. & Hidane, K. (2003).** Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 645–648.
37. **Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G S., Hammerschmidt, S., (2004).** Characterization of plasmin[ogen] binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J Med Res* 119 Suppl:29-32.
38. **Billström H, Sullivan A, Lund B. (2008).** Cross-transmission of clinical *Enterococcus faecium* in relation to esp and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*;105(6):2115–2122. [PubMed: 19120657]
39. **Birri, DJ., Brede, DA., Forberg, T., Holo, H., Nes, IF. (2010).** Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol*;76(2):483–492. [PubMed: 19933345]
40. **Bockelmann, W., (2002).** Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *Int. Dairy J.* 12, 123–131.
41. **Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.-G., Siezen, R.L., Hatter, K.L., Gilmore, M.S., (1996).** Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Molecular Microbiology* 21, 1175–1184.
42. **Bourgogne, A., et al., (2007).** EbpR is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (ebpABC) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol.* 189(17): p. 6490-3.
43. **Bourgogne, A., Hilsenbeck, SG., Dunny, GM., Murray, BE., (2006).** Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr

- system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. J Bacteriol;188(8):2875–2884. [PubMed: 16585749]
44. **Busani, L., & al., (2004)**. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant *Enterococci* isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. Int J Food Microbiol., 97(1): p. 17-22.
45. **Byappanahalli, M., Fujioka, R., (2004)**. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. Water Sci Technol;50(1):27–32. [PubMed: 15318482]
46. **Canepari, P., Lleò, M. M., Cornaglia, G., Fontana, R., Satta, G., (1986)**. In *Streptococcus faecium* penicillin-binding protein 5 alone is sufficient for growth at sub-maximal but not at maximal rate. Microbiology;132(3):625–631. [PubMed: 3734749]
47. **Čanžek Majhenič, A., Rogelj, I., Perko, B. (2005)**. *Enterococci* from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. Int. J. Food Microbiol. 102:239-244.
48. **Carrasco de Mendoza, M.S., Scarinci, M.S., Huerto-Garat, H.E., Simonetta, A.C., (1992)**. Technological properties of *Enterococci* in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. Microbiologie, Aliments, Nutrition, 10, 289–293.
49. **Casalta, E., Zennaro, R., (1997)**. Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco, a Corsican soft cheese. Sciences des Aliments 17, 79–94.
50. **Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernáñez, P.E., Holo, H., (1997)**. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology 143, 2287–2294.
51. **Cauvet C., (1925)**. Le Chameau : anatomie, physiologie, race, extérieur, vie et mœurs, élevage, alimentation, maladies, rôle économique. -Paris: IB. Baillière et fils. 947p.
52. **Centeno, J.A., Menendez, S., Hermida, M.A., Rodríguez-Otero, J.L., (1999)**. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology 48, 97–111.
53. **Chander, H., Ranganathan, B., Singh, J., (1979b)**. Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. Journal of Food Science 44, 1747–1751.
54. **Chandler, JR., Hirt, H., Dunny, GM., (2005)**. A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A;102(43): 15617–15622. [PubMed: 16223881]
55. **Choisy, C., Desmazeaud, M., Guéguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J. L & Tourneur, C., (1997)**. Les phénomènes microbiens. In : Le fromage (Eck A. et Gillis J.C.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 377-446.
56. **Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F., (1997)**. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl Environ Microbiol;63(11):4321–4330. [PubMed: 9361419]
57. **Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., et al., (2000)**. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50

- produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol*;182(23):6806–6814. [PubMed: 11073927]
58. **Cintas, LM., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, PE., Nes, IF., Håvarstein, LS., (1998).** Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol*;180(8):1988–1994. [PubMed: 9555877]
59. **Clewell, DB., (1981).** Plasmid, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol Rev*;45(3):409–436. [PubMed: 6272080]
60. **Clewell, DB., (1990).** Movable genetic elements and antibiotic resistance in *Enterococci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;9 (2):90-102.
61. **Clewell, DB., (1993).** Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*; 73:9-12. [PubMed: 8462105]
62. **Clewell, DB., Dunny, GM., (2002).** Conjugation and genetic exchange in *Enterococci*. In M. S. Gilmore (Ed.), *The Enterococci : Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (pp. 209-213). Washington D. C.: ASM Press
63. CLSI, 2014
64. **Coburn, PS., Gilmore, MS., (2003).** The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol*;5(10):661–669. [PubMed: 12969372]
65. **Coburn, PS., Pillar, CM., Jett, BD., Haas, W., Gilmore, MS., (2004).** *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* ; 306(5705):2270-2272. [PubMed: 15618522]
66. **Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandez, I., Gomez, J., Gomez, R. et al. (1997).** Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64, 409–421.
67. **Collins, M.D., Jones, D. Farrow, J.A.E. Kilpper-Balz R. and Schleifer. K.H. (1984).** *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov., *Enterococcus casseliflavus* nom. rev. comb. nov., *Enterococcus durans* nom. rev., comb. nov., *Enterococcus gallinarum* comb. nov., and *Enterococcus malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 220–223.
68. **Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., (2003).** Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13, 841–866.
69. **Coppola, T.M., Parente, J.E., Dumontet, S., La Peccerella, A., (1988).** The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait* 68, 295–310.
70. **Coque, T. M., Patterson, J. E., Steckelberg, J. M., Murray, B. E. (1995).** Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among *Enterococci* isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *Journal of Infectious Diseases* 171:1223–1229
71. **Coque, Patterson, Steckelberg, et Murray, 1995 Coque, T.M., Patterson, J.E., Steckelberg, J.M. & Murray, B.E. (1995).** Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among *Enterococci* isolated from patients with endocarditis

- and other infections and from the feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* 171, 1223–1229.
72. **Cotter, PD., Hill, C., Ross, RP., (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* ;3(10):777–788. [PubMed: 16205711]
73. **Cox, CR., Coburn, PS., Gilmore, MS., (2005).** Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*;6(1):77–84. [PubMed: 15638770]
74. **Coyne V. E., James M.D., Reid S.J., Rybicki E.P., (2002).** SDS polyacrylamide gel electrophoresis [SDS-PAGE]. *Molecular Biology Techniques Manual*. Third Edition. University of Cape Town.
75. **Criado R, Diep DB, Aakra A, Gutiérrez J, Nes IF, Hernández PE, et al. (2006).** Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl Environ Microbiol*;72(10): 6653–6666. [PubMed: 17021217]
76. **Cross, C. E., & al., (1987).** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 107(4) : p. 526-45.
77. **Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa Í, Penadés JR. (2001).** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* ;183(9) :2888–2896. [PubMed: 11292810]
78. **Cuq, J. L. (2007).** Microbiologie alimentaire contrôle microbiologique des aliments. Polytech département STIA, Université Montpellier.P 2, 119.
79. **Curasson, G., (1947).** Le chameau et ses maladies. Paris, Vigot frères, 462 p.
80. **Daget, P., & Lhoste, P. (1995).** Ethnologie Animale. In : Pastoralisme, Troupeaux, Espaces et Sociétés, Editions Hatier, Paris.
81. **Dahlberg, A.C., Kosikowski, F.V., (1948).** The development of flavor in American Cheddar cheese made from pasteurised milk with *Streptococcus faecalis* starter. *J. Dairy Sci.* 31, 275–284.
82. **De Fatima Silva Lopes, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., Crespo, M. T. (2005).** Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of *Enterococci*. *Int. J. Food Microbiol.* 103:191-198.
83. **De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, CA., Dicks, LM., (2006).** Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl Environ Microbiol*;72(7):4761–4766. [PubMed:16820469]
84. **De Vuyst, L., Avonts, L., Makras, E., (2004).** Probiotics, prebiotics and gut health (Chap.17). Remacle, C., Reusens, B. (Eds.), *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom, pp. 416–482.
85. **De Vuyst, L., Vandamme, EJ., (1994).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics, and applications. London: Blackie Academic and Professional.
86. **Del Campo, R., Tenorio, C., Jiménez-Díaz, R., Rubio, C., Gómez-Lus, R., Baquero, F., Torres, C., (2001).** Bacteriocin production in vancomycin resistant and vancomycin-

- susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45, 905–912.
87. **Del Papa, M., Hancock, L., Thomas, V. & Perego, M., (2007).** Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. J. Bacteriol., 189(24), 8835-8843.
88. **Delgado, S., Delgado, T., Mayo, B. (2002).** Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. J. Food Prot., 65, 1590–1596.
89. **Desmazeaud, M. J., & De Roissard, H. (1994).** Métabolisme général des bactéries lactiques ; in : « Bactéries Lactiques I », Tech. Doc., Lavoisier, Paris.
90. **Devriese, L.A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K. & Haesebrouck, F. (1995).** Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 26: 187–197.
91. **Devriese, L., Baele, M., Butaye, P. (2006).** The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria. Dworkin P D M, editor.LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Springer Science+Business Media. pp. 163-174.
92. **Devriese, L. A., Hermans, K., Baele, M., & Haesebrouck, F., (2009).** *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. Vet. Microbiol. 133:206-7.
93. **Dezwaan, DC., Mequio, MJ., Littell, JS., Allen, JP., Rossbach, S., Pybus, V., (2007).** Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. Microb Ecol Health Dis;19(4):241–250. [PubMed: 19578555]
94. **Diallo, B.C. (1989).** L'élevage du dromadaire en Mauritanie. Options Méditerranéennes. 2 : 29-32.
95. **Dickert, H., Machka, K., & Braveny, I. (1981).** The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. Infec. 9:18-24.
96. **Domig, K. (2003).** Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 1. Media for isolation and enumeration. Int. J. Food Microbiol. 88:147-164.
97. **Dona & al., (2012)**
98. **Dovat, A.M., Reinbold, G.W., Hammond, E.G., Vedamuthu, E.R., (1970).** Lipolytic and proteolytic activity of *Enterococci* and lactic acid group streptococci isolated from young Cheddar cheese. J. Milk Food Technol. 33, 365– 372.
99. **Drici, H., Gilbert, C., Kihal, M., & Atlan, D., (2010).** Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. Journal of Applied Microbiology 108, 647–657.
100. **DSA, (2012).** Direction des services agricoles, wilaya de Bechar. Algérie.
101. **Dunny, G.M., Leonard, B.A., & Hedberg, P.J. (1995).** Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and host-parasite chemical communication. J. Bacteriol. 177, 871–876.
102. **Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. And Litopoulou-Tzanetaki, E., (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. J. Appl. Microbiol. 91, 861–870.

103. **Dutka-Malen, S., Evers, S., & Courvalin, P. (1995).** Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33,24e27.
104. **Eaton, T.J. & Gasson, M.J., (2001).** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635.
105. **Eaton, T.J. & Gasson, M.J., (2002).** A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*, distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 269–275.
106. **Edelmann, A., Pietzcker, T., Wellinghausen, N. (2007).** Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J. Med. Microbiol.* 56:202-207.
107. **Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, SH., et al., (2001).** Isolation and Characterization of Enterocin SE-K4 Produced by Thermophilic *Enterococci*, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci Biotechnol Biochem*;65(2):247–253. [PubMed: 11302155]
108. **El Soda, M., Law, J., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G., (1995).** Lipolytic activity of cheese related microorganisms and its impact on cheese flavour. In: Charalambous, G. (Ed.), *Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence*. Elsevier Science, London, United Kingdom, pp. 1823–1847.
109. **El-Agamy, E.I. (2009)** Bioactive components in camel milk. In: *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals* (eds Y.W. Park & G.F.W. Haenlein), pp.159–194. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA.
110. **El-Amin, E. B., El Owni, O. A. O. & El Zubeir, I. E. M. (2006).** Effect of parity number, lactation stage and season on camel milk composition in Khartoum State, Sudan. *Proceedings of the International Scientific Conference on Camel. Part IV: 2173-2183.* Qassim University, Saudia Arabia, pp. 9-11.
111. **Eliopoulos, GM., Eliopoulos, CT., (1990).** Therapy of enterococcal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;9(2):118-26.
112. **Ellouze .S., & Kamoun .M., (1989).** Evolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de lactation. *Options Méd.*, 6, 307-323.
113. **El-Ziney, M. G., Al-turki, I. (2007).** Microbiological quality and safety assessment of camel milk (*camelus dromedaries*) in Saudi Arabia (qassim region). *Applied ecology and environmental research* 5(2): 115-122.
114. **Ember, J.A. & Hugli, T.E. (1989).** Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am. J. Pathol.* 134, 797–805.
115. **Ennahar, S., Aoude-Weerner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C., (1998).** Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology* 85, 521–526.
116. **Epstein, H., (1971).** The origin of the domestic animals of Africa. Tome 2. Londres: African Publishing corporation. -719p.
117. **Essid, I., Medini, M. & Hassouna, M., (2009).** Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science.* 81: 203-208.

118. **Facklam, R. R., & Collins, M. D. (1989)**. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27 :731–734.
119. **FAO., (1995)**. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. p87-130.
120. **FAOstat. (2013)**. FAOstat database. Available at. http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#_anchor.
121. **Farah, Z. (1993)**. Composition and Characteristics of Camel Milk. *J. Dairy Res*, 60, 603-626.
122. **Faye .B., (2003)** .Performance et productivité laitière de la chamelle : les données de la littératures-lait de chamelle pour l’Afrique-atelier sur la filière laitier cameline en Afrique. Compte rendu de la FAO, Niamey.
123. **Faye, B., Loiseau, G. (2002)**. Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. CIRAD, FAO, Montpellier Cedex 5, 1-5.
124. **Fernández-Díaz, M.J., (1983)**. Olives. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology. Food and Feed Production by Microorganisms*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 379–397.
125. **Fisher, C. Phillips, (2009)**. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*, *Microbiology* 155 1749–1757.
126. **Flannagan SE, Clewell DB, Sedgley CM. (2008)**. A "retrocidal" plasmid in *Enterococcus faecalis*: Passage and protection. *Plasmid*;59(3):217–230. [PubMed: 18295881]
127. **Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., (1998)**. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4883–4890.
128. **Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., (2006)**. The role and application of *Enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1–24.
129. **Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. and Poznanski, A., (2009)**. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow’s milk. *International Dairy Journal*. 19: 3-11.
130. **Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Galvez, A., (2011)**. *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 125–140.
131. **Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., (1999)**. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1–24.
132. **Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., (1999a)**. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1–24.
133. **Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., (1996)**. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology* 29, 255–270.
134. **Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., (2003)**. *Enterococci* in foods — a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105–122.

135. **Fuller, R., (1989)**. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365–378.
136. **Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y., & al. (2011)**. Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404- specific methyltransferase EfmM. *RNA*;17(2):251–262. [PubMed: 21159796]
137. **Galli D, Friesenegger A, Wirth R. (1992)**. Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for [pPD1-encoded] aggregation substance. *Mol Microbiol*;6(10):1297–1308. [PubMed: 1640831]
138. **Galli D, Lottspeich F, Wirth R. (1990)**. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol*;4(6):895–904. [PubMed: 2120541]
139. **Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., (1998)**. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Archives of Microbiology* 171, 59–65.
140. **Garnier F. Taourit S. Glaser P. Courvalin P. Galimand M. (2000)**. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus spp.* *Microbiology*;146(Pt 6):1481–1489. [PubMed: 10846226]
141. **Gatti, M., Fornasari, E., Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E., (1994)**. Enterococchi nei formaggi Italiani: attività biochimiche e significato tecnologico. *Ind. Latte* 30, 11–29.
142. **Ghennam .E.H., Alloui .L.O., & Ghennam .A., (2007)**. Evolution de quelques caractères physico-chimiques et flore microbienne du lait de dromadaire conservé aux températures ambiante et de réfrigération. *Laboratoire de Technologie Alimentaire, Université de Batna, Renc. Rech. Ruminants*, 109.
143. **Gilmore, MS., Lebreton, F., Van Schaik, W. (2013)**. 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. [PubMed: 23395351]
144. **Gilmore, M.S., Clewell, D. B., Ike, Y., Shankar, N. (2014)**. *Enterococci* : From Commensals to Leading Causes of Drug-Resistant Infection. *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*. Boston.
145. **Gilmore M. S. Segarra R. A. Booth M. C. (1990)**. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infection and Immunity* ;58(12):3914–3923. [PubMed: 2123826]
146. **Gilmore, M.S., Coburn, P.S., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E., (2002)**. Enterococcal virulence. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E., Rice, L.B. (Eds.), *The Enterococci*. pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM, Washington, D.C., pp. 301–354.
147. **Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R. And Clewell, D.B. (1994)**. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176, 7335–7344.

