



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCCEN
*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers*
Département de Biologie



**Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agralimentaire, au Biomédical et à
l'Environnement**

مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطبي والبيئة

MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

Boukhatem Louiza

Intitulé du Thème

**Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif non
fermentants isolés au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen**

Soutenue le : 27 Juin 2013

Devant le Jury composé de :

M^{me} Ghembazza. L

Maître Assistante A

Présidente

M^f Drissi. M

Maître de Conférences A

Promoteur

M^f Belyagoubi. L

Maître Assistant B

Examineur

Année Universitaire : 2012-2013

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études

A

Mes très chers et adorables parents qui m'ont toujours fort encouragé et aider dans la recherche du savoir durant tout mon parcours avec beaucoup de tendresse de dévouement de gentillesse d'amour, et leurs affections et qui ont toujours éclairé mes chemins.

Mon unique petit frère Mohamed Rafik.

Mes tendres sœurs Meriem, Hadjer et Nour Elhouda pour leurs amours et leurs générosités.

Ma grande mère ainsi que mes oncles et tantes pour leurs encouragements et toute ma famille.

Toutes mes amies en particulier Aicha, Hayem, Fadia, Khadidja, Sarah, Meriem, Nadia, Sihem.

Ainsi que toute l'équipe du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques »

Et à tous mes proches.

Remerciements

*Je tiens à remercier Dieu et mon Promoteur M^r **DRISSI M.**, maître de conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté d'encadrer mon travail, pour sa rigueur scientifique et son assistance aussi bien matérielle que morale et son soutien indéfectible.*

Je remercie également

*M^{me} **GHEMBAZZA L.** Maître assistante à l'université Abou Bekr Belkaid, qui a bien voulu honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*M^r **BELYAGOUBI L.** Maître assistant à l'Université de Tlemcen pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

Mes remerciements s'adressent également au

*Professeur **MEGUENNI K.** Pour son soutien et son aide précieuse qui m'ont été très bénéfiques tout le long de ma scolarité.*

*M^r **SNOUSAOUI Y.** Pour son aide et ses conseils.*

*M^r **SELLAH M.** Doctorant au laboratoire « Antibiotique-Antifongique » Pour ses conseils et sa disponibilité.*

Je tiens également à remercier

*M^{me} **BOUCHERIT Z.** Maître de conférences à l'université Abou Bekr Belkaid et directrice du laboratoire de recherche « LAAPSAB », et m'avoir facilité l'accès à son laboratoire.*

*M^{me} **BENHADDOUCHE R.** Chef service de réanimation.*

Ainsi que tout le personnel administratif et médical du CHU de Tlemcen qui nous ont soutenus et aidés de près ou de loin pour la réussite de ce travail.

Sommaire

Liste des tableaux	1
Liste des figures.....	2
Liste des abréviations.....	3
Introduction.....	4

Partie I : Synthèse bibliographique

1. Les antibiotiques.....	5
1.1 Les β -lactamines.....	6
1.2 Les aminosides.....	8
1.3 Les quinolones.....	8
2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	9
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
2.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11
2.4 <i>Burkholderia cepacia</i>	12
3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	12
3.1 Phénotypes de résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
3.1.1 Résistance aux β -lactamines.....	13
3.1.1.1 Résistance naturelle.....	13
3.1.1.2 Résistance acquise.....	13
3.1.2 Résistance aux aminosides	14
3.1.3 Résistance aux Fluoroquinolones	14
3.2 Phénotypes de résistance chez <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
3.2.1 Résistance aux β -lactamines	14
3.2.1.1 Résistance naturelle.....	14
3.2.1.2 Résistance acquise.....	14
3.1.2 Résistance aux aminosides	16
3.1.3 Résistance aux Fluoroquinolones	16
3.3 Phénotypes de résistance chez <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	17

3.3.1 Résistance aux β -lactamines.....	17
3.3.2 Résistance aux aminosides.....	17
3.3.3 Résistance aux Fluoroquinolones.....	17
3.4 Phénotypes de résistance chez <i>Burkholderia cepacia</i>	18

Partie II : Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	19
1.1. Matériels biologiques.....	19
1.2. Milieux de culture.....	19
1.3. Tests biochimiques.....	19
1.4. Solutions et tampons.....	19
1.5. Antibiotiques.....	20
2. Méthodes.....	21
2.1. Lieu d'étude.....	21
2.2. Prélèvements.....	21
2.3. Isolement et purification.....	21
2.4. Identification.....	21
2.4.1. Le test TSI milieu triple sucres).....	21
2.4.2. Galerie API 20NE.....	22
2.5. Conservation.....	23
2.6. Etudes de la résistance aux antibiotiques.....	23
2.6.1. Antibiogramme.....	23
2.6.2. Détermination des CMI en milieu solide	25
2.7. Test à la cloxacilline.....	26
2.8. Test de synergie.....	26
2.9. Test de Hodge.....	27
2.10. Test IMP-EDTA.....	28
2.11. Amplification de l'ADN par la technique de PCR.....	29