148. **Gilmore, MS., Coburn, PS., Nallapareddy, SR., Murray, BE., (2002).** Enterococcal Virulence. Washington, D. C.: ASM Press.
149. **Giraffa, G. (2003).** Functionality of *Enterococci* in dairy products. Int. J. Food Microbiol.,
150. **Giraffa, G., (2002).** *Enterococci* from foods. FEMS Microbiology Reviews 26, 163–171
151. **Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E., (1997).** *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. J. Food Prot. 60, 732–738.
152. **Giraffa, G., Gatti, M., Carminati, D., Neviani, E., (1993).** Biochemical and metabolic characteristics of strains belonging to *Enterococcus* genus isolated from dairy products. Proceedings of the Congress Biotechnology and Molecular Biology of Lactic Acid Bacteria for the Improvement of Foods and Feeds Quality, Naples, February 23–24.
153. **Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., Carminati, D., (1995).** Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during cheese Taleggio cheese making and ripening. Food Microbiol. 12, 301–307.
154. **Girish, K. S., Kemparaju, K., (2007).** Themagic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. Life Sci. 80, 1921–1943.
155. **Gnan, S. O., Mohamed, M. O., Shereha, A. M. & Iwegbe, A. O. (1994a).** Antimicrobial activity of camel's milk. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
156. **Gonzales R. D. Schreckenberger P. C. Graham M. B. Kelkar S. DenBesten K. Quinn J. P. (2001).** Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. Lancet;357(9263):1179. [PubMed: 11323048]
157. **Gorban, A. M. S., & Izzeldin, O. M., (1997).** Mineral content of camel milk and colostrum. J. Dairy Techn., 64, 471-474.
158. **Goto DK, Yan T. (2011).** Effects of land uses on fecal indicator bacteria in the water and soil of a tropical watershed. Microbes Environ;26(3):254–260. [PubMed: 21666390]
159. **Guiraud, J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques. Ed , Dunod, Paris, 2003, 651 p.
160. **Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. (2002).** Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature;415(6867):84–87. [PubMed: 11780122]
161. **Haddadin, M. S. Y., Gammoh, S. I., & Robinson, R. K., (2008).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. Journal of dairyresearch, 75, 8-12.
162. **Hagrass, A.E.A., Rayed, E.O., Aly, A.A., Samragy, Y.A., (1991).** Growth characteristics of *Enterococci* isolated from Laban Rayeb. Nahrung 35, 209–213.
163. **Hall AE, Gorovits EL, Syribey PJ, Domanski PJ, Ames BR, Chang CY, et al. (2007).** Monoclonal antibodies recognizing the *Enterococcus faecalis* collagen-binding MSCRAMM Ace: conditional expression and binding analysis. Microb Pathog;43(2-3):55–66. [PubMed: 17521860]

164. **Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A.K., Wullt, B. & Svanborg, C. (2008)**. Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET [human alpha lactalbumin made lethal to tumor cells]. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 606, 217–240.
165. **Hamama, A. (1989)**. Qualité bactériologique des fromages frais marocains. Option méditerranéennes, Série séminaire n°6, 223-227.
166. **Hammad, A. M., Hassan, H. A., Shimamoto, T. (2015)**. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus spp.* in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control*. 50:815-820.
167. **Hancock LE, Gilmore MS. (2002)**. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99(3):1574–1579. [PubMed: 11830672]
168. **Handley, P. S, Jacob, A. E. (1981)**. Some structural and physiological properties of fimbriae of *Streptococcus faecalis*. *Microbiology* ;127(2):289–293. [PubMed: 6123542]
169. **Harwood VJ, Whitlock J, Withington V. (2000)**. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl Environ Microbiol*;66(9):3698–3704. [PubMed: 10966379]
170. **Hassaïne, O., Zadi-Karam, H. & Nour-Eddine, K. (2007)**. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Enterococcus faecalis*). *African Journal of Biotechnology* 6, 1720–1727.
171. **Hassan, A.H., Hagrass, A.I., Soryal, K.A. & El-Shabrawy, S.A. (1987)**. Physicochemical properties of camel milk during lactation period in Egypt. *Egyptian Journal of Food Science* 15, 1–14.
172. **Håvarstein LS, Diep DB, Nes IF. (1995)**. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*;16(2):229–240. [PubMed: 7565085]
173. **Heleni, S., Lefki, P., Nikolaos, T., & Evanthia, L.T. (2006)**. Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *Int. J. Dairy Technol.* vol. 59, no3, pp. 200-208.
174. **Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, van Schaik W. (2009)**. LPxTG surface proteins of *Enterococci*. *Trends Microbiol*;17(9):423–430. [PubMed: 19726195]
175. **Hernday, A., et al., (2002)**. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 Suppl 4: p. 16470-6.
176. Herrero & al., 1996
177. **Hickey RM, Twomey DP, Ross RP, Hill C. (2003)**. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*;149(Pt 3):655–664. [PubMed: 12634334]
178. **Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J., (1998)**. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41, 85–101.
179. **Hoste, C., Peyre De Fabregues, B., Richard, D., (1984)**. Le dromadaire et son élevage. Maisons-Alfort, IEMVT-CIRAD., [Coll. Etudes et Synthèses de l'IEMVT no 12].

180. **Hu C-B, Malaphan W, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. (2010).** Enterocin X, a Novel Two Peptide Bacteriocin from *Enterococcus faecium* KUB5, Has an Antibacterial Spectrum Entirely Different from Those of Its Component Peptides. *Appl Environ Microbiol*;76(13):4542–4545. [PubMed: 20418437]
181. **Huebner, J., Quaas, A., Krueger, W.A., Goldmann, D.A., Pier, G.B., (2000).** Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and -resistant *Enterococci*. *Infection and Immunity* 68, 4631–4636.
182. **Huebner, J., Wang, Y., Krueger, W.A., Madoff, L.C., Martirosian, G., Boisot, S., Goldmann, D.A., Kasper, D.L., Tzianabos, A.O., Pier, G.B., (1999).** Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity* 67, 1213–1219.
183. **Hufnagel, M., Hancock, L.E., Koch, S., Theilacker, C., Gilmore, M.S., Huebner, J., (2004).** Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2548–2557.
184. **Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., (2003).** Functionality of *Enterococci* in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 223–233.
185. **Hugenholtz, J., Perdon, L., Abee, T., (1993).** Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4216–4222.
186. **Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., Sharp, P.M., (1991).** ERIC sequences a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 825–834.
187. **Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., (2007).** Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from *Enterococci* isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 1–7.
188. **Hunter, J.O., Lee, A.J., Barratt, M.E.J., Linggood, M.A., Blades, J.A., (1996).** *Enterococcus faecium* strain PR88—an effective probiotic. *Gut* 38 (Suppl. 1), 62 [Abstract].
189. **Huycke, M. M., Gilmore, M. S. (1995).** Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 34:152–156
190. **Huycke MM, Joyce W, Wack MF. (1996).** Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*;173(3):743–746. [PubMed: 8627044]
191. **Huycke, M.M., Abrams, V. And Moore, D.R. (2002).** *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cells DNA. *Carcinogenesis* 23, 529–536.
192. **Huycke, M.M., Spiegel, C.A., Gilmore, M.S., (1991).** Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 1626–1634.
193. **Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M., Swings, J., (2004).** Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1555–1562.

194. **Hwang, H.O., Ku, S.K., Lim, C.K., Park, G.S., Jung, S.C., Jung, & al., (2009).** Species distribution and resistance patterns to growth-promoting antimicrobials of *Enterococci* isolated from pigs and chickens in Korea, J. Vet. Diagn. Invest. 21:858–862.
195. **Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D. B. (1984).** Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. Infection and Immunity 45:528–530
196. **Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D. B. (1987).** High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. Journal of Clinical Microbiology 25:1524–1528
197. **Ike Y., Tanimoto K., Tomita H., Takeuchi K., Fujimoto S. (1998).** Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gmr) [65.1 kilobases] to *Enterococcus* strains during broth mating. Journal of Bacteriology; 180(18):4886–4892. [PubMed: 9733692]
198. **Inoue, T., Tomita, H., Ike, Y., (2006).** Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 50(4):1202–1212. [PubMed: 16569830]
199. **Izquierdo E, Bednarczyk A, Schaeffer C, Cai Y, Marchioni E, Van Dorsselaer A, et al. (2008).** Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. Antimicrob Agents Chemother; 52(6):1917–1923. [PubMed: 18391036]
200. **Izquierdo E, Cai Y, Marchioni E, Ennahar S. (2009).** Genetic Identification of the Bacteriocins Produced by *Enterococcus faecium* IT62 and Evidence that Bacteriocin 32 Is Identical to Enterocin IT. Antimicrob Agents Chemother; 53(5):1907–1911. [PubMed: 19273675]
201. **Izquierdo, E., Wagner, C., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Ennahar, S., (2009).** Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. Applied and Environmental Microbiology; 75(13):4273–4276. [PubMed: 19411428]
202. **Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. (1994).** Virulence of *Enterococci*. Clin Microbiol Rev; 7(4):462–478. [PubMed: 7834601]
203. **Jett, B. D., Jensen, H. G., Nordquist, R. E., Gilmore M. S. (1992).** Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. Infection and Immunity 60:2445–2452
204. **Johnson, A.P., (1994).** The pathogenicity of *Enterococci*. J. Antimicrob. Chemother. 33, 1083–1089.
205. **Joosten, H.M.L.J., Núñez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marugg, J.D., (1996).** Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. Applied and Environmental Microbiology 62, 4220–4223.
206. **Jung, J. Y., Lim, N. H., Kwon, J. M., Kim, S. K., Hong, H. C., Koo, et al. (2007).** Vancomycin-resistant *Enterococci* from animal sources in Korea, Int. J. Food Microbiol. 113:102–107

207. **Jurkovic, D., Krizkova, L., Dusinsky, R., Belicova, A., Sojka, M., Krajcovic, J., Ebringer, L. (2006).** Identification and characterization of *Enterococci* from bryndza cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 42 :553-559.
208. **Kacem, M. & Karam, N.-E., (2006).** Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic and bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites* 57, 198–204.
209. **Kaçmaz, B., Aksoy, A. (2005).** Antimicrobial resistance of *Enterococci* in Turkey. *Inte. J. Antimicrob. Agents.* 25:535-538.
210. **Kadim, I.T., Mahgoub, O., Faye, B., Farouk, M.M. (2013).** Camel meat and meat products. CAB International (Library of Congress Cataloging-in-Publication Data), p 259. ISBN 978-1-78064-101-0.
211. **Kalina AP. (1970).** The position of *Enterococci* in the system of microorganisms. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*; 47:20–21. [PubMed: 4992950]
212. **Kamoun, M., & Ramet, J.P., (1989).** Conservation et transformation du lait de dromadaire. *Option Méditerranéennes, CIHEAM, Série séminaire N°6*, pp229-231
213. **Kamoun, M., (1995).** Dromedary meat: production, qualitative aspects and capability for transformation. *Option Mediterraneennes. Serie B, Etudes et Recherches* 13, 105–130.
214. **Kamoun, M. (1994).** Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. *Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers"*, Nouakchott, Mauritanie.
215. **Kang, JH., Lee, MS., (2005).** Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J Appl Microbiol*;98(5):1169–1176. [PubMed: 15836487]
216. **Kao, SM., Olmsted, SB., Viksnins, AS., Gallo, JC., Dunny, GM., (1991).** Molecular and genetic analysis of a region of plasmid pCF10 containing positive control genes and structural genes encoding surface proteins involved in pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*;173(23):7650–7654. [PubMed: 1938961]
217. **Karue, C.N., (1994).** The Dairy Characteristics of Kenyan Camel. *Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers"*, 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
218. **Kawamoto S, Shima J, Sato R, Eguchi T, Ohmomo S, Shibato J, et al. (2002).** Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl Environ Microbiol*;68(8):3830–3840. [PubMed: 12147478]
219. **Kayaoglu G, Ørstavik D. (2004).** Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*;15(5):308–320. [PubMed: 15470268]
220. **Kenji, F., Young W. P., George, F.W., (2013).** Camel milk in: *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. ISBN 978-1-118-53422-9 (epdf). Edited by John Wiley & Sons, Ltd.
221. **Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. & Zinedine, A. (2009).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research* 164, 81–91.

222. **Klein, G., (2003)**. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *Enterococci* from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 88, 123–131.
223. **Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C. And Huebner, J., (2004)**. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22, 822–830.
224. **Kolenbrander, Andersen, Baker, & Jenkinson, 1998 Kolenbrander PE, Andersen RN, Baker RA, Jenkinson HF. (1998)**. The adhesion-associated sca operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *J Bacteriol*;180(2):290. [PubMed: 9440518]
225. **Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G., (2008)**. The composition of camel milk : A meta-analysis of the literature data. *J. Food Compos. Anal.*, 22,95–101
226. **Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G., Narmuratova, M., Ivashchenko, A., Meldebekova, A., Davletov, S. (2010)**. Physiological change in camel milk composition (*EnteroCamelus dromedariuscocci*) 1. Effect of lactation stage. *Trop Anim Health Prod* 42:495-499.
227. **Konuspayeva, G., Faye, B. & Loiseau, G. (2009)**. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 95–101.
228. **Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G. & Levieux, D., (2007)**. Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *EnteroCamelus dromedariuscocci* , and Hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science* 90, 38–46.
229. **Konuspayeva, G., Loiseau, G. & Faye, B., (2004)**. The health added value of raw and fermented camel milk: the case of Kazakhstan. *Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants* 11, 47–50.
230. **Korhonen, H. (2009)**. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177e187.
231. **Kozlowicz, B. K., Dworkin, M., Dunny, G. M., (2006)**. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis* : a model for the evolution of biological complexity? *International Journal of Medical Microbiology*; 296(2-3):141–147. [PubMed: 16503196]
232. **Kristich, Y. H. Li, Cvitkovitch D. G. Dunny, G. M., (2004)**. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*, *J. Bacteriol.* 186 154–163.
233. **Kühnen E, Richter F, Richter K, Andries L. (1988)**. Establishment of a typing system for group D streptococci. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene [A]*;267(3):322–330. [PubMed: 3131979]
234. **Kwon, S. Y., Hwang, B. Y., Moon, Y. K., Park, S. Shin, C. Y., Hwang, & al. (2012)**. Occurrence of antimicrobial resistance and virulence genes, and distribution of enterococcal clonal complex 17 from animals and human beings in Korea, *J. Vet. Diagn. Invest.* 24 924–931.
235. **Larsson-Raznikiewicz, M., Mohamed, M. A. (1994)**. Camel's (*Camelus dromedarius*) Milk : properties important for processing procedures and nutritional value. *Actes du Colloque : « Dromadaires et chameaux animaux laitiers »*, 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

236. **Latasa, C., et al., (2006)**. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, 329(11): p. 849-57.
237. **Laukova, A., Czikkova, S., (1999)**. The use of enterocin CCM 4231 in soymilk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 182–186.
238. **Layton, BA., Walters, SP., Lam, LH., Boehm, AB., (2010)**. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J Appl Microbiol*;109(2):539–547. [PubMed : 20132375]
239. **Lebreton, F., Depardieu, F., Bourdon, N., Fines-Guyon, M., Berger, P., Camiade, S., & al. (2011)**. D Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 55(10):4606–4612. [PubMed : 21807981]
240. **Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, et al. (2009)**. ace, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infect Immun*;77(7):2832–2839. [PubMed: 19433548]
241. **Leclercq, R. (1997)**. *Enterococci* acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 24 [Suppl. 1], S80–S84
242. **Lee, M., Chung H. S. (2015)**. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in Enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. *J. Microbiol. Methods.* 112:87-91.
243. **Leveau, J.Y., Boiux, M., & De Roissart, H.B., (1991)**. La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 2e Ed, Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 2-40.
244. **Lhoste P., (1993)**. Zootechnie des régions chaudes : les systèmes d'élevage. Montpellier, CIRAD. –
245. **Lhote, H., (1987)**. Chameau et dromadaire en Afrique du Nord et au Sahara : recherches sur leurs origines. Alger : ONAPSA. - 161 p.
246. **Libertin, C. R., Dumitru, R., Stein, D. S. (1992)**. The hemolysin/bacteriocin produced by *Enterococci* is a marker of pathogenicity. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 15:115–120
247. **Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. And Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. (1993)**. Effect of type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiol.* 10, 31–41.
248. **Liu, X., Vederas, JC., Whittall, RM., Zheng, J., Stiles, ME., Carlson, D., & al. (2011)**. Identification of an N-Terminal Formylated, Two-Peptide Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J Agric Food Chem*;59(10):5602–5608. [PubMed: 21469734]
249. **Lopes, M.d. F. S., Ribeiro, T., Abrantes, M., Marques, J. J. F., Tenreiro, R., & Crespo, M. T. B. (2005)**. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of *Enterococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 191e198.
250. **Lopes, M.d. F. S., Simoes, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F., & Crespo, M. T. B. (2006)**. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy *Enterococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 208e214.