Partie III : Résultats et discussion

1. Résultats.....	31
1.1. Souches identifiées	31

1.1.1. Répartition des BGNnF en fonction des sites de prélèvement.....	33
1.2. Résistance aux antibiotiques des BGNnF	34
1.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	34
1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
1.3. Phénotype de résistance aux β -lactamines.....	36
1.3.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
1.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
1.4. Amplification de l'ADN par PCR.....	40
2. Discussion.....	41
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	46
Annexes.....	54

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des prélèvements selon les sites de prélèvement.....	19
Tableau 2. Intervalles de CMI ($\mu\text{g/ml}$) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux antibiotiques.....	36
Tableau 3. Phénotypes de résistance observés chez les souches de <i>P.aeruginosa</i>	39

Liste des figures

Figure 1. Différents modes d'action des antibiotiques.....	5
Figure 2. Cycle β -lactame.....	6
Figure 3. Structures simplifiées des diverses β -lactamines.....	7
Figure 4. Structure de base des quinolones et ciprofloxacine.....	9
Figure 5. Structure d'un aminoside et les sites de modification.....	16
Figure 6. Schéma de Vedel.....	24
Figure 7. Schéma d'une image de synergie.....	27
Figure 8. Lecture du test de Hodge.....	28
Figure 9. Répartition des bacilles à Gram négatif.....	31
Figure 10. Répartition des BGNnF isolés à partir du service de réanimation.....	31
Figure 11. Répartition des BGNnF isolés à partir des prélèvements sur patients.....	32
Figure 12. Répartition des BGNnF isolés à partir des prélèvements l'environnement	32
Figure 13. Répartition des souches selon les prélèvements.....	33
Figure 14. Taux de résistance aux β -lactamines d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	34
Figure 15. Taux de résistance aux autres classes d'antibiotiques d' <i>A.baumannii</i>	34
Figure 16. Taux de résistance aux β -lactamines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Figure 17. Taux de résistance aux autres classes d'antibioques de <i>P.aeruginosa</i>	36
Figure 18. Répartition des phénotypes de résistance des souches d' <i>A.baumannii</i>	37
Figure 19. Résultat du test à la Cloxacilline.....	37
Figure 20. Résultat de test de Hodge.....	38
Figure 21. Résultat du test à IMP-EDTA.....	38
Figure 22. Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines de <i>P. aeruginosa</i>	39
Figure 23. Visualisation de l'ADN génomique sur gel d'agarose.....	40

Liste des abréviations

A.b: *Acinetobacter baumannii*

API : Appareillage et Procédé d'Identification

ATCC : American type culture collection

BGN : Bactéries à Gram négatif

BGNnF : Bacilles à Gram négatif non fermentants

BHIB : Bouillon cœur cerveau

BN : Bouillon nutritif

Case : cephalosporinase

CA-SFM ; Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DO : Densité optique

LPS : Lipopolysaccharide

P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

PLP : Protéines liant les pénicillines

Pv : Prélèvement

T.S.I : Triple Sugar Iron agar

TBE : Bromure d'éthidium

UFC : Unité formant colonie

LAAPSAB : Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et

Activités Biologiques



Introduction

Au cours des cinquante dernières années, les antibiotiques ont joué un rôle crucial dans la lutte contre de nombreuses maladies et infections et leur développement a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Leur découverte a été l'une des principales causes de l'augmentation spectaculaire de l'espérance de vie moyenne durant le XX^{ième} siècle. Leur importance est d'une grande utilité pour une meilleure prise en charge de la santé publique (**Grace Yim, 2011**). Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques. Cette situation apparaît particulièrement préoccupante en milieu hospitalier. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution (**Soussy, 2007**).

Les bacilles à Gram négatif non fermentants se comportent comme pathogènes opportunistes, qui émergent ces dernières décennies comme agent d'infections nosocomiales. Leurs capacités d'acquérir et d'accumuler les facteurs de résistance s'ajoutent à un fort potentiel épidémique intra hospitalier. Ces caractéristiques en font un agent d'infections nosocomiales de prédilection particulièrement chez les sujets débilisés hospitalisés en soins intensifs (**Elouennass et al., 2008**).

Dans cette optique on a visé à effectuer cette étude au niveau du CHU de Tlemcen qui consiste à isoler et identifier une collection de bacilles à Gram négatif non fermentants isolés à partir du service de réanimation pour un objectif :

- L'évaluation des profils de résistance des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques ;
- La détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines ;
- L'analyse du support génétique de l'antibiorésistance (le gène bla_{NDM-1} qui confère la résistance aux carbapénèmes) par la technique de PCR.

Synthèse bibliographique

1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique (Lavigne, 2007), capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Perronne, 1999).

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action. L'action antibactérienne s'effectue selon quatre principaux mécanismes : une inhibition de la synthèse des constituants de la paroi, un blocage de la synthèse des protéines, un blocage de la synthèse des acides nucléiques et une altération du fonctionnement de la membrane cytoplasmique (Figure 1) (Fomba, 2006).

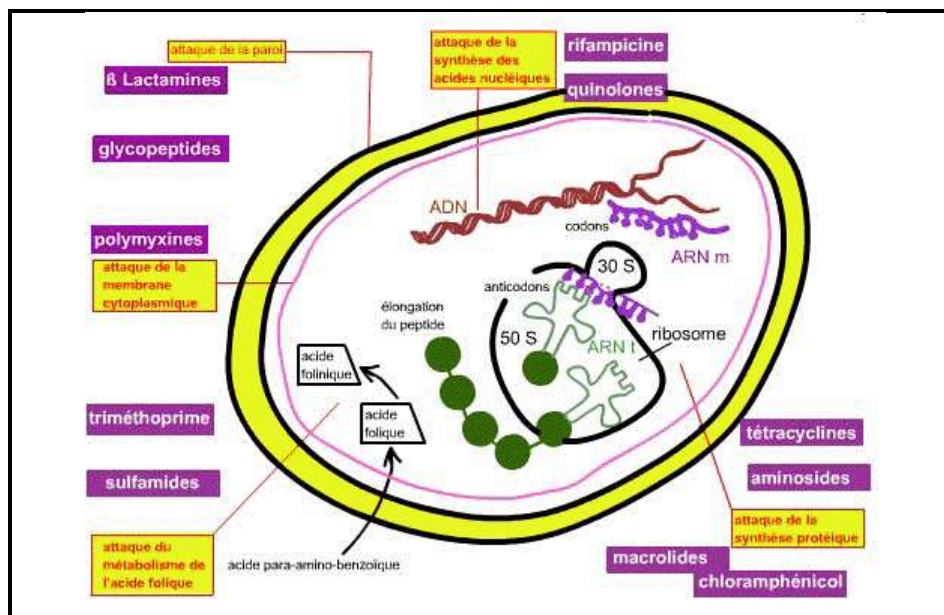


Figure 1. Différents modes d'action des antibiotiques (Lavigne, 2007).

Il existe sept classes majeures d'antibiotiques bactériens utilisés en milieu clinique : les β -lactamines, les glycolipides, les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et les sulfonamides (Nukaga et al., 2003).

1.1. Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotique la plus vaste et la plus importante, aussi bien par le nombre que par la diversité des molécules utilisables par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par une structure de base : le noyau de base est le cycle β -lactame (**Figure 2**). Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides (**Cavallo et al., 2004**).

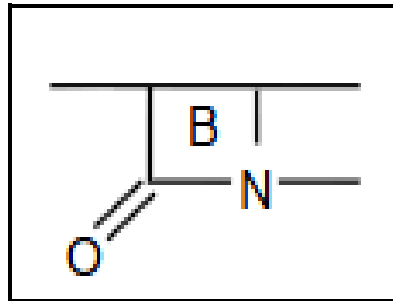


Figure 2. Cycle β -lactame (Cavallo et al., 2004).

Elles partagent une structure commune qui comprend de façon constante un cycle β -lactame et, pour la plupart d'entre elles, un second cycle (**Figure 3**). Ainsi, en fonction des cycles et des chaînes latérales associées, on distingue (**Chaabane et al., 2009**) :

- Les pénicillines également appelées les pénames : les molécules de ce groupe possèdent un cycle thiazolidine accolé au noyau β -lactame. Elles diffèrent par la nature de leur chaîne latérale (**Nauciel, 2000**).
- Les céphalosporines : constituées d'un noyau β -lactame associé à un noyau dihydrothiazine (**Yala et al., 2001**).
- Les carbapénèmes : se distinguent des pénicillines par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et une liaison insaturée en C2-C3, également présente sur les céphalosporines (**Wolff et al., 2009**).
- Les monobactames : le noyau est limité au cycle β -lactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle utilisé en clinique humaine (**Chaabane et al., 2009**).
- Les clavames : leur représentant est l'acide clavulanique. Ces molécules sont des inhibiteurs β -lactamases, ayant une structure de pénicilline mais dépourvues d'activité antibiotique significative, ont la propriété de se lier à certaines β -lactamases et de les inhiber de manière irréversible (**Perronne, 1999**).