251. **Lore, T.A., Mbugua, S.K. & Wangoh, J., (2005).** Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *LWT-Food Science and Technology* 38, 125–130.
252. **Low, Y.L., Jakubovics, N.S., Flatman, J.C., Jenkinson, H.F. And Smith, A.W. (2003).** Manganese dependent regulation of the endocarditis associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J. Med. Microbiol.* 52, 113–119.
253. **Lowe, A.M., Lambert, P.A. And Smith, A.W., (1995).** Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: Homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* 63, 703–706.
254. **Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Balz, R., Schleifer, K H., Magrum, L., Woese, C R., Fox, G E., Stackebrandt, E., (1985).** The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Gen Microbiol* 131:543-551.
255. **Lund, B.M., (1965).** A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci. *Journal of General Microbiology* 40, 413–419.
256. **Macedo, A.C., Malcata, F.X., (1997).** Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und -Forschung. A* 205, 25–30.
257. **Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, J., (1996).** Purification, partial characterization and mode of action of *Enterococcin* EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* 30, 255–270.
258. **Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Jiménez, E., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Rodríguez, J.M., (2009).** Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. *Int J Food Microbiol*;133(1 2):105–112. [PubMed: 19501421]
259. **Mannu, L., Paba, A., (2002).** Genetic diversity of lactococci and *Enterococci* isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* 92, 55–62.
260. **Maria, C. G., Franco, I., Tornadijo, M. E., Carballo, J. (2002).** Identification of *Enterococci* isolated from cow's milk cheese: comparison of the classical methods and the api 20 strep system. *Acta. Microbiol. Immuno. Hung.* 49:119-128.
261. **Marra, A., Dib-Hajj, F., Lamb, L., Kaczmarek, F., Shang, W., Beckius, G., Milici, A.J., Medina, I., Gootz, T.D., (2007).** Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58, 59–65.
262. **Marshall S. H. Donskey C. J. Hutton-Thomas R. Salata R. A. Rice L. B. (2002).** Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;46(10):3334–3336. [PubMed: 12234875]
263. **Martínez-Bueno M, Maqueda M, Gálvez A, Samyn B, Van Beeumen J, Coyette J, et al. (1994).** Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J Bacteriol*;176(20):6334–6339. [PubMed: 7929005]

264. **Martinez-Moreno, J.L., (1976)**. Microbial flora of Manchego cheese: III. Streptococci. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie General* 4, 41–56.
265. **Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2009)**. Characterization and safety evaluation of *Enterococci* isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132,24e32.
266. **Martín-Platero AM, Valdivia E, Ruíz-Rodríguez M, Soler JJ, Martín-Vivaldi M, Maqueda M, et al. (2006)**. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol*;72(6):4245–4249. [PubMed: 16751538]
267. **Matsumura, S., Simor, A. E. (1998)**. Treatment of endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with quinupristin/dalfopristin, doxycycline, and rifampin: a synergistic drug combination. *Clinical Infectious Diseases*;27(6):1554–1556. [PubMed: 9868693]
268. **Mayers, D. (2009)**. Antimicrobial drug resistance: Mechanisms of drug resistance (Vol. 2). Humana Press.
269. **McCracken M, Wong A, Mitchell R, Gravel D, Conly J, Embil J, et al. (2013)**. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1999-2009. *J Antimicrob Chemother*;68(7):1505–9.
270. **Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Richard Bauer RJ, Marrs CF. (2003)**. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol* 41:5224-5226. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.11.5224-5226.2003>
271. **Mehaia, M. A., Hablas, M. A., Abdel-Rahman, K. M., El-Mougy, S. A. (1995)**. Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chem.*, 52, 115-122.
272. **Menendez, S., Godinez, R., Hermida, M., Centeno, J.A. & Rodriguez-Otero, J.L. (2004)**. Characteristics of "Tetilla" pasteurised milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiol* 21: 97–104
273. **Merquior, V. L., Peralta, J. M., Facklam, R. R., Teixeira, L. M. (1994)**. Analysis of Electrophoretic Whole-Cell Protein Profiles as a Tool for Characterization of *Enterococcus* Species. *Curr. Microbiol.* 28:149-153.
274. **Michel JL, Madoff LC, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM. (1991)**. Cloned alpha and beta C protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. *Infect Immun*;59(6):2023–2028. [PubMed 1674738]
275. **Miyazaki et al. (1993) Miyazaki S, Ohno A, Kobayashi I, Uji T, Yamaguchi K, Goto S. (1993)**. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiol Immunol*;37(4):265–270. [PubMed: 8350769]
276. **Mohamed, M. A., Mursal, A. I., Larsson-Raznikiewicz, M.(1989)**. Separation of camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. *Milchwissenschaft*, 44 (5), 278-280.
277. **Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. (2004)**. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm

- formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun;72(6):3658–3663. [PubMed: 15155680]
278. **Mohamed, J.A. & Huang, D.B., (2007)**. Biofilm formation by *Enterococci*. J Med Microbiol., 56(Pt 12): p. 1581-8.
279. **Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. (2006)**. Technological and molecular characterization of *Enterococci* isolated from north-west Italian dairy products. Int. Dairy. J. 16:867-875.
280. **Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P.S., (1999)**. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. J. Appl. Microbiol. 87, 574– 582.
281. **Moubareck, N., Bourgeois, P., Courvalin, F., Doucet-Populaire, (2003)**. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human *Enterococci* in the digestive tract of gnotobiotic mice, Antimicrob. Agents Chemother. 47:2993–2996.
282. **Moy, T.I., Mylonakis, E., Calderwood, S.B. & Ausubel, F.M., (2004)**. Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. Infect Immun. 72, 4512–4520.
283. **Murray, B.E. (1990)**. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3, 46–65.
284. **Musaad, A. M., Faye, B. & Al-Mutairi, S. E. (2013)**. Seasonal and physiological variation of gross composition of camel milk in Saudi Arabia. Emir. J. Food. Agric. 25:618-624.
285. **Nabag, M. G., K. A. Alatti and I. E. M. El Zubier. (2006)**. Milk composition of camels and goats grazing in the extensive pasture of Butana area in Sudan. Proceedings of the International Scientific Conference on Camel. Part IV: 2173- 2183. Gassim University, Saudi Arabia, 9-11 May 2006.
286. **Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE. (2000)**. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect Immun;68(9):5218–5224. [PubMed: 10948147]
287. **Nallapareddy SR, Singh KV, Duh RW, Weinstock GM, Murray BE. (2000)**. Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. Infect Immun;68(9):5210–5217. [PubMed: 10948146]
288. **Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. (2006)**. Construction of improved temperature sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding acm gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. Appl Environ Microbiol;72(1):334–345. [PubMed: 16391062]
289. **Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Zhao M, Murray BE. (2011)**. Relative contributions of Ebp Pili and the collagen adhesin ace to host extracellular matrix protein adherence and experimental urinary tract infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. Infect Immun;79(7):2901–2910. [PubMed: 21505082]
290. **Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. (2003)**. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strainspecific collagen binding mediated by Acn, a new

- member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol*;47(6):1733–1747. [PubMed: 12622825]
291. **Nanda, D.K., Tomar, S.K., Singh, R., Mal, G., Singh, P., Arora, D.K., Joshi, B.K., Chaudhary, R. & Kumar, D. (2011)**. Phenotypic and genotypic characterization of Lactobacilli isolated from camel cheese produced in India. *International Journal of Dairy Technology* 64, 437–443.
292. **Naoual, J., Abdelaziz, B., Roberta, C., Daga, E., Bouksaim, M. (2010)**. Characterization of *Enterococci* isolated from Moroccan dairy products. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:1768-1774.
293. **Ndiaye, A.A., Sylla, S.N., Gueye, M., Delajudie, P., Ndoye, I., (2002)**. Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des Rhizobiums d'*Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne supsp. *Raddiana* (Savi) Brenan. *African Journal of Science and Technology. Science and Engineering Series* 3(1):33-43.
294. **Neviani, E., Mucchetti, G., Contarini, G., Carini, S., (1982)**. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani: I. Loro presenza in formaggi di monte e impiego in un innesto selezionato. *Latte* 7, 722– 729.
295. **NF : ISO 13681 V 04-507 Avril (1996)**. Viande et produits à base de viande- Dénombrement des levures et moisissures- technique par comptage des colonies. *Analyse microbiologique tome 2. Méthodes sectorielles. AFNOR 6eme ED.* 325-334.
296. **NF ISO 4833, 1991 NF ISO 4833 (1991)**. Microbiologie alimentaire – Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes - méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C.
297. **NF : V 08-010 Mars (1996)**. Microbiologie des aliments-Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique ; *Analyse microbiologique tome 1 ; Méthodes horizontales. AFNOR 6eme ED.* 67-75. NF V 08-050
298. **NF V -057-2 (1991)**. Microbiologie alimentaire – Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.
299. **Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., (2003)**. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2975–2984.
300. **Núñez, M., Rodríguez, J.L., García, E., Gaya, P., Medina, M., (1997)**. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 83, 671 – 677.
301. **O'Sullivan, M.G., Thornton, G., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., (1992)**. Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science and Technology* 3, 309 – 314.
302. Obeid et al., 1996
303. **Omar, A.A., & Hamad, A.A., (2010)**. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal* 20. pp : 811-821
304. **Orla-Jensen S. (1919)**. The lactic acid bacteria. *Memoirs of the Academy of the Royal Society of Denmark. Sect Sci Ser;* 85:81 – 197.
305. **Oumer, B.A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., Núñez, M., (2001)**. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese

- manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *Journal of Dairy Research* 68, 117–129.
306. **Oyamada Y, Ito H, Inoue M, Yamagishi J-i. (2006).** Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Medical Microbiology*;55(10): 1395–1401. [PubMed: 17005789]
307. **Palmer, K.L. Kos, V.N. Gilmore, M.S. (2010).** Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance, *Curr. Opin. Microbiol.* 13 632–639.
308. **Parente, E., & Cogan, T. (2004).** Starter cultures: general aspects. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1,123e148.
309. **Parente, E., Villani, F., Coppola, R., Coppola, S., (1989).** A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait* 69, 271 – 279.
310. **Patel, A., & Prajapati, J. B. (2013).** Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1,107
311. **Peyre De Fabregues, B., (1989).** The dromedary in its natural environment. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, , 42 (1) : 127. 1-20
312. **Phalip, V., Monneta, C., Schmitt, P., Renault, P., Godonb, J.J & Divib, C., (1994).** Purification and properties of the α -acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *FEBS Letters*. 351: 95-99.
313. **Pieniz, S., & al. (2015).** "Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect." *Food Control* 51: 49-54.
314. **Pinkston KL, Gao P, Diaz-Garcia D, Sillanpää J, Nallapareddy SR, Murray BE, et al. (2011).** The Fsr quorum sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display of the collagen-binding MSCRAMM Ace through regulation of gelE. *J Bacteriol*;193(17):4317–4325. [PubMed: 21705589]
315. **Piraino, P., Zotta, T., Ricciardia, A., McSweeney, B., Paul, L.H. & Parente, E. (2008).** Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. *International Dairy Journal*. 18: 81-92.
316. **Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen. (1989).** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:151–156.
317. **Pomel, A., (1893).** Caméliens et cervidés. – *Cart. Géol. Algér. Paléont. Monogr.*, 1-52.
318. **Pritchard, G.G., Coolbear, T., (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 179–206.
319. **Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. (2000).** Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*;68(5):2579–2586. [PubMed: 10768947]
320. **Rakita RM, Quan VC, Jacques-Palaz K, Singh KV, Arduino RC, Mee M, et al. (2000).** Specific antibody promotes opsonization and PMN-mediated killing of phagocytosis-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Immunol Med Microbiol*;28(4):291–299. [PubMed: 10891652]
321. **Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, et al. (1999).** *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to

- killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun*;67(11):6067–6075. [PubMed: 10531268]
322. **Ramet J.P., (1994).** Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie
323. **Ribeiro, T., Marta, A., Maria de Fátima Silva, L., Crespo, M. T. B. (2007).** "Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry vanA and vanB genes." *International Journal of Food Microbiology* 113(3): 289-295.
324. **Rice L. B. Carias L. L. Marshall S. Rudin S. D. Hutton-Thomas R. (2005).** Tn5386, a novel Tn916-like mobile element in *Enterococcus faecium* D344R that interacts with Tn916 to yield a large genomic deletion. *Journal of Bacteriology*;187(19):6668–6677. [PubMed: 16166528]
325. **Rice L. B. 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. *The Journal of Infectious Diseases*;187(3):508–512. [PubMed: 12552437]
326. **Rice, L. B., Calderwood, S. B., Eliopoulos, G. M., Farber, B. F., Karchmer, A. W., (1991).** Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease. *Rev Infect Dis*;13(1):1–7. [PubMed: 2017607]
327. **Rice, L. B., Carias, L. L., Rudin, S., Lakticová, V., Wood, A., Hutton-Thomas, R., (2005).** *Enterococcus faecium* low affinity pbp5 is a transferable determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;49(12): 5007–5012. [PubMed: 16304165]
328. **Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, et al. (1999).** Ace is a collagen binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*;274(38):26939–26945. [PubMed: 10480905]
329. **Roberts, J.C., Singh, K.V., Okhuysen, P.C., Murray, B.E., (2004).** Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2317–2320.
330. **Rossi, E.A., Vendramini, R.C., Carlos, I.Z., Pei, Y.C., de Valdez, G.F., (1999).** Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *European Food Research and Technology* 209, 305–307.
331. **Rozdzinski, E., et al., (2001)** Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog.* 30(4): p. 211-20.
332. **Rumpel S, Razeto A, Pillar CM, Vijayan V, Taylor A, Giller K, et al. (2004).** Structure and DNA binding properties of the cytolysin regulator CylR2 from *Enterococcus faecalis*. *EMBO J*;23(18):3632–3642. [PubMed: 15359276]
333. **Saavedra, L., (2001).** Clinical applications of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 1147S– 1151S.
334. **Saavedra, L., Minahk, C., de Ruiz Holgado, AP., Sesma, F., (2004).** Enhancement of the Enterocin CRL35 Activity by a Synthetic Peptide Derived from the NH₂-Terminal Sequence. *Antimicrob Agents Chemother*;48(7):2778–2781. [PubMed: 15215149]

335. Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D.E., Prevost, H. et Kihal, M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides*. 1: 1-11.
336. Samyn, B., Martinez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., & al., (1994). The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett*;352(1):87–90. [PubMed: 7925951]
337. Sánchez J, Diep DB, Herranz C, Nes IF, Cintas LM, Hernández PE. (2007). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol Lett*;270(2):227–236. [PubMed: 17326750]
338. Sánchez-Hidalgo M, Maqueda M, Gálvez A, Abriouel H, Valdivia E, Martínez-Bueno M. (2003). The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl Environ Microbiol*;69(3):1633–1641. [PubMed: 12620853]
339. Sannomiya, P.A., Craig, R.A., Clewell, D.B., Suzuki, A., Fujino, M., Till, G.O. & Marasco W.A., (1990). Characterization of a class of nonformylated *Enterococcus faecalis*-derived neutrophil chemotactic peptides: The sex pheromones. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87, 66–70.
340. Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., (2001a). Biochemical properties of *Enterococci* relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11, 621–647.
341. Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., (2002a). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 93–105.
342. Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., (2002b). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIRE 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 72, 125–136.
343. Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of *Enterococci* relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11, 621–647.
344. Sawa, N., Wilaipun, P., Kinoshita, S., Zendo, T., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., & al., (2012). Isolation and Characterization of Enterocin W, a Novel Two-Peptide Lantibiotic Produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. *Appl Environ Microbiol*;78(3):900–903. [PubMed: 22138996]
345. Sboui .A., Khorchani .T., Djegham .M., Agrebi .M., Elhatmi .H., & Belhadj .O., (2009). Anti-diabetic effect of camel milk in alloxan-induced diabetic dogs: a dose response experiment. *Journal of Animal physiology and animal nutrition*. Tunisia.
346. Schleifer, K. H., & 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 Evol Microbiol*;34(1):31–34.