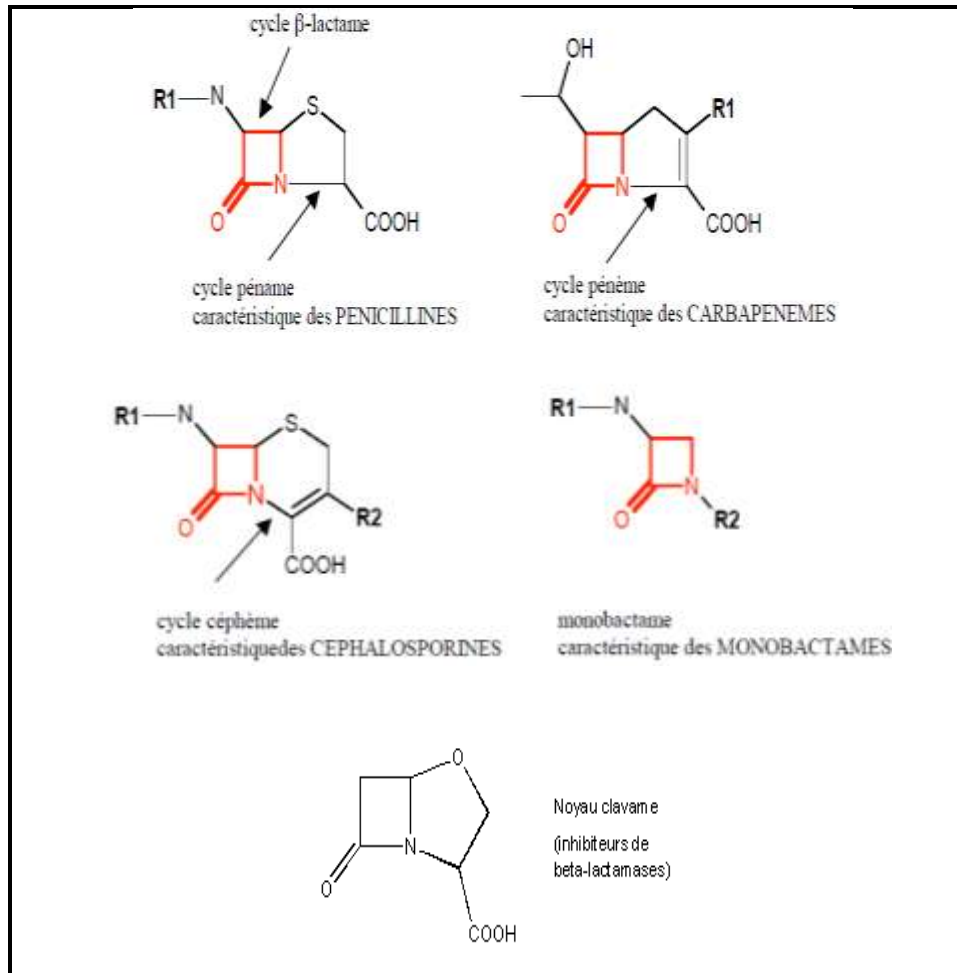


Figure 3. Structures simplifiées des diverses β -lactamines (Charlier *et al.*, 1998).

Les β -lactamines ont un mécanisme d'action identique, elles inhibent la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne en se fixant de façon covalente sur certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane, les empêchant ainsi d'assurer leurs fonctions (Cavallo *et al.*, 2004).

Ces enzymes sont situées sur la face externe de la membrane interne et sont nommées protéines liant les pénicillines ou PLP (Fauchère et Avril, 2002). Les PLP sont présentes en quantité variable (de 3 à plus de 8) selon les espèces bactériennes et présentent des affinités différentes pour chaque famille de β -lactamines (Fisher *et al.*, 2005).

1.2. Les aminosides

Les aminosides sont des molécules polycationiques (Faure, 2009). Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Il existe plusieurs

centaines de molécules naturelles et hémi-synthétiques. Elles sont classées en fonction de la structure chimique centrale en trois classes : Streptamine, 2 désoxystreptamine et Streptidine.

Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne (Yala et al., 2001). Ils se fixent sur les ribosomes et perturbent à leur niveau, la traduction des ARNm, par une altération conformationnel. Il s'ensuit des erreurs de réception des messages et l'incorporation d'acides aminés différents avec formation de protéines défectueuses d'où l'effet bactériostatique (Poisson, 1992).

1.3. Les quinolones

Les quinolones sont des agents antibactériens obtenus par synthèse chimique, dérivent de l'acide nalidixique (Page et al., 1999). Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bicyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4 (Figure 4) (Faure, 2008).

Les quinolones de première génération, dont le représentant est l'acide nalidixique, n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif et ne sont utilisées que dans le traitement des infections urinaires (Perronne, 1999). Actuellement de nouveaux composés de cette même famille d'antibiotiques ont été mis au point, dont certains additionnés d'un atome de fluor (norfloxacine, péfloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine...) (Figure 4) possèdent une activité plus étendue et sont indiqués dans le traitement des infections systémiques et tissulaires à bacilles à Gram négatif et à cocci à Gram positif (Nordmann, 2006).

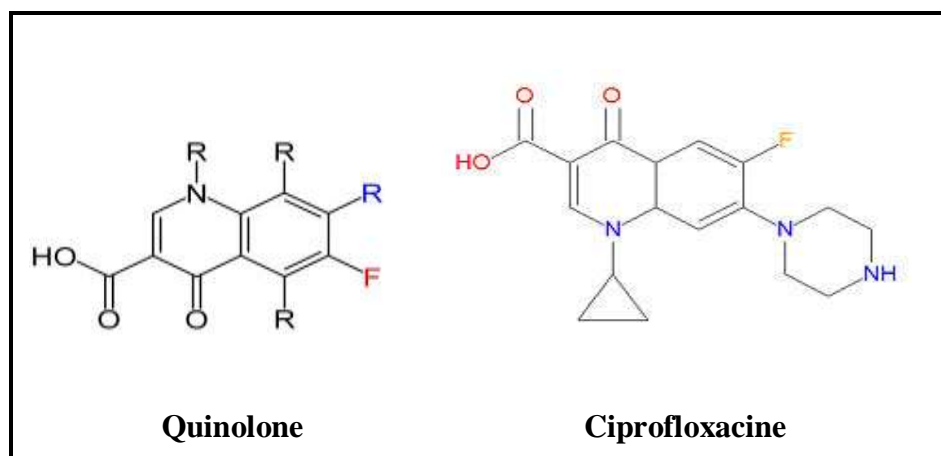


Figure 4. Structure de base des quinolones et ciprofloxacine (Faure, 2008).

Après avoir pénétré à l'intérieure des cellules bactériennes par des protéines de perméabilité spécifique, ces molécules hydrophiles inhibent les topoisomérases de type II (ADN gyrase) et IV empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire à sa réplication (Nordmann, 2006). Ces molécules interagissent avec ce complexe ADN-ADNgyrase en formant un complexe ternaire ADN-ADNgyrase-quinolone. Elles bloquent le changement conformationel de l'enzyme. Ainsi, l'ADN serait stabilisé au moment de la coupure et ne pourrait être religaturé (Mérens, 2010).

2. Les bacilles à Gram négatif non fermentants

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNnF) sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation (Richard et al., 1995).

Ce sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) et pouvant être responsables d'infections cliniques. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales. Outre la famille des *Pseudomonadaceae*, les BGNnF comportent aussi *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Flavobacterium* et *Sphingobacterium*. Au sein des *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, sont les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales (Berthelot et al., 2005). Ces bactéries caractérisées par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, et pouvant acquérir de nombreuses autres mécanismes de résistance (Enoch et al., 2007).

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, communément appelé bacille pyocyanique, est l'espèce type du genre *Pseudomonas* (Richard et Kiredjian, 1995).

P.aeruginosa est un bacille à Gram négatif, aérobic strict, à métabolisme oxydatif, non sporulé, en forme de bâtonnet de 0,5 à 0,8µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, capable de se développant sur les

milieux usuels à une température de croissance comprise entre 30°C à 37°C (Floret *et al.*, 2009). Cependant les souches d'origine humaine peuvent se développer à des températures allant jusqu'à 41°C (Yétérian, 2010). Un milieu sélectif, contenant du cétrimide, peut être utilisé afin d'isoler *Pseudomonas aeruginosa* à partir de prélèvement polymicrobiens. Les aspects des colonies sont de trois types : colonie *la* (large) sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé et un bord irrégulier, colonie *sm* (small) sont rondes, petites, convexes et lisses et colonie *M* (muqueuses) sont bombées, opaques, visqueuses, filantes ou parfois coulantes (Gellen-Dutremer, 2007).

C'est une bactérie ubiquiste, saprophyte de l'eau, des matières en décomposition et des végétaux. Ses exigences nutritionnelles modestes lui permettent de survivre et de se multiplier dans un environnement humide (éviers, siphons, certaines solutions antiseptiques) (Lahlou Amin *et al.*, 2008). Bien qu'il ne fasse pas partie physiologiquement de la flore microbienne commensale de l'homme, il peut coloniser le tube digestif, l'oropharynx et les zones cutanées humides (Richet, 2003).

P.aeruginosa est doté d'un véritable arsenal de facteurs de virulence qui sont, soit directement associés à sa cellule (flagelle, pili, LPS, alginate), soit excrétés dans le milieu extracellulaire (exotoxines, exoprotéases, hémolysines et chromophores) (Richard, 2005).

Cette espèce est caractérisée par une aptitude particulière à acquérir et à accumuler de nombreux mécanismes de résistance. Cette accumulation de mécanisme de résistance est devenue problématique car elle conduit à une impasse thérapeutique en raison de l'émergence de souches dites totorésistantes vis-à-vis du panel d'antibiotiques actuellement disponibles (Minchella *et al.*, 2010).

2.2. *Acinetobacter baumannii*

Longtemps considéré comme un représentant de la famille des *Neisseriaceae*, le genre *Acinetobacter* est actuellement inclus dans la famille des *Moraxellaceae*. Le genre *Acinetobacter* a été tardivement individualisé. Il se compose de **plusieurs espèces** (*baumannii*, *haemolyticus*, *junii*, *lwoffii*,...) (Fomba, 2006).

A.baumannii est un coccobacille à Gram négatif, non fermentant, aérobies strictes, non sporulé, parfois capsulé, immobile, possède une catalase positive et dépourvu d'oxydase. C'est une bactérie ubiquitaire, pouvant isolée à partir du sol, de l'eau, des animaux et de l'homme et capable d'utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie (Zahoun *et al.*, 2010). Cette bactérie cultive bien sur les milieux usuels à une température optimale de 30 à

32 °C. Les colonies ont un diamètre de 2 à 3 mm sur gélose ordinaire, convexes, à bords réguliers, souvent translucides (**Fomba, 2006**). *A. baumannii* s'est imposé comme un pathogène hospitalier, responsable de nombreuses infections nosocomiales sévères, causant de réelles difficultés thérapeutiques du fait de sa capacité à développer plusieurs mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques (**Baron et al, 1995**).

2.3. *Stenotrophomonas maltophilia*

La première espèce de ce genre décrite en 1961 sous le nom de *Pseudomonas maltophilia* en raison de sa ciliature multitrèche polaire et de l'acidification du maltose fut classée en 1983 comme *Xanthomonas maltophilia*. Les différences avec les *Xanthomonas* se sont révélées plus importantes que les similitudes : la création d'un nouveau genre *Stenotrophomonas* (qui se nourrit d'un faible nombre de substrats) fut proposée en 1993, comprenant *Stenotrophomonas maltophilia* comme seule espèce (**Denton et Kerr, 1998**). *Stenotrophomonas maltophilia* est un bacille aérobie strict, assez fin, de longueur moyenne (de 0,5 à 0,8 µm sur 1,5 à 3 µm) polymorphe avec une ciliature polaire multitrèche (**Niang, 2003**). Il est ubiquitaire et saprophyte de l'environnement, mais également de l'homme colonisant surtout le nez, la gorge et le tube digestif (**Lavigne, 2008**). C'est l'un des pathogènes opportuniste responsable d'infections nosocomiales, multirésistant aux antibiotiques, et affectant préférentiellement les patients immunodéprimés. Les isolats cliniques sont souvent très résistants à la plupart des antibiotiques utilisés actuellement (**Liaw et al., 2010**).