347. **Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., (1987).** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, *Enterococci* and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology*;10(1):1 – 19. [PubMed: 16376050]
348. **Sela, S., Pinto, R., Merin, U., & Rosen, B., (2003).** Thermal inactivation of *Escherichia coli* in camel milk. *J. Food Prot.*, 66, 1708-1711.
349. **Semereab, T., & Molla, B., (2001).** Bacteriological quality of raw milk of camel (*Enterococcus dromedarius*) in Afar region (Ethiopia) .*J. Camel Pract. Res.* 8, 51 – 54.
350. **Senoussi, C., (2011).** Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone, thèse de magister, université mouloud Mammeri de TIZI Ouzo, Alger.
351. **Shankar, N., Baghdayan, AS., Gilmore, MS., (2002).** Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* ;417(6890):746 – 750. [PubMed: 12066186]
352. **Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G., Gilmore, M. S., (1999).** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity* ;67(1):193–200. [PubMed : 9864215]
353. **Sharples, G. J., & Lloyd R. G., (1990).** A novel repeated sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 18:6503–6508.
354. **Shepard, B. D., Gilmore, M. S., (2002).** Antibiotic-resistant *Enterococci*: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*;4(2):215–224. [PubMed: 11880055]
355. **Sherman, J. M., (1937).** The Streptococci. *Bacteriological Reviews*;1(1):3–97. [PubMed: 16350049]
356. **Siboukeur, O., (2008).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques, aptitude à la coagulation, Thèse de doctorat inédite, Institut national agronomique El-Harrach, Alger.
357. **Sillanpää, J., Xu, Y., Nallapareddy, SR., Murray, BE., Höök, M., (2004).** A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*;150(Pt 7):2069–2078. [PubMed: 15256550]
358. **Silverman, J. A., Perlmutter, N. G., Shapiro, H. M., (2003).** Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;47(8):2538–2544. [PubMed: 12878516]
359. **Simonetta, A.C., Moragues de Velasco, L.G., Frison, L.N., (1997).** Antibacterial activity of *Enterococci* strains against *Vibrio cholerae*. *Letters in Applied Microbiology* 24, 139–143
360. **Singh, K. V., Coque, T. M., Weinstock, G. M., Murray, B. E., (1998).** In vivo testing of an *Enterococcus faecalis efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol*;21(4):323–331. [PubMed: 9753005]
361. **Singh, K. V., Nallapareddy, S. R., Sillanpää, J., Murray, B. E., (2010).** Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathog*;6(1): e1000716. [PubMed: 20072611]

362. **Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B. E., (1998).** Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis*;178(5):1416-1420. [PubMed: 9780263]
363. **Singh, B. R. (2009)** Prevalence of vancomycin resistance and multiple drug resistance in *Enterococci* in equids in North India, *J. Infect. Dev. Ctries.* 3 498-503
364. **Soukoulis, C., Panagiotidis, P. & Koureli, R. (2007).** Industrial yogurt manufacture: Monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *J. Dairy Sci.* 90: 2641-2654.
365. **Sousa. M.J., & Malcata. F.X., (2002).** Advances in the role of a plant coagulant [*Cuanara cardanculus*] in vitro and during ripening of cheeses from several milk species *Lait* 82:151-170
366. **Stålhammar-Carlemalm, M., Areschoug, T., Larsson, C., Lindahl, G., (1999).** The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol*;33(1):208-219. [PubMed: 10411737]
367. **Stiles, M. E., & Holzapel, W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1e29.
368. **Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fiedler, S., & al., (1991).** Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis subsp. liquefaciens*. *Infect Immun*;59(1):415-420. [PubMed: 1846126]
369. **Sulieman, A.M.E.H., Ilayan, A.A. & El Faki, A.E.A. (2006).** Chemical and microbiological quality of Garris, Sudanese fermented camel's milk product. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 321-328.
370. **Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T., (2000).** A survey of the *Enterococci* isolated from an artisanal Italian goat's cheese [Semicotto Caprino]. *Journal of Applied Microbiology* 89, 267-274.
371. **Švec, P., Devriese L.A. (2009).** The genus *Enterococcus* : in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, second edition ; volume three (The firmicutes). P 594-623.
372. **Tannock, G. W., & Cook, G. (2002).** *Enterococci* as members of the intestinal microflora of humans. In M. S. Gilmore (Ed.), *The Enterococci. Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (pp.101-132). Washington, D. C.
373. **Tejedor Junco, M. T., Gonzalez-Martin, M., Rodriguez Gonzalez, N. F., Gutierrez, C. (2015).** Identification, antimicrobial susceptibility, and virulence factors of *Enterococcus spp.* strains isolated from Camels in Canary Islands, Spain. *Vet Ital* 51:179-183.
374. **Tendolkar, A.S., Baghdayan, M.S., Gilmore, N., Shankar, N. (2004).** Enterococcal surface protein Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*, *Infect. Immun.* 72 6032-6039.
375. **Teng, F., Jacques-Palaz, K. D., Weinstock, G. M., Murray, B. E., (2002).** Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infection and Immunity*;70(4):2010-2015. [PubMed: 11895965]

376. **Teng, F., Singh, K. V., Bourgoigne, A., Zeng, J., Murray, B. E., (2009).** Further characterization of the epa gene cluster and Epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*;77(9):3759-3767. [PubMed: 19581393]
377. **Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F. (1999).** Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Ant. Van. Leeuwenhoek*. 76:115-137.
378. **Theilacker, C., Kaczynski, Z., Kropec, A., Fabretti, F., Sange, T., Holst, O. & al. (2006).** Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. *Infection and Immunity*;74(10):5703-5712. [PubMed: 16988246]
379. **Theilacker, C., Kaczynski, Z., Kropec, A., Sava, I., Ye, L., Bychowska, A. & al. (2011).** Serodiversity of Opsonic Antibodies against *Enterococcus faecalis* -Glycans of the Cell Wall Revisited. *PLoS One*;6:e17839. [PubMed: 21437253]
380. **Thiercelin, M. E. (1899).** Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque. *C R Seances Soc Biol Fil*;11:551-553.
381. **Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., Hancock, L. E. A. (2009).** fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*;72(4):1022-1036. [PubMed: 19400795]
382. **Thunell, R.K., Sandine, W.E., (1985).** Types of starter cultures. In: Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 127 - 144.
383. **Thurlow, L. R., Thomas, V. C., Hancock, L. E. (2009).** Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. *Journal of Bacteriology*;191(20):6203-6210. [PubMed: 19684130]
384. **Thurlow, V. C., Thomas, S., Narayanan, S., Olson, S.D., Fleming, L.E., Hancock, L. E. (2010)** Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*, *Infect. Immun.* 78 4936-4943.
385. **Todokoro, D., Tomita, H., Inoue, T., Ike, Y. (2006).** Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl Environ Microbiol*;72(11):6955-6964. [PubMed: 17088377]
386. **Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y. (1996).** Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone responsive conjugative plasmid pY117. *J Bacteriol*;178(12):3585-3593. [PubMed: 8655558]
387. **Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y. (1997).** Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone responsive conjugative plasmid pPD1. *J Bacteriol*;179(24):7843-7855. [PubMed: 9401046]
388. **Tomita, H., Kamei, E., Ike, Y. (2008).** Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY114: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (Lysin and activator). *J Bacteriol*;190(6):2075-2085. [PubMed: 18203826]
389. **Tomita, H., Tanimoto, K., Hayakawa, S., Morinaga, K., Ezaki, K., Oshima, H. & al. (2003).** Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons

- that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. J Bacteriol;185(23):7024-7028. [PubMed: 14617670]
390. **Tremblay, CL. (2012)**. Étude de la résistance aux antibiotiques des entérocoques d'origine animale du Québec. Thèse de doctorat. Inédite, GREMIP et CRIP. Département de pathologie et microbiologie. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal.
391. **Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabarakis, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G., (1994)**. The combined use of whole cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolate from traditional Greek dairy products. Syst. Appl. Microbiol. 17, 444 – 458.
392. **Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Tsilibari, V., Georgalaki, M., Kalantzopoulos, G., (1993)**. Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. Neth. Milk Dairy J. 47, 145 – 150.
393. **Valenzuela, A. S., Omar, N. B., Abriouel, H., Lopez, R. L., Ortega, E., Canamero, M. M., et al. (2008)**. Risk factors in *Enterococci* isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. Food and Chemical Toxicology, 46, 2648e2652.
394. **Valenzuela, A. S., ben Omar, N., Abriouel, H., Lopez, R. L., Veljovic, K., Canamero, M. M., et al. (2009)**. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in *Enterococci* from artisan foods of animal origin. Food Control, 20, 381e385.
395. **Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M. M., & Galvez, A. (2010)**. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. Food Microbiology, 27, 955e961.
396. **Vankerckhoven, V., Van Outgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., & al. (2004)**. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology, 42,4473e4479.
397. **Van Tyne, D. Martin, M. J. Gilmore, M. S. (2013)**. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. Toxins ; 5(5):895–911. [PubMed : 23628786]
398. **Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991)**. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19: 6823–6831.
399. **Vignola .C. I., (2002)**. Science et technologie du lait: transformation du lait. Ed : Lavoisier. Paris. p 600.
400. **Villani, F., Coppola, S., (1994)**. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. Ann. Microbiol. Enzimol. 44, 97 – 105.
401. **Wang, Y., Huebner, J., Tzianabos, A. O., Martirosian, G., Kasper, D. L., Pier, G. B. (1999)**. Structure of an antigenic teichoic acid shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Carbohydr Res;316(1-4):155–160. [PubMed: 10420594]
402. **Waters, C. M., Antipporta, M. H., Murray, B. E., Dunny, G. M. (2003)**. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length,

- supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol*;185(12):3613–3623. [PubMed: 12775699]
403. **Wei, G., L. Pan, H. Du, J. Chen, & Zhao L. (2004)**. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pin-point genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *J. Microbiol. Methods* 59:91–108.
404. **Weinberg, Z., Shatz, O., & Chen, Y. (2007)**. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. *J. Dairy Sci.* 90: 4754-4762.
405. **Wessels, D., Jooste, P.J., Mostert, J.F., (1990)**. Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 10, 349–352.
406. **Wicken, A. J., Elliott, S. D., Baddiley, J. (1963)**. The identity of streptococcal group D antigen with teichoic acid. *Microbiology*;31(2):231–239. [PubMed: 14000462]
407. **Wilson, L. A., & Sharp, P. M., (2006)**. "Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR." *Mol Biol Evol* 23(6): 1156-1168.
408. **Winston, L.G, Pang, S., Haller, B.L., Wong, M., Chambers, H.F., Perdreau, R.F. (2004)**. API 20 strep identification system may incorrectly speciate *Enterococci* with low level resistance to vancomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:287-288.
409. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska et al. (2012)
410. **Wunderlich, P. F., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., & al. (1989)**. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhoea. *J Int Med Res*; 17:333–338. [PubMed: 2676650]
411. **Xu, Y., Jiang, L., Murray, B. E., Weinstock, G. M. (1997)**. *Enterococcus faecalis* antigens in human infections. *Infect Immun*;65(10):4207–4215. [PubMed: 9317028]
412. **Xu, Y., Murray, B. E., Weinstock, G. M. (1998)**. A cluster of genes involved in polysaccharide biosynthesis from *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun*;66(9):4313–4323. [PubMed: 9712783]
413. **Xu, Y., Singh, K. V., Murray, B. E., Weinstock, G. M. (2000)**. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun*;68(2):815–823. [PubMed: 10639451]
414. **Yagil, R. (1985)**. The Desert camel, comparative physiological adaptation, Ed KARGER, 109-120.
415. **Yagil, R., Etzion, Z., (1980)**. Effect of drought condition on the quality of camel milk. *J. Dairy Res.*, 47, 159–166
416. **Yagil, R. (1982)**. Camels and camel milk. *FAO Animal Production and Health Paper* 26, pp. 1–67. FAO, Rome.
417. **Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., Okazaki, M. (2003)**. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol*;69(10):5746–5753. [PubMed: 14532021]
418. **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):4352–4360. [PubMed: 21709077]
419. **Yap, I. K. S., Li, J. V., Saric, J., Martin, F. P., Davies, H., Wang, Y., et al. (2008).** Metabolomic and microbiological analysis of the dynamic effect of vancomycin-induced gut microbiota modification in mice. *Journal of Proteome Research*, 7, 3718e3728.
420. **Younan, M. (2004).** Milk Hygiene and Udder Health. In: Farah, Z. & A. Fischer (eds): *Milk and meat from the camel - Handbook on products and processing*. p67 – 76
421. **Zelege, Z. M. (2007).** Non-genetic factors affecting milk yield and milk composition of traditionally managed camels (*Enterococcus dromedarius*) in Eastern Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development* 19 (6).
422. **Zeng, J., Teng, F., Weinstock, G. M., Murray, B. E. (2004).** Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *J Clin Microbiol*;42(3):1149–1154. [PubMed: 15004067]
423. **Zourari, A., Accolas, J.P., Desmazeaud, M.J., (1992).** Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. *Lait* 72, 1–34.

Annexes

Annexe A (milieux de culture)

Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth)

Protéose-peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12,5g
Infusion de cœur de bœuf	5g
Chlorure de sodium	5g
Phostate disodique	2g
Glucose	2g
Eau distillée qsp	1000ml

pH 7,4. Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe)

Polypeptone	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait autolytique de levure	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,20 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

pH 5,7 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	9 g
Phosphate monopotassique	1,5 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 7,2. Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Lait écrémé à 10%

Poudre de lait (0% MG)	100g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 6,5. Stérilisation par tyndallisation, 3 répétitions à 100°C pendant 30min.

Gélose MRS (Man Rogosa et Sharpe)

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

pH 6,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose M17

peptone de caséine	2,50 g
Peptone de viande	2,50 g
Peptone de soja	5 g
Extrait de levure	2,50 g
Extrait de viande	5 g
Lactose	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 7,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose YMA (Yeast Milk Agar)

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Lait écrémé	1g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH 7,1 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose CATC (Citrate Azide Tween Carbonate)

Peptone de caséine	15 g
Extrait de levure	05 g
Potassium KH ₂ PO ₄	06 g
Citrate de Sodium	05 g
Tween 80	1ml
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 7 +/- 0,2 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Solutions ajoutées

Carbonate de Sodium	2g
TTC	0,1g
Azide de Sodium	0,4g

Stérilisation des solutions par filtration.

Gélose Muller-Hinton

Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
Eau distillée	1000ml

pH 7,4 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose blanche

Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH 7 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose à la gélatine

Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Gélatine	30g
Eau distillée qsp	1000ml
Agar	15g

pH 7 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose hypersaccharosée

Extrait de viande	10g
Extrait de levure	3g
Peptone	2.5g
Saccharose	150g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH 6,8 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min.

Gélose de Columbia au sang

Peptones	23g
Amidon	1g
Chlorure de sodium	5g
Agar	10g
Sang	50ml

pH 7,3 Stériliser par autoclave à 120°C pendant 15min le milieu de base.

Après refroidissement du milieu de base ajouter le sang défibriné stérile dans une zone stérile.

Annexes B (Quelques matériels utilisés)



Centrifugeuse



Rampe de filtration



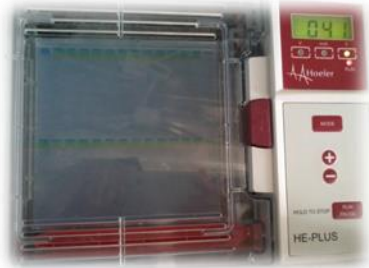
Colorimètre



Thermocycleur



Transilluminateur



Electrophorèse horizontale



Agitateur



pH-mètre

Annexe C (Résultat globale de l'antibiogramme)

Isolats	Van	Gen	Amp	Ery	Tet	Pen	Rif
ER	S	S	S	I	S	S	S
S	S	S	I	I	S	S	S
S10	S	S	I	I	S	S	S
S100	S	S	S	S	S	S	S
S101	S	S	S	S	S	S	S
S102	S	S	S	S	S	S	S
S103	S	S	S	S	S	S	S
S104	S	S	S	I	S	S	S
S105	S	S	S	S	S	S	S
S106	S	S	S	S	S	S	S
S107	S	S	S	S	S	S	S
S109	S	S	R	S	S	S	S
S11	S	S	I	I	S	R	S
S110	S	S	S	S	S	S	S
S111	S	S	S	S	S	S	S
S112	S	S	S	S	S	S	S
S113	S	S	S	S	S	S	S
S114	S	S	S	S	I	S	S
S115	R	S	R	I	S	S	S
S116	S	S	R	S	S	S	S
S117	S	S	S	I	S	S	S
S118	S	S	S	S	S	S	S
S119	S	S	S	I	S	S	S
S12	S	S	S	I	R	R	S
S120	S	S	S	S	S	S	S
S121	S	S	S	S	S	S	S
S122	S	S	S	S	S	S	S
S123	S	S	S	S	S	S	S
S124	S	S	S	S	S	S	S
S13	S	S	I	S	S	S	S
S14	S	S	S	S	S	S	S
S15	S	S	I	S	S	S	S
S16	S	S	I	I	S	S	S
S17	S	S	S	S	S	R	S
S18	R	S	R	R	S	S	R
S19	S	S	I	I	S	I	S
S2	S	S	I	I	S	S	S
S20	S	S	I	I	S	S	S
S22	S	S	S	I	S	R	S
S23	S	S	S	I	S	S	S
S24	S	S	I	I	S	R	S
S25	S	S	S	S	S	S	S
S26	S	S	S	S	S	I	S
S27	S	S	I	S	S	S	S
S28	S	S	I	I	S	S	S

S29	S	S	I	I	S	R	S
S3	S	S	S	I	S	S	S
S30	S	S	I	I	S	S	S
S31	S	S	S	S	S	S	S
S32	S	S	S	R	S	S	S
S33	S	S	S	I	S	S	S
S34	S	S	I	I	S	S	S
S35	S	S	S	I	S	S	S
S36	S	S	I	S	S	R	S
S37	S	S	S	S	S	S	I
S38	S	S	S	I	S	S	R
S39	S	S	S	I	R	R	S
S4	S	S	I	S	S	R	S
S40	S	S	S	S	S	S	S
S41	S	S	S	I	S	S	S
S42	S	S	S	S	S	S	S
S43	S	S	S	S	S	S	S
S44	S	S	S	S	S	S	S
S45	S	S	S	S	S	S	S
S46	S	S	S	S	S	S	S
S47	S	S	S	S	S	S	S
S48	S	S	S	S	S	S	S
S49	S	S	S	S	S	S	S
S5	S	S	I	I	S	S	S
S50	S	S	S	S	S	S	S
S51	S	S	S	S	S	S	S
S52	S	S	S	S	S	S	S
S53	S	S	S	S	S	/	/
S54	S	S	S	S	S	S	S
S55	S	S	S	S	S	S	S
S56	S	S	S	S	S	/	S
S57	S	S	S	S	S	/	/
S58	S	S	S	S	S	/	/
S59	S	S	S	S	S	/	/
S6	S	S	S	S	S	S	S
S60	S	S	S	S	S	S	S
S61	S	S	S	S	S	S	S
S62	S	S	S	S	S	/	S
S63	S	S	S	S	S	/	/
S64	S	S	S	S	S	/	S
S65	R	S	S	S	S	S	S
S66	S	S	S	S	S	S	S
S67	S	S	S	S	S	S	S
S68	S	S	S	S	S	S	S
S69	R	S	S	S	S	S	S
S7	S	S	I	S	S	S	S
S70	S	S	S	S	S	S	/

S71	S	S	S	S	S	S	/
S72	S	S	I	S	S	S	S
S73	S	S	S	S	S	/	S
S74	S	S	S	S	S	S	S
S75	S	S	S	S	S	S	S
S76	S	S	S	S	S	S	S
S77	S	S	S	S	S	S	S
S78	S	S	S	S	S	S	S
S79	S	S	S	S	S	S	S
S8	S	S	I	S	S	S	S
S80	S	S	S	S	S	S	S
S81	S	S	S	S	S	S	S
S82	S	S	S	S	S	S	S
S83	S	S	S	I	S	S	S
S84	S	S	R	I	R	S	S
S85	I	S	S	R	S	S	S
S86	S	S	S	I	S	S	S
S87	S	S	S	S	S	S	S
S88	S	S	S	S	S	S	S
S89	S	S	S	S	S	S	S
S9	S	S	I	S	S	R	S
S90	S	S	S	R	S	S	S
S91	S	S	S	R	S	S	S
S92	S	S	S	S	S	S	S
S93	S	S	S	I	S	S	S
S94	S	S	S	S	S	S	S
S95	S	S	S	S	S	S	S
S96	R	R	R	I	I	S	S
S97	S	S	S	S	S	S	S
S98	S	R	S	I	S	S	S
S99	S	S	S	S	S	S	S

Annexe D (Résultats du pouvoir acidifiant)

CODE	ID API 20 STREP	2 h	4 h	18 h	24 h	72 h	Moyenne pH	2 h	4 h	18 h	24 h	72 h
		pH	pH	pH	pH	pH (72h)		Acidité °D	Acidité °D	Acidité °D	Acidité °D	Acidité °D
ER	<i>E faecalis</i>	7.39	7.27	6.94	6.75	6.27	6.92	19.00	23.00	40.00	52.00	42.00
S1	<i>E avium</i>	7.30	7.28	6.93	6.88	6.36	6.95	20.00	29.00	41.00	54.00	39.00
S10	<i>E faecium</i>	7.36	7.35	6.85	6.88	5.55	6.80	20.00	30.00	50.00	43.00	55.00
S11	<i>E faecium</i>	7.19	7.23	6.85	6.72	6.22	6.84	25.00	31.00	49.00	52.00	45.00
S12	<i>E faecalis</i>	7.26	7.31	7.09	6.87	6.46	7.00	23.00	30.00	40.00	49.00	40.00
S13	<i>E faecium</i>	7.31	7.30	6.87	6.76	6.29	6.91	24.00	30.00	43.00	34.00	44.00
S14	<i>E faecium</i>	7.33	7.11	6.46	6.05	5.75	6.54	24.00	29.00	46.00	34.00	49.00
S15	<i>E faecalis</i>	7.21	7.26	6.81	6.71	6.19	6.84	23.00	32.00	44.00	52.00	41.00
S16	<i>E faecalis</i>	7.22	7.29	6.84	6.75	6.42	6.90	19.00	23.00	45.00	31.00	34.00
S17	<i>E faecium</i>	7.30	7.34	6.89	6.80	6.30	6.93	19.00	25.00	39.00	30.00	35.00
S18	<i>E faecalis</i>	7.26	7.20	6.94	6.51	6.30	6.84	23.00	32.00	39.00	55.00	43.00
S19	<i>E faecalis</i>	7.20	7.32	7.23	6.40	6.70	6.97	23.00	30.00	40.00	47.00	38.00
S2	<i>E faecalis</i>	7.40	7.35	7.34	7.10	6.73	7.18	20.00	20.00	47.00	35.00	43.00
S20	<i>E faecalis</i>	7.26	7.19	6.57	6.37	6.41	6.76	20.00	30.00	42.00	52.00	32.00
S22	<i>E faecalis</i>	7.28	7.40	7.10	6.77	6.41	6.99	21.00	35.00	40.00	49.00	32.00
S23	<i>E faecalis</i>	7.28	7.31	7.30	7.14	6.70	7.15	24.00	30.00	40.00	52.00	30.00
S24	<i>E faecium</i>	7.30	7.32	7.66	6.73	6.34	7.07	25.00	30.00	44.00	55.00	34.00
S25	<i>E avium</i>	7.20	7.23	6.74	6.60	6.11	6.78	20.00	24.00	45.00	29.00	50.00
S26	<i>E avium</i>	7.29	7.23	6.75	6.64	5.56	6.69	17.00	27.00	44.00	31.00	48.00
S27	<i>E faecium</i>	7.26	7.30	6.85	6.69	6.12	6.84	20.00	20.00	50.00	34.00	48.00
S28	<i>E faecium</i>	7.40	7.24	6.80	6.61	5.50	6.71	25.00	28.00	43.00	34.00	35.00
S29	<i>E faecium</i>	7.30	7.12	6.87	6.75	6.26	6.86	20.00	24.00	45.00	45.00	45.00
S3	<i>S uberis</i>	7.35	7.41	6.85	6.84	6.20	6.93	20.00	23.00	44.00	31.00	48.00
S30	<i>E gallinarum</i>	7.32	7.06	6.68	6.57	5.76	6.68	20.00	20.00	37.00	25.00	33.00
S31	<i>E gallinarum</i>	7.33	7.28	6.89	6.76	6.33	6.92	23.00	20.00	40.00	25.00	35.00

S32	<i>E gallinarum</i>	7.32	7.26	6.89	6.80	6.10	6.87	25.00	21.00	36.00	25.00	42.00
S33	<i>E gallinarum</i>	7.24	7.11	6.67	6.57	5.60	6.64	22.00	22.00	40.00	27.00	38.00
S34	<i>E gallinarum</i>	7.21	7.17	6.82	6.64	6.24	6.82	23.00	25.00	39.00	23.00	33.00
S35	<i>E gallinarum</i>	7.18	7.11	6.80	6.78	6.23	6.82	20.00	30.00	48.00	22.00	46.00
S36	<i>E gallinarum</i>	7.25	7.20	6.84	6.61	6.23	6.83	17.00	25.00	49.00	35.00	38.00
S37	<i>E gallinarum</i>	7.35	7.23	7.12	6.95	6.65	7.06	24.00	29.00	47.00	24.00	32.00
S38	<i>E gallinarum</i>	7.36	7.21	7.13	6.46	6.69	6.97	25.00	30.00	53.00	39.00	51.00
S39	<i>E faecalis</i>	7.13	7.22	6.78	6.65	6.10	6.78	20.00	25.00	42.00	36.00	49.00
S4	<i>E faecium</i>	7.24	7.38	6.86	6.68	6.20	6.87	22.00	30.00	34.00	28.00	40.00
S40	<i>L lactis subsp lactis</i>	7.19	7.24	6.48	6.36	6.50	6.75	34.00	32.00	39.00	28.00	48.00
S41	<i>E faecium</i>	7.30	7.15	6.80	6.72	6.20	6.83	18.00	25.00	42.00	31.00	39.00
S5	<i>E faecium</i>	7.24	7.32	6.79	6.66	6.25	6.85	27.00	30.00	50.00	39.00	45.00
S6	<i>E faecium</i>	7.36	7.38	6.78	6.76	6.09	6.87	21.00	30.00	45.00	50.00	35.00
S7	<i>E faecalis</i>	7.33	7.41	7.16	6.95	6.38	7.05	20.00	27.00	50.00	52.00	47.00
S8	<i>E faecium</i>	7.26	7.41	6.84	6.68	6.17	6.87	20.00	28.00	42.00	56.00	44.00
S9	<i>E faecalis</i>	7.23	7.33	6.95	6.76	6.50	6.95	22.00	30.00	35.00	42.00	49.00
S42	<i>E faecium</i>	7.22	6.98	6.06	5.71	5.70	6.33	19.00	23.00	45.00	45.00	52.00
S43	<i>E faecium</i>	7.16	6.92	5.99	5.82	5.78	6.33	28.00	23.00	49.00	43.00	58.00
S44	<i>E avium</i>	7.17	6.97	6.20	5.70	5.80	6.37	19.00	25.00	47.00	54.00	55.00
S45	<i>E faecium</i>	7.30	6.98	6.05	5.80	5.80	6.39	15.00	21.00	40.00	43.00	57.00
S46	<i>E faecium</i>	7.24	7.18	6.22	5.88	5.70	6.44	17.00	28.00	43.00	51.00	70.00
S47	<i>E faecium</i>	7.32	7.20	6.18	5.80	5.76	6.45	19.00	28.00	48.00	37.00	56.00
S48	<i>E faecium</i>	7.39	7.13	6.20	5.88	5.70	6.46	13.00	25.00	43.00	34.00	67.00
S49	<i>E faecium</i>	7.29	6.99	5.91	5.60	5.60	6.28	18.00	25.00	40.00	53.00	70.00
S50	<i>E avium</i>	7.21	7.05	6.30	5.90	5.90	6.47	19.00	27.00	40.00	40.00	75.00
S51	<i>E faecium</i>	7.15	6.99	6.31	6.30	5.70	6.49	15.00	22.00	40.00	40.00	43.00
S52	<i>E avium</i>	7.15	6.94	6.22	5.80	6.00	6.42	20.00	25.00	38.00	42.00	50.00
S53	<i>E faecium</i>	7.22	7.00	6.15	5.91	5.89	6.43	17.00	22.00	50.00	5.00	60.00
S54	<i>E faecium</i>	7.17	6.91	6.31	6.15	5.99	6.51	23.00	26.00	50.00	39.00	60.00

S55	<i>E faecium</i>	7.17	6.89	5.95	5.80	5.77	6.32	24.00	25.00	53.00	52.00	60.00
S56	<i>E faecium</i>	7.15	6.93	5.93	5.60	5.88	6.30	24.00	23.00	70.00	64.00	55.00
S57	<i>E faecium</i>	7.19	6.90	5.88	5.60	5.60	6.23	20.00	21.00	60.00	50.00	50.00
S58	<i>E faecium</i>	7.25	7.12	6.72	5.88	5.70	6.53	24.00	24.00	40.00	55.00	60.00
S59	<i>E faecium</i>	7.19	6.86	6.28	5.79	5.70	6.36	23.00	26.00	68.00	50.00	50.00
S60	<i>E faecium</i>	7.29	7.14	6.42	6.07	5.90	6.56	20.00	23.00	50.00	42.00	51.00
S61	<i>E faecium</i>	7.16	6.95	5.77	5.50	5.60	6.20	28.00	26.00	55.00	55.00	53.00
S62	<i>E faecium</i>	7.14	7.03	5.94	5.70	5.70	6.30	20.00	28.00	50.00	48.00	53.00
S63	<i>E faecium</i>	7.22	7.07	6.07	6.05	5.75	6.43	22.00	25.00	55.00	40.00	70.00
S64	<i>E faecium</i>	7.20	7.12	6.09	5.80	5.80	6.40	20.00	24.00	55.00	50.00	50.00
S65	<i>E faecium</i>	7.30	7.13	6.26	6.05	6.02	6.55	20.00	21.00	45.00	38.00	50.00
S66	<i>E faecium</i>	7.27	7.19	6.27	6.02	5.72	6.49	20.00	20.00	55.00	42.00	55.00
S67	<i>E faecium</i>	7.31	6.93	6.47	5.92	5.92	6.51	20.00	23.00	50.00	40.00	46.00
S68	<i>E faecium</i>	7.26	7.07	6.00	5.88	5.75	6.39	20.00	21.00	58.00	44.00	55.00
S69	<i>E faecium</i>	7.21	6.99	5.88	5.60	5.90	6.32	17.00	26.00	70.00	50.00	75.00
S70	<i>E faecium</i>	7.20	7.06	6.33	6.00	5.80	6.48	20.00	27.00	55.00	38.00	64.00
S71	<i>E faecium</i>	7.21	7.07	6.31	6.01	5.80	6.48	20.00	24.00	57.00	35.00	72.00
S72	<i>E faecium</i>	7.27	7.09	6.41	6.01	6.22	6.60	17.00	20.00	36.00	45.00	46.00
S73	<i>E faecium</i>	7.31	7.05	6.34	5.90	5.80	6.48	13.00	16.00	49.00	42.00	50.00
S74	<i>E faecium</i>	7.40	7.10	6.50	5.90	5.60	6.50	10.00	19.00	40.00	37.00	58.00
S75	<i>E faecium</i>	7.37	7.13	6.70	6.00	5.80	6.60	10.00	20.00	45.00	50.00	58.00
S76	<i>E faecium</i>	7.37	7.06	6.66	5.95	5.90	6.59	20.00	22.00	60.00	50.00	60.00
S77	<i>E faecium</i>	7.41	7.06	6.70	5.95	5.50	6.52	25.00	25.00	40.00	48.00	47.00
S78	<i>E faecium</i>	7.32	7.11	6.24	5.90	5.91	6.50	13.00	15.00	49.00	40.00	47.00
S79	<i>E faecium</i>	7.31	7.20	6.34	5.77	5.77	6.48	12.00	20.00	40.00	45.00	57.00
S80	<i>E faecium</i>	7.32	7.06	6.29	5.93	5.75	6.47	18.00	20.00	40.00	55.00	52.00
S81	<i>E faecium</i>	7.33	7.22	6.50	5.94	5.75	6.55	15.00	20.00	40.00	49.00	55.00
S82	<i>E faecium</i>	7.30	7.05	6.35	5.90	5.74	6.47	15.00	20.00	40.00	45.00	50.00
S83	<i>E avium</i>	7.29	7.35	6.66	6.39	5.78	6.69	50.00	22.00	50.00	42.00	57.00