2.4. *Burkholderia cepacia*

L'espèce comme nouveau nom *Burkholderia cepacia* a été décrit pour la première fois en 1950 par Burkholder sous la dénomination de *Pseudomonas cepacia* comme une bactérie phytopathogène (oignon, riz) (**Maghdas et al., 2003**). C'est un bacille assez fin, mobile grâce à une ciliature polaire multitrèche (**Henry et al., 2001**), cultivant à une température optimale de 30°C à 35°C et capable d'assimiler un grand nombre de substrats (**Maghdas et al., 2003**). Sur gélose au sang, les colonies sont opaques, brillantes et convexes (**Segonds et al., 1995**). Par rapport à *P.aeruginosa*, *B.cepacia* produit peu de facteurs virulents dont certains sont décrits : hémolysines, protéases, exopolysaccharides, lipases et sidérophores (**Eyquem et al., 2000**). La bactérie occupe diverses niches écologiques (sols, l'eau, animaux, les plantes et les humains), possède la faculté de survie dans l'environnement hospitalier. C'est un pathogène

opportuniste fréquemment retrouvé comme agent colonisant ou infectant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Speert, 2002), il possède une résistance à de nombreux antibiotiques et désinfectants tel que polyvidone iodée et chlorhexidine (Matthaiou et al., 2011).

3. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance comme pour les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones (Berthelot et al., 2005). Ils sont capables de résister à de nombreux antibiotiques grâce à une membrane externe peu perméable et grâce au développement de nombreux mécanismes de résistances (β -lactamases, céphalosporinases, imperméabilité sélective ou non en relation avec les porines, modification des protéines liant la pénicilline, modification d'affinité de certaines enzymes...) pouvant s'associer et rendant selon les cas leur mise en évidence très difficile notamment dans le cas des systèmes d'efflux (Philippon, 1998). Ces bactéries peuvent être sélectionnées par une antibiothérapie à large spectre et devenir progressivement multirésistantes aux antibiotiques diffusant au sein des établissements de soins (Bertrand et al., 2000 ; Bonten et al., 2001). L'utilisation croissante des antibiotiques à l'hôpital a contribué à l'émergence et à la diffusion de souches d'*A.baumannii* et de *P. aeruginosa* résistantes à un grand nombre d'antibiotiques dont les β -lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones (Nordmann, 2003).

3.1. Phénotypes de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.1. Résistance aux β -lactamines

3.1.1.1. Résistance naturelle

Les souches de *P. aeruginosa* produisent d'une β -lactamase chromosomique inductible de classe C induit une résistance à l'amoxicilline, à l'acide clavulanique et aux céphalosporines de première et deuxième génération (C1G, C2G) céfalotine et céfoxitine notamment. Les souches sauvages restent sensibles aux carboxypénicillines, comme la ticarcilline et la carbénicilline, aux uréidopénicillines, comme la pipéracilline, à certaines céphalosporines (cefsulodine, céfoperazone et ceftazidime), aux monobactames, comme l'aztréonam, et aux carbapénèmes, comme l'imipénème (Poirel et Nordmann., 2006).

Le système d'efflux actif MexAB-OPrM confère à la bactérie une résistance naturelle de bas niveau à différentes β -lactamines (à l'exception de l'imipénème) (Poole, 2004).

3.1.1.2. Résistance acquise

✓ Mécanisme enzymatique

La résistance acquise aux carbapénèmes (imipénème), initialement rapportée comme liée à un déficit de la porine OprD2, peut être maintenant en relation avec la synthèse de β -lactamase de type carbapénémase (classe B) (**Philippon et Arlet., 2006**). Ces carbapénémases acquises constituent quatre groupes (IMP, VIM, SPM, GIM) (**Walsh et al., 2005**). Les β -lactamases à large spectre (BLSE) sont responsables de la résistance à la plupart des β -lactamines chez *P. aeruginosa*, sauf pour carbapénèmes dont l'hydrolyse est assurée par les métallob- β -lactamases (**Weldhagen et al., 2003**). Concernant les céphalosporines de classe C, des mutations dans le système de régulation de la production de cette β -lactamase, elles entraînent une production stable à haute niveau d'AmpC affectant l'activité de l'ensemble des β -lactamines à l'exception de celle des carbapénèmes (**Poirel, 2006**).

✓ Mécanisme non enzymatique

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques peut aussi résulter non pas d'une hydrolyse, mais d'une augmentation de l'efflux actif (**Yoneyama et al., 1997**). De nombreuses pompes à efflux ont été décrites chez *P.aeruginosa*. Ces systèmes ne sont pas exprimés de la même façon, seul le MexAB-OprM est produit constitutivement (**Poole, 2004**).