S84	<i>A viridans 1</i>	7.30	7.41	6.72	6.49	5.92	6.77	27.00	38.00	40.00	35.00	49.00
S85	<i>A viridans 1</i>	7.28	7.35	6.66	6.40	5.90	6.72	23.00	23.00	35.00	34.00	52.00
S86	<i>E faecium</i>	7.22	7.37	6.73	6.31	5.84	6.69	35.00	24.00	45.00	45.00	46.00
S87	<i>A viridans 1</i>	7.27	7.21	6.76	6.43	6.09	6.75	25.00	22.00	30.00	43.00	41.00
S88	<i>E faecium</i>	7.25	7.33	6.72	6.22	5.81	6.67	23.00	31.00	30.00	43.00	43.00
S89	<i>E faecium</i>	7.31	7.25	6.75	6.45	5.98	6.75	26.00	21.00	38.00	44.00	39.00
S90	<i>E faecium</i>	7.33	7.37	6.74	6.42	5.68	6.71	22.00	22.00	40.00	43.00	52.00
S91	<i>E faecium</i>	7.32	7.16	6.77	6.28	5.83	6.67	23.00	29.00	40.00	53.00	60.00
S92	<i>E faecium</i>	7.28	7.22	6.68	6.24	5.74	6.63	23.00	25.00	40.00	42.00	44.00
S93	<i>E gallinarum</i>	7.33	7.22	6.52	6.12	5.85	6.61	25.00	16.00	36.00	40.00	37.00
S94	<i>E gallinarum</i>	7.37	7.18	6.55	6.17	5.70	6.59	24.00	19.00	33.00	40.00	47.00
S95	<i>E faecium</i>	7.23	7.24	6.59	6.14	5.93	6.62	25.00	25.00	35.00	40.00	43.00
S96	<i>S uberis</i>	7.26	7.29	6.53	6.27	5.77	6.62	24.00	15.00	34.00	40.00	32.00
S97	<i>E faecium</i>	7.28	7.25	6.57	6.37	5.91	6.68	24.00	28.00	38.00	40.00	43.00
S98	<i>E faecium</i>	7.22	7.28	6.42	6.38	5.74	6.61	27.00	24.00	47.00	30.00	43.00
S99	<i>E faecium</i>	7.37	7.24	6.56	6.39	5.89	6.69	25.00	32.00	30.00	30.00	33.00
S100	<i>E faecalis</i>	7.34	7.28	6.62	6.34	5.79	6.67	27.00	30.00	40.00	35.00	35.00
S101	<i>E faecium</i>	7.28	7.21	6.56	6.33	5.89	6.65	27.00	21.00	50.00	30.00	45.00
S102	<i>E faecium</i>	7.25	7.27	6.55	6.32	5.72	6.62	20.00	26.00	30.00	37.00	38.00
S103	<i>E faecium</i>	7.29	7.27	6.72	6.33	5.91	6.70	24.00	21.00	40.00	34.00	45.00
S104	<i>E faecium</i>	7.26	7.30	6.60	6.23	5.68	6.61	24.00	35.00	46.00	35.00	40.00
S105	<i>E faecium</i>	7.32	7.38	6.60	6.33	5.75	6.67	27.00	32.00	40.00	30.00	44.00
S106	<i>E faecium</i>	7.31	7.31	6.44	6.20	5.72	6.60	27.00	26.00	40.00	30.00	44.00
S107	<i>E faecium</i>	7.30	7.26	6.53	6.35	5.85	6.66	35.00	26.00	40.00	35.00	44.00
S108	<i>E faecium</i>	7.27	7.25	6.53	6.25	5.81	6.62	30.00	25.00	37.00	36.00	48.20
S109	<i>E gallinarum</i>	7.22	7.23	6.57	6.39	5.80	6.64	26.00	24.00	50.00	35.00	50.00
S110	<i>E gallinarum</i>	7.32	7.30	6.51	6.30	5.80	6.64	31.00	25.00	46.00	45.00	47.00
S111	<i>E faecium</i>	7.24	7.24	6.63	6.40	5.74	6.65	30.00	26.00	53.00	50.00	48.00
S112	<i>E faecium</i>	7.31	7.16	6.59	6.26	5.88	6.64	27.00	23.00	46.00	47.00	56.00

S113	<i>E faecium</i>	7.24	7.14	6.25	6.14	5.78	6.51	38.00	29.00	53.00	45.00	53.00
S114	<i>E gallinarum</i>	7.22	7.15	6.37	6.02	5.54	6.46	32.00	29.00	53.00	30.00	60.00
S115	<i>E faecium</i>	7.36	7.43	6.57	6.37	5.48	6.64	30.00	19.00	50.00	37.00	75.00
S116	<i>E gallinarum</i>	7.18	7.29	6.20	6.19	5.75	6.52	31.00	23.00	53.00	40.00	52.00
S117	<i>E gallinarum</i>	7.28	7.33	6.04	6.13	5.69	6.49	30.00	23.00	51.00	40.00	40.00
S118	<i>E faecium</i>	7.26	7.27	6.49	6.22	5.86	6.62	32.00	22.00	40.00	35.00	45.00
S119	<i>E faecium</i>	7.22	7.35	6.57	6.35	5.97	6.69	25.00	27.00	44.00	37.00	46.00
S120	<i>E gallinarum</i>	7.19	7.33	6.31	6.54	5.71	6.61	25.00	20.00	35.00	33.00	53.00
S121	<i>E faecium</i>	7.21	7.37	6.38	6.26	5.99	6.64	25.00	26.00	45.00	33.00	46.00
S122	<i>E gallinarum</i>	7.27	7.31	6.33	6.23	5.76	6.58	28.00	23.00	38.00	35.00	41.00
S123	<i>E faecium</i>	7.20	7.36	6.39	6.37	5.81	6.63	30.00	20.00	42.00	35.00	43.00
S124	<i>E faecium</i>	7.23	7.32	6.35	6.27	5.73	6.58	32.00	27.00	44.00	40.00	46.00
	Moyenne	7.27	7.20	6.55	6.29	5.94	6.65	22.88	25.03	44.50	40.35	48.12

Annexe E (Identification physiologique des isolats)

Code	Catalase	Forme	Gram	Milieu CATC	Tests de température (C°)				NaCl (%)			Croissance à pH			Esculine	Mobilité Mannitol	Hémolyse	Gélatinase
					10 °C	45 °C	50 °C	Thermorésistance à 63°C	4,5%	6,5%	9%	4,5	6,5	9,6				
ER	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S1	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S2	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	+
S3	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S4	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S5	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S6	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S7	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S8	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S9	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-/-	NH	-
S10	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S11	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S12	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S13	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-/-	NH	-
S14	-	Cocci	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S15	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S16	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S17	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S18	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S19	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S20	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S21	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S22	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S23	-	Cocci	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S24	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S25	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S26	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S27	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S28	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S29	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S30	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S31	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S32	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S33	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S34	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S35	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S36	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S37	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S38	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S39	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	-
S40	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S41	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S42	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S43	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S44	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S45	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	+
S46	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S47	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S48	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S49	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S50	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S51	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S52	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S53	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	+
S54	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S55	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S56	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S57	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S58	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S59	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S60	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S61	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S62	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S63	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S64	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S65	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S66	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S67	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S68	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S69	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S70	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S71	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S72	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S73	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S74	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S75	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S76	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S77	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S78	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S79	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S80	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S81	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S82	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S83	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S84	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S85	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S86	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S87	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S88	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S89	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S90	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S91	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	β	+
S92	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S93	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S94	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S95	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S96	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S97	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S98	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	NH	-
S99	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S100	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S101	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S102	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S103	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S104	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S105	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S106	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S107	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S108	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S109	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S110	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S111	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S112	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S113	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S114	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S115	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S116	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+
S117	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S118	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-

S119	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S120	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S121	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S122	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S123	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	-
S124	-	Cocci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	NH	+

Annexe F (identification biochimique par la galerie API 20 STREP)

Code	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	Identification
ER	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. avium</i>
S2	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S3	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>S. uberis</i>
S4	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S5	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S6	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S7	+	+	+	+	+	-	+			+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S8	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S9	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S10	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S11	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
S12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S13	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S14	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S15	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S16	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S17	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S18	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S19	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
S20	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>

S21	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S22	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S23	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S24	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S25	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. avium</i>
S26	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. avium</i>
S27	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
S28	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S29	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S30	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	-	+	+		+	+		<i>E. gallinarum</i>
S31	+	+	-	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+			+		<i>E. gallinarum</i>
S32	+	+	-	+			+	+	+	+	+	+	+	-	+	+			+		<i>E. gallinarum</i>
S33	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S34	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+		+	+		+	+		<i>E. gallinarum</i>
S35	+	+	-	+	-		+	-	+	+	+	+	+	-	+	+		+	+		<i>E. gallinarum</i>
S36	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+		+	+		+	+		<i>E. gallinarum</i>
S37	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		<i>E. gallinarum</i>
S38	+	+	-	+	-		+	-	+	+	+	+	+	-	+	+		+	+		<i>E. gallinarum</i>
S39	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecalis</i>
S40	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>L. lactis ssp lactis</i>
S41	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S42	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S43	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S44	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>E. avium</i>
S45	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S46	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S47	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>E. faecium</i>

S48	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S49	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S50	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>E. avium</i>
S51	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
S52	+	-	+	+	-	-	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>E. avium</i>
S53	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S54	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S55	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S56	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S57	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S58	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S59	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S60	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S61	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
S62	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S63	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S64	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S65	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S66	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S67	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S68	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S69	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S70	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>
S71	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S72	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S73	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S74	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S75	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S76	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>

S77	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S78	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S79	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S80	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S81	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S82	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S83	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. avium</i>
S84	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>A. viridans 1</i>
S85	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>A. viridans 1</i>
S86	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>
S87	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>A. viridans 1</i>
S88	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S89	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S90	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S91	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S92	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S93	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S94	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S95	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S96	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>S. uberis</i>
S97	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S98	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>E. faecium</i>
S99	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S100	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecalis</i>
S101	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S102	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S103	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S104	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S105	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>

S106	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S107	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S108	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S109	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S110	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S111	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S112	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S113	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S114	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S115	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S116	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S117	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S118	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S119	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S120	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S121	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S122	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. gallinarum</i>
S123	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>
S124	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	<i>E. faecium</i>

Publication

Full Length Research Paper

Antibiotic resistance of *Enterococci* isolated from raw camel milk in the South West of Algeria

Boussouar Naceur^{1*} and Boumediene Moussa Boudjemâa²

¹Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, P.O. Box 417 university of Bechar, Algeria -08000, Algeria.

²Laboratory of Food, Biomedical and Environmental Microbiology, Aboubakr Belkaid University. Tlemcen. Algeria-13000, Algeria.

Received 12 January, 2016; Accepted 1 March, 2016

Little information is available on the diversity and distribution of resistance and virulence factors in *Enterococci* isolated from camel milk. In this study, 33 samples of camel's milk collected from the south west region of Algeria were analyzed for the presence of *Enterococcus* spp. Twenty three (23) enterococcal isolates were recovered. These strains were identified by the API 20 STREP and the sodium dodecyl sulphate-polyacramide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of whole cell protein at the species level: *Enterococcus faecalis* (n = 11), *Enterococcus faecium* (n = 8), *Enterococcus avium* (n = 2), *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (n = 1) and *Streptococcus uberis* (n = 1). Fifteen (15) of the 23 isolates exhibited resistance to at least one of the tested antibiotics and six (6) of these 23 isolates were resistant to two antibiotics. None of the isolates were resistant to penicillin, ampicillin, or gentamicin. Resistance to vancomycin (VAN) was found in three (3) isolates which represent (13%), two *E. faecalis*, and one *E. faecium*. Six (26%) of *Enterococci* isolates were resistant to one of these antibiotics: erythromycin (ERI), tetracycline (TET) and rifampin (RIF). In conclusion, this is the first study to underline the importance of camel milk as a reservoir of *Enterococcus* spp. carrying resistance to vancomycin.

Key words: Camel milk, *Enterococcus*, sodium dodecyl sulphate-polyacramide gel electrophoresis (SDS-PAGE), antibiotic resistance.

INTRODUCTION

Enterococci are important members of gut communities in many animals and opportunistic pathogens that cause millions of infections annually. They are most frequently used as fecal indicator bacteria, or general indicators of fecal contamination, but they are also used as surrogates

for pathogens and/or health effects in risk assessment and other modelling applications. These bacteria are widely distributed in a variety of environmental habitats, even when there is little or no input from human and/or animal fecal sources (Byappanahalli et al., 2012). In

*Corresponding author. E-mail: nacebou@gmail.com. Tel: +213 (0) 49815244, +213 (0) 556819995.

addition, they are considered as lactic acid bacteria found in traditional fermented foods and in the dairy products (Sukontasing et al., 2007).

The prevalence of enterococci in dairy products is a result of unhygienic conditions during the production and processing of milk. *Enterococci* may enter the milk either directly from human or animal feces or indirectly from contaminated water sources, exterior of the animal and/or from the milking equipment and bulk storage tank. Different species of enterococci are found in dairy products, but *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* remain the species of greatest importance (Giraffa, 2003).

Data on the microbial diversity of raw camel milk are generally scarce compared with bovine milk. The microflora of raw and fermented camel milk products has been reported as a mix of different species of typical dairy bacteria (Christoph et al., 2012). This microflora needs to be further investigated. The environmental conditions where the milk is produced by camels and its physicochemical properties determine the group of microorganisms that can survive in such conditions. In this case, these conditions (temperature, pH, concentration of salt...) are ideal for the growth and proliferation of enterococci. The objectives of this study were to identify the species and describe the antimicrobial resistance features of *Enterococci* isolated from camels' milk.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

A total of 33 samples of camel's milk were collected from free range camel herd (*Camelus dromedarius*), in good health, living in the South West of Algeria (Bechar area). The milk was collected during the period of February, March and April, 2014 in sterile bottles, transported to the laboratory in an icebox and stored at +4 to +6°C before analysis. This work was performed in the biological laboratories, Department of Biology at the University of Bechar, Algeria.

Physiological and biochemical characterization of *Enterococcus* strains

Enterococcal isolates were obtained from camel's milk. Growth characteristics were tested in de Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS), Citrate Azide agar (CA) and Citrate Azide Tween Carbonate medium (CATC) (Domig, 2003). These isolates were first phenotypically described by using conventional growth and physiological tests, according to Devriese et al. (2006). All cultures were examined for ability to grow on potassium tellurite 0.04%, for hydrolysis of esculin and for gelatine liquefaction. Production of hemolysis was determined by plating actively growing cells of the strains onto Columbia blood agar (Oxoid) supplemented with 5% (v/v) human blood. Plates were incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere. Results were recorded at 24 and 72 h. A clear zone of β -hemolysis on blood agar plates was considered as positive result.

The type strain for *E. faecalis* ATCC 29212 was obtained from the American Type Culture Collection. Stock cultures were maintained on MRS broth supplemented with 30% glycerol and

stored at -20°C. After that, all isolated strains were tested with API 20 STREP galleries according to the manufacturer's instructions (BioMérieux), and identified using the analytical profile index. Physiological and biochemical characteristics were coded as 0 for negative and 1 for positive and analyzed by the software package BioNumerics version 7.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Agglomerative clustering was performed by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Analysis of whole-cell protein profiles by SDS-PAGE

Preparation of samples and analysis of whole-cell protein profiles by conventional one-dimensional sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were performed as described by Merquior et al. (1994), with slight modification where the strains used for protein extraction were first plated onto CATC medium, then they were grown on brain heart infusion broth instead of Columbia blood agar. Coefficients of similarity or dice indices between isolates and the Enterococcal reference strain were determined for each isolate by using the BioNumerics version 7.5 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), and a dendrogram was constructed from the similarity matrix by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The whole-cell protein extract of *E. faecalis* ATCC 29212 was used as reference profile.

Antibiotic susceptibility test

All isolates were tested for their antibiotic susceptibility by a disc diffusion method on Mueller-Hinton agar. Seven antibiotics were used: penicillin 10 U (PEN), ampicillin 10 μ g (AMP), vancomycin 30 μ g (VAN), erythromycin 15 μ g (ERI), tetracycline 30 μ g (TET), rifampin 5 μ g (RIF) and gentamicin 120 μ g (GEN). The diameter of inhibition zones were measured after incubation for 24 h at 35°C. Sensitivity and resistance were evaluated according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2014). Antibiotic resistance data expressed in millimeters (mm) of inhibition zone were first converted to categories (S for susceptible, I for intermediate, and R for resistant), then a dendrogram was constructed from the similarity matrix by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) using the BioNumerics version 7.5 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

RESULTS

Isolation of *Enterococcus* strains

A total of 23 isolates of Enterococcal strains was isolated from camel's milk. As CATC medium is selective for enterococci, all Gram-positive, catalase-negative cocci isolated from this medium were presumptively identified as *Enterococcus* spp. The presumptive identification showed that all isolates were morphologically homogeneous, they were spherical or ovoid cells occurring in pairs or short chains, non-motile, and they were gram positive catalase negative.

Physiological and biochemical identification

All isolated strains showed the same physiological characteristics, they grew in MRS broth containing 6.5%

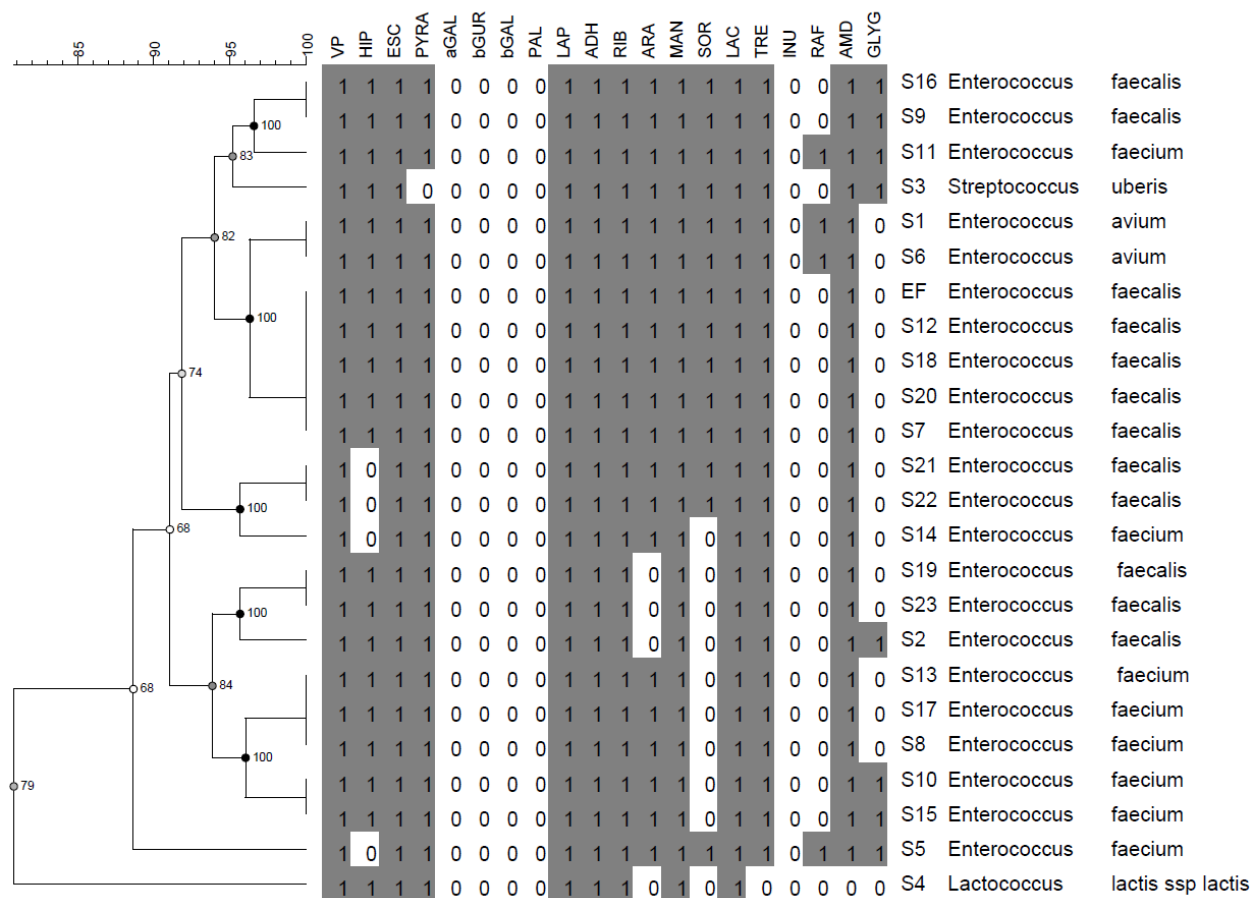


Figure 1. Results of the API 20 STREP tests represented as a clusters of biochemical profiles of the camel's milk enterococci isolates. (EF indicate reference strain).

NaCl, at pH 9.6 which is in accordance with the genus *Enterococcus*, and they grew at 10 and 45°C and resists 30 min at 63°C. They are positive for hydrolysis of esculin and negative for hydrolysis of gelatin and they do not show any tolerance for potassium tellurite. For hemolysis on blood agar they showed negative results.

API 20 strep system identification

All of the isolates were Vogues-Proskauer (VP), hippurate (HIP) (except for isolates: S5, S14, S21, and S22), esculin (ESC), pyrrolidonylarylamidase (PYRA) (except for isolate S3), leucine arylamidase (LAP), and arginine dihydrolase (ADH) positives, but negatives for alkaline phosphatase (PAL), α-galactosidase (α-GAL), β-glucuronidase (β-GUR), and β-galactosidase (β-GAL). With the exception of S4 which was unable to use trehalose and starch, all isolates were able to produce acid from ribose, mannitol, lactose, trehalose and starch by fermentation, but they were unable to produce acid from inulin. All the other tests were strain-dependent.

These results were coded as 0 for negative and 1 for positive and analysed by the software package BioNumerics version 7.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), and clusters for species identification were depicted taking into account the clustering pattern of reference strain (Figure 1).

Whole-cell protein profiles identification

Whole-cell protein profiles of the isolates were compared with a type strain profile. Figure 2 shows a dendrogram that was obtained after UPGMA linkage cluster analysis of all the isolates and the type strains of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Numerical analysis of the electrophoretic whole-cell protein profiles of the 23 camel's milk isolates and reference strain (*E. faecalis* ATCC 29212) by the determination of the dice correlation coefficient and UPGMA clustering, revealed that at the 65% similarity (S) level, the 23 isolates formed three distinct clusters as shown in the dendrogram (Figure 2). Cluster 1 with (71% r-value) grouped 8 isolates, five

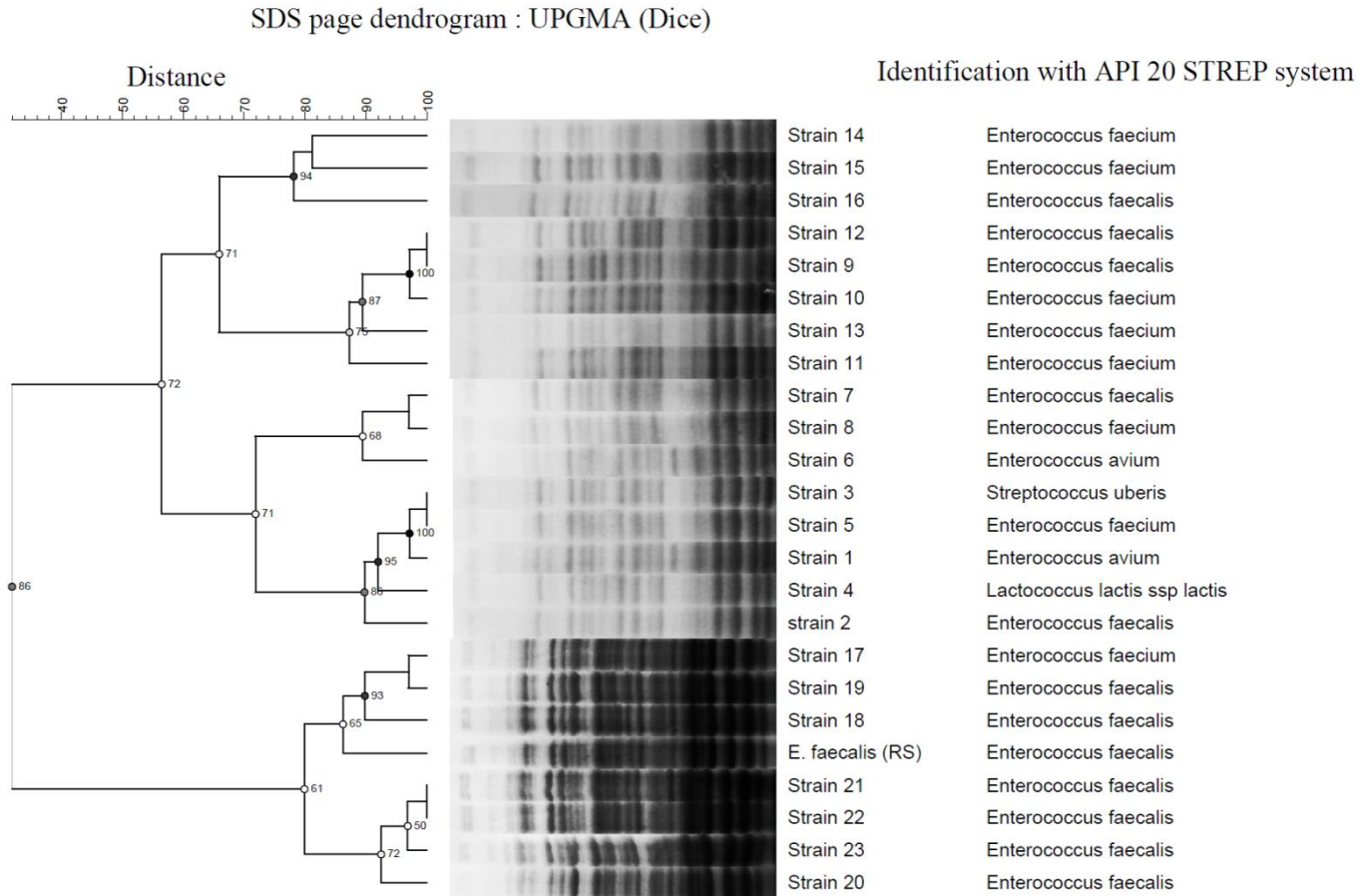


Figure 2. Electrophoretic banding patterns of whole cell protein of *Enterococcus* isolates; the mean correlation coefficient (r), represented as a dendrogram, and calculated by the unweighted average pair grouping method for some of the camel milk isolates compared with the reference strain. (RS indicates reference strain).

(S10, S11, S13, S14, and S15) were identified by the API 20 STREP system as *Enterococcus faecium*, and three (S9, S12, S16) were identified by the same system as *E. faecalis*. Cluster 2 with (71% r -value) grouped 8 isolates, two (S2, S7) were identified as *E. faecalis*, two (S5, S8) were identified as *E. faecium*, another two isolates (S1, S6) were identified as *E. avium*, one isolate (S3) was identified as *Streptococcus uberis*, and the last one (S4) was identified as *Lactococcus lactis ssp lactis*. Cluster 3 with 61% r -value also grouped 7 isolates with the reference strain, six isolates (S18, S19, S20, S21, S22, and S23) were identified as *E. faecalis*, and one isolate (S17) was identified as *E. faecium*.

Antibiotic susceptibility

Analysis of the antibiotic susceptibility of the isolates revealed that 15 of the 23 isolates exhibited resistance to at least one of tested antibiotics and 06 of these 23 isolates were resistant to two antibiotics. None of the isolates were resistant to penicillin, ampicillin, or

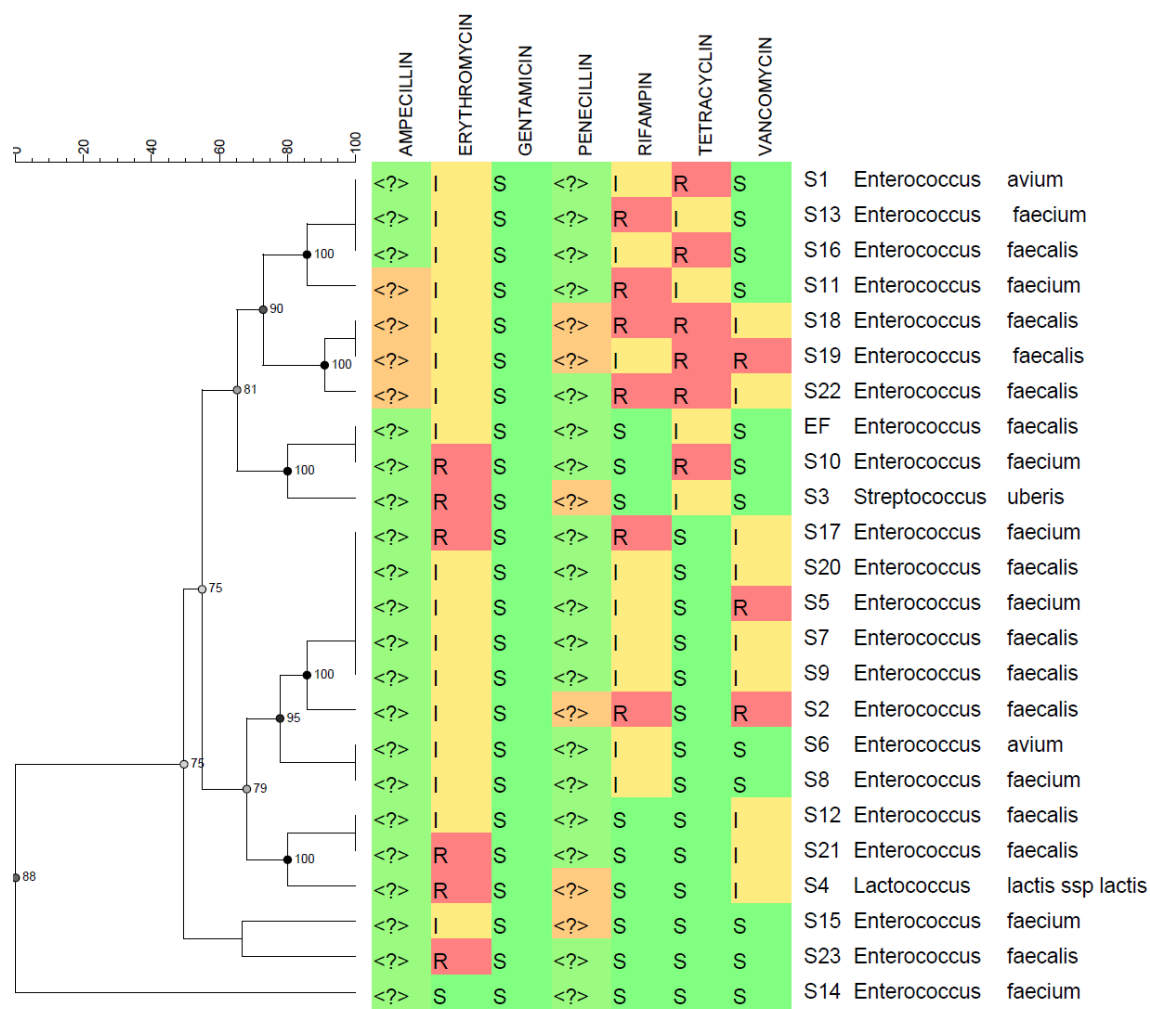
gentamicin. Resistance to vancomycin was found in three isolates, two (S2, S19) were identified as *E. faecalis*, and the other one (S5) was identified as *E. faecium*. Six isolates were resistant to erythromycin, two were identified as *E. faecalis* (S21, S23), two were identified as *E. faecium* (S10, S17), one was identified as *Streptococcus uberis*, and the last one isolate was identified as *L. lactis ssp lactis*. Six isolates were resistant to rifampin, three were identified as *E. faecalis* (S2, S18, S22), and the remaining three were identified as *E. faecium* (S11, S13, S17). Six isolates were found to be resistant to tetracycline, four were identified as *E. faecalis* (S16, S18, S19, and S22), one as *E. faecium* (S10), and the other one as *E. avium* (S1). It was found that only 34.78% of the isolates were susceptible to all tested antibiotics. The susceptibility results and patterns of all isolates tested are shown in (Table 1 and Figure 3).