La surexpression de la pompe MexAB-OprM résulte souvent d'une mutation dans le gène du répresseur adjacent MexR (**Saito et al., 1999 ; Higgins et al., 2003**).

En plus la surproduction de la pompe MexAB-OprM la résistance peut résulter par la perte de la porine OprD2, cette protéine canalaire de la membrane externe possède un site spécifique de la liaison pour les carbapénèmes et permet la pénétration sélective de l'imipénème. Toute perte d'OprD2 entraînera donc une résistance à cet agent anti microbien (**Lahlou Amin et al., 2008**).

3.1.1. Résistance aux aminosides

P.aeruginosa contient des enzymes de modification des aminoglycosides AAC (6'), APH (2'), APH (3') et AAC (3') (**Kettner et al., 1995**). Considérant que, chez *P. aeruginosa* la pompe d'efflux MexXY est décrite comme la principale manifestation de la résistance aux aminosides, la modification de la cible (ARNr 16S) a également représenté plusieurs cas de résistance aux aminosides (**Hocquet et al, 2003**).

3.1.2. Résistance aux fluoroquinolones

La résistance aux fluoroquinolones est essentiellement liée à des mutations dans la sous-unité *GyrA* de l'ADN *gyrase*. Et aussi la surexpression des pompes d'efflux actif MexAB-OprM peut contribuer également à la résistance intrinsèque aux fluoroquinolones (**Lastours, 2010**).

3.2. Phénotypes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii*

3.2.1. Résistance aux β -lactamines

3.2.1.1. Résistance naturelle

A. baumannii possède naturellement une β -lactamase de type céphalosporine : AmpC et une β -lactamase de classe D ou oxacillinase : OXA-69 qui a une action sur quelques β -lactamines y compris l'imipénème (**Corvec et al., 2003 ; Héritier et al., 2005**).

3.2.1.2. Résistance acquise

✓ Mécanismes enzymatiques

Différentes pénicillinases plasmidiques ont été caractérisées chez *A. baumannii*. Il s'agit principalement de l'enzyme TEM-1, les autres types moins fréquents étant TEM-2, CARB-5 et SCO-1. Ces enzymes confèrent la résistance aux pénicillines à large spectre (ticarcilline, piperacilline). Des β -lactamases à spectre étendue (BLSE) des type PER-1 et VEB-1 ont été décrites (**Carbonne et al., 2005 ; Poirel et Nordmann, 2006**). Les métallob- β -lactamases (VIM, IMP, SIM) ont été retrouvées qui confère une résistance à toutes les β -lactamines excepté l'aztréonam. Récemment, NDM-2 (variant de NDM-1), enzyme disséminant largement chez les entérobactéries, en particulier *E. coli* et *K. pneumoniae*, a été caractérisée dans une souche d'*A.baumannii* isolée en Allemagne (**Decré, 2012**). Le β -lactamase avec une activité de carbapénémases la plus réponde chez *A. baumannii* est le β -lactamase hydrolysant les carbapénèmes de classe D des oxacillinases qui est le plus spécifique de cette espèce. Ces enzymes parmi lesquelles il existe trois groupes indépendants de β -lactamase résistant à l'acide clavulanique, sont représentés par OXA-23, OXA-24 et OXA-58 qui peuvent être codées soit par des gènes chromosomiques soit plasmidiques. Contrairement à l'AmpC de *P.aeruginosa* et de certaines Entérobactéries, dont l'expression est inductible du fait de la présence d'un gène régulateur en amont du gène *bla_{ampC}*, l'expression de l'AmpC d'*A. baumannii* n'est pas inductible (**Poirel et Nordmann, 2006**).

✓ Mécanismes non enzymatiques

Un système d'efflux AdeABC a été identifié chez *A. baumannii*. Il est régulé par un système à deux composantes, et est responsable de la résistance aux aminosides, tétracyclines, érythromycines, chloramphénicol, triméthoprime et aux fluoroquinolones (**Cattoir, 2004**).

La modification de la cible des β -lactamines (PLP) par mutation ou l'utilisation par la bactérie de transpeptidases alternatives pour la synthèse du peptidoglycane peuvent générer une résistance bactérienne (**Poirel et Nordmann, 2006**). Des études effectuées par **Dupont et al (2005)** ont été démontrée que des isolats d'*A. baumannii* résistant aux carbapénèmes ont réduit de l'expression de PLP2.

En plus des β -lactamases, la résistance au carbapénèmes chez *A. baumannii* peut aussi résulter de modifications de protéines de liaison aux pénicillines ou de porines. Plusieurs porines, incluant la 33-kDa CarO protéine, constituant un canal protéique permettant l'entrée des carbapénèmes peuvent être impliquées dans la résistance aux carbapénèmes (**Poirel et Nordmann, 2006**).

3.2.2. Résistance aux aminosides

La résistance d'*A.baumannii* aux aminosides résulte principalement de l'inactivation de l'antibiotique par certains enzymes de modification parmi les acétylases, les adénylases et les phosphotransférases (**Figure 5**). Plus récemment, des méthylations de l'ARNr 16S par des méthylases, les ARNr 16S méthylases (ArmA et RmtA), ont été décrites chez des souches d'*A. baumannii* isolées à travers le monde. En plus la résistance aux aminosides est également associée à des mécanismes d'efflux actifs (**Decré, 2012**).