DISCUSSION

Camel milk is a valuable product for the nomads in the

Table 1. Antibiotic susceptibility of enterococcal strains isolated from Camels' milk (n=23).

Antibiotics	Resistant (%)	Intermediate (%)	Sensitive
Ampicillin (10 µg)	0 (0)	4 (17)	19 (83)
Erythromycin (15 µg)	6 (26)	16 (70)	1 (4)
Gentamicin (120 µg)	0 (0)	0 (0)	23 (100)
Penicillin (10 U)	0 (0)	6 (26)	17 (74)
Rifampin (5 µg)	6 (26)	9 (39)	8 (35)
Tetracycline (30 µg)	6 (26)	3 (13)	14 (61)
Vancomycin (30 µg)	3 (13)	9 (39)	11 (48)

**Figure 3.** Antibiotic resistance profiling; *Enterococci* isolates are typically clustered based on their resistance categories using a categorical coefficient, which treats different values as different states. The colors in the comparison window correspond to the color of each antibiotic category (susceptible, intermediate or resistant). (EF indicate reference strain).

hot regions and arid countries, consumed as fresh and soured milk, this product has long been ignored and under-estimated, and it has not had its share of chance in the scientific research, when comparing it with the cow's

milk that has been widely studied. The research done so far on the camel milk do not cover all aspects, studies carried out between 1997 and 2009 have been mainly concentrated on the composition, characteristics and

functionality of the camel milk (Al haj and Al Kanhal, 2010). Nevertheless, the data on the microbial diversity of camel milk are insufficient. For this purpose, an attempt was made in the current study to identify the enterococci present in camel's milk at species level and to investigate some potential pathogenic factors of these bacteria, such as hemolysis on human blood, and antibiotic resistance. The choice of enterococci was established based on their capacity to withstand harsh conditions such as drying, heat stress, and UV irradiation prevailing in the regions from where camel's milk samples were taken.

Analysis of results from physiological and biochemical tests was performed to determine characteristics that are usually considered as typical for the genus *Enterococcus*, such as growth at 45°C, 10°C, pH 9.6 and with 6.5% NaCl, and to allow a preliminary characterization of the isolates. Our isolates have given the same results of physiological tests which allow to classify them in the genus *Enterococcus* without exception, while the results of biochemical tests obtained from the API 20 STREP system have shown some differentiation between isolates, in which 11 (48%) species were identified as *E. faecalis*, 8 (35%) species as *E. faecium*, 2 (9%) species as *E. avium*, 1 (4%) species as *L. lactis ssp lactis*, and 1 (4%) species as *S. uberis*.

A number of studies on the API 20 Strep method showed that the majority of *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* and *E. durans* strains isolated of a clinical origin are correctly identified (Winston et al., 2004). However, because this system was developed prior to the recent taxonomy changes, some identifications may be in error, especially for species other than *E. faecalis* and for "Enterococcus-like" strains (Maria et al., 2002).

Clearly, a reliable identification of enterococci to the species and strain level by physiological and biochemical tests often appears difficult. Besides being very time consuming, this type of work yielded results that, in terms of a taxonomic identification, did not always match the results obtained by other methods. However, given the variability in the biochemical and phenotypic traits of enterococci, molecular based methods are essential for reliable and fast identification. SDS-PAGE analysis of whole-cell protein patterns is useful for clearly discriminating a multitude of species of lactic acid bacteria (Descheemaeker et al., 2000). It is equally possible to differentiate and identify *Enterococcus* species (Merquior et al., 1994). To clarify the identification of our isolates, electrophoretic analysis of the whole-cell protein profiles was performed. The profiles generated are shown in Figure 2. The results obtained show some discrepancies between results obtained by conventional phenotypic, API 20 STREP and SDS page profiling. Merquior et al. (1994) used and evaluated SDS-PAGE to identify reference, human, animal and environmental strains of *Enterococcus* species. They reported that each *Enterococcus* species had a unique and distinguishable profile. However, the

limit of SDS-PAGE of the whole-cell protein profiles is that it requires several type of strains to clearly identify all isolates, our study is limited to one type strain *E. faecalis* ATCC 29212. Despite this it was found that 58% of isolates identified by API 20 STREP as *E. faecalis* were confirmed by whole-cell protein profiling that they belong to this species. The remaining 42% of isolates requires the use of other reference strains. Application of the whole-cell protein profiles analysis for enterococcal characterization requires standardization of reference banding patterns. In addition, a data bank of reference protein profiles could be constructed with which the protein profile of any unknown isolate could be compared. Whole-cell protein electrophoresis has widely been documented in numerous taxonomic and identification studies to be a reference method for species delineation because a high degree of similarity in whole-cell protein content is a reflection of a high degree of DNA homology, and therefore species identity (Vandamme et al., 1996).

The precise differentiation of enterococcal species has taken on additional importance because of the acquisition of resistance traits among strains, especially resistance to glycopeptides. To the best of our knowledge, this study provides the first detailed analysis about the ecology of antibiotic resistance and virulence in a variety of enterococci isolated from fresh raw camel milk in North Africa. The antibiotic susceptibility testing was performed according to standard disc diffusion method (Kirby–Bauer disc diffusion method) recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Because of the limitation of techniques used to evaluate the antibiotic susceptibility, some studies have been conducted by Lee and Chung (2015), Edelmann et al. (2007) and Dickert et al. (1981) to determine the most appropriate method for antibiotic susceptibility testing, and they concluded that disk diffusion is still a valid technique and gives results that are closely similar to other techniques. It is important to develop an easy-to perform methodology that can be routinely used in the laboratory, but careful consideration regarding not only accuracy, but also cost and labor intensiveness is required.

Enterococci are known to acquire antibiotic resistance to most antibiotics used in clinical practice with relative ease and capable of spreading those resistance genes to other species (Kaçmaz and Aksoy, 2005). The occurrence of antibiotic resistance among dairy isolates seems to vary somewhat between studies, and is often strain- and region-dependent (Čanžek et al., 2005), or may differ according to the isolation method (Klein, 2003).

Our results of antibiotic susceptibility are summarized in Table 1 and Figure 3. They showed that 26% of enterococci isolates were resistant to one of these antibiotics erythromycin (ERI), tetracycline (TET), and rifampin (RIF). Teuber et al. (1999) found 64, 45 and 32% of resistance to chloramphenicol, tetracycline and

erythromycin, respectively, and they concluded that these antibiotics are a major concern for dairy *E. faecalis* isolates. Resistance to erythromycin as a representative of the macrolide antibiotics is a matter of concern. Although de Fatima Silva Lopes et al. (2005) have determined that a high percentage of *E. faecalis* strains (74%) were intermediary or resistant to erythromycin. In Poland, Wioleta et al. (2012) reported a similar prevalence of resistance to tetracycline (28.3% of isolated strains) to our study.

The most widespread resistance among dairy enterococci was tetracycline which was detected in 30.8% of the strains, this may be attributed to the widespread use of these antibiotics in veterinary practices (Pieniz et al., 2015). Huys et al. (2004) also showed that a significant proportion of tetracycline isolates exhibited co-resistance to erythromycin and/or chloramphenicol, suggesting that the selection of tetracycline genotypes may provide a suitable molecular basis for the further selection of multiple resistances. However, it should be noted that resistance to tetracycline has little clinical importance as it is not a drug of choice for the treatment of enterococcal infection. A major concern is the emergence of vancomycin resistant *Enterococci* (VRE). Vancomycin is considered as the last resort antibiotic to treat serious infections due to resistant Gram-positive bacteria, and given exclusively in a clinical environment, when all others fail. (Naoual et al., 2010).

Several studies showed the occurrence of vancomycin-resistant enterococci in food of animal origin, mainly in *E. faecalis* and *E. faecium* species, although the isolation frequency seems to be lower than in clinical samples (Klein, 2003). In our case three (3) vancomycin resistant enterococci (VRE) were found which represent 13% of all isolated strains, two (S2, S19) were identified as *E. faecalis*, and one (S5) was identified as *E. faecium*. According to Morandi et al. (2006), testing antibiotic susceptibility to vancomycin by disc diffusion method provide similar results as growth in MRS broth containing vancomycin.

Vancomycin resistance within dairy enterococci remains controversial, though several papers indicate very low or no presence of *vanA* and *vanB* resistance genes in enterococci isolated from cheese (Jurkovic et al., 2006). In another paper *vanA* gene was found in 37% of the dairy enterococci examined which, however, were all susceptible to vancomycin (Ribeiro et al., 2007). For the first time in Egypt, *E. faecalis* and *E. faecium* vancomycin-resistant strains were reported from food of animal origin by Hammad et al. (2015), which is in agreement with our finding.

The emergence of enterococci resistance to glycopeptides, including vancomycin and teicoplanin, in many of developed countries is attributed to a dual development that included clinical overuse and cross-resistance, following the use of avoparcin as an animal growth promoter (Koluman et al., 2009). Although

enterococci are generally regarded as being intrinsically resistant to low levels of gentamicin, a high-level gentamicin resistance was detected in many dairy isolates (Giraffa, 2003; Hummel et al., 2007). All strains isolated in our study are susceptible to gentamicin. There are a few studies that investigate the spread of antibiotic resistance genes in camel's milk and it is very surprising to find vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) in camel milk, knowing that this animal survives in areas far from the urban area. Camel pastoralists are nomadic, a matter which may explain the presence of enterococci isolates resistant to vancomycin, it is possible that these pastoralists carry strains resistant to vancomycin, as they are the only contact between urban centers and grazing areas where camels located. Or enterococci isolated from camel milk are intrinsically resistant to vancomycin. It is a hypothesis that needs to be verified. A hypothesis that could be confirmed by means of the additional molecular studies that are under way at our laboratory.

Conclusion

Camel milk is a very rich ecosystem that needs to be investigated. However, it has been long neglected, and has not had the opportunity to be a subject of large scale research. The results of the present study show that analysis of soluble whole-cell proteins can be used to discriminate between species of *Enterococcus* isolated from camel milk that are usually hard to differentiate by physiologic tests. Also there have been very few systematic studies to investigate acquired antibiotic resistance in enterococci of Camel's milk origin. We were surprised to discover in the camel milk the presence of vancomycin resistant enterococci, something that is scary. Fortunately, the incidence of penicillin, ampicillin and gentamicin resistance for all isolated strains was low, indicating that most of the strains tested did not acquire resistance determinants for these antibiotics. These results are about to be verified and validated by molecular techniques.

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the laboratories of the Biology Department, University of Bechar, Algeria for their assistance.

REFERENCES

- Al haj OA, Al Kanhal HA (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. Int. Dairy J. 20:811-821.

- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ (2012). *Enterococci* in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:685-706.
- Čanžek Majhenič A, Rogelj I, Perko B (2005). *Enterococci* from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int. J. Food Microbiol.* 102:239-244.
- Christoph J, Joséphine B, Patrick, Christophe L, Leo M (2012). Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *Food Sci. Technol.* 47:371-379.
- CLSI (2014). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 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.
- Descheemaeker P, Van Loock F, Hauchecorne M, Vandamme P, Goossens H (2000). Molecular characterization of group "A" streptococci from invasive and non-invasive disease episodes in Belgium during 1993-1994. *J. Med. Microbiol.* 49:467-471.
- Devriese L, Baele M, Butaye P (2006). The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*. Dworkin PDM, editor. LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA: Springer Science+Business Media, pp. 163-174.
- Dickert H, Machka K, Braveny I (1981). The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. *Infection* 9:18-24.
- Domig K (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88:147-164.
- Edelmann A, Pietzcker T, Wellinghausen N (2007). Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J. Med. Microbiol.* 56:202-207.
- Giraffa G (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88:215-222.
- Hammad AM, Hassan HA, Shimamoto T (2015). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control* 50:815-820.
- Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:730-739.
- Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J (2004). Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1555-1562.
- Jurkovic D, Krizkova L, Dusinsky R, Belicova A, Sojka M, Krajcovic J, Ebringer L (2006). Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:553-559.
- Kaçmaz B, Aksoy A (2005). Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25:535-538.
- Klein G (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88:123-131.
- Koluman A, Akan LS, Çakiroğlu FP (2009). Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control* 20:281-283.
- Lee M, Chung HS (2015). Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. *J. Microbiol. Meth.* 112:87-91.
- Maria CG, Franco I, Tornadijo ME, Carballo J (2002). Identification of enterococci isolated from cow's milk cheese: comparison of the classical methods and the api 20 strep system. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49:119-128.
- Merquior VL, Peralta JM, Facklam RR, Teixeira LM (1994). Analysis of Electrophoretic Whole-Cell Protein Profiles as a Tool for Characterization of *Enterococcus* Species. *Curr. Microbiol.* 28:149-153.
- Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int. Dairy J.* 16:867-875.
- Naoual J, Abdelaziz B, Roberta C, Daga E, Bouksaim M (2010). Characterization of *Enterococci* isolated from Moroccan dairy products. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:1768-1774.
- Pieniz S, de Moura TM, Cassenego AP, Andrezza R, Frazzon AP, Camargo FA, Brandelli A (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control* 51:49-54.
- Ribeiro T, Abrantes M, Lopes MF, Crespo MT (2007). Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry vanA and vanB genes. *Int. J. Food Microbiol.* 113:289-295.
- Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Lee JS, Suzuki K (2007). *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2151-2154.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:115-137.
- Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, Pensart N, Ieven M, Pot B, Leclercq R, Goossens H (1996). Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J. Clin Microbiol.* 34:2572-2576.
- Winston LG, Pang S, Haller BL, Wong M, Chambers HF, Perdreau RF (2004). API 20 strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:287-288.
- Wioleta CW, Anna Z, Nalepa B, Laniewska-Trokenheim L (2012). Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in ready-to-eat food of animal origin. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6:6773-6780.