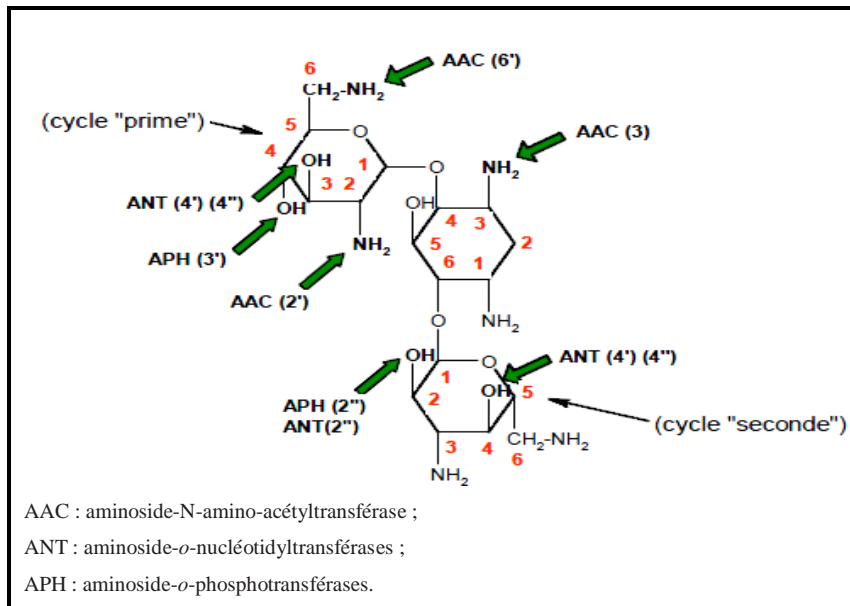


Figure 5. Structure d'un aminoside et les sites de modification par les enzymes ANT, APH et AAC (Mammeri, 2007).

3.2.3. Résistance aux fluoroquinolones

Le principal mécanisme de résistance est dû à des mutations au niveau des gènes *gyrA* et *parC*, gènes à l'origine de l'ADN gyrase et du topoisomérase IV, enzymes qui permettent le maintien de l'intégrité de l'hélice pendant le processus de réplication de l'ADN. Ces mutations induisent des cassures dans l'ADN conduisant à la mort bactérienne. Ainsi possède des systèmes d'efflux qui jouent un rôle important dans la résistance aux fluoroquinolones (Cattoir, 2012).

3.3. Phénotypes de résistance aux antibiotiques chez *Stenotrophomonas maltophilia*

3.3.1. Résistance aux β -lactamines

- Production de β -lactamases : la résistance naturelle à la plupart des β -lactamines, sauf le moxolactame, par production d'une métallo- β - lactamase (L1) de classe B et d'une β -lactamase à sérine active (L2) de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines, en particulier le céfotaxime. La bêta-lactamase L2 est inductible et inhibée par l'acide clavulanique, ce qui explique la sensibilité de *S. maltophilia* à l'association ticarcilline-acide clavulanique (Sougakoff et al., 2003).
- Système d'efflux : plusieurs systèmes d'efflux ont été identifiés dans *S. maltophilia*, y compris SmeABC et SmeDEF. SmeABC ne semble pas contribuer à la résistance

intrinsèque à *S. maltophilia*, smeDEF confère une résistance aux antibiotiques appartenant à différentes familles structurales (Mérens et al., 2012).

3.3.2. Résistance aux aminosides

La résistance de *S. maltophilia* aux aminosides est traditionnellement attribuée soit à l'imperméabilité des bactéries, soit à l'export de l'antibiotique par les cellules, soit à la production d'une 6'-N-aminoside acétyltransférase. Le gène responsable, aac (6')-Iz, a été localisé dans le chromosome (Mérens et al., 2012 ; Courvalin, 2000).

3.3.3. Résistance aux fluoroquinolones

Une résistance acquise à ces fluoroquinolones liée à des modifications de la membrane externe et supportée par le chromosome. Un système d'efflux actif lié à une protéine de la membrane externe (OMP54) est responsable de la multirésistance cryptique (MDR) (Eyquem et al., 2000).

3.4. Phénotypes de résistance aux antibiotiques chez *Burkholderia cepacia*

B. cepacia est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les carboxypénicillines, les aminosides et la colistine (Le Bourgeois et al., 2005). La pipéracilline, la ceftazidime, le méropénème (contrairement à l'imipénème), et la témocilline sont les molécules les plus actives (Segonds et al., 2006).

- Système d'efflux : *B.cepacia* présente un haut niveau de résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques (β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones). Ceci est partiellement dû à la présence de différentes pompes MDR comme SmeABC, CeoAB-OpcM, AmrAB-OprA ou BpeAB-OprB (Cattoir, 2004).
- Imperméabilité : cette bactérie est le plus souvent multirésistante aux antibiotiques. Les mécanismes impliqués sont essentiellement l'imperméabilité (résistance naturelle aux antibiotiques polycationiques : aminoglycosides, polypeptides, dont le passage à travers la membrane externe nécessite la présence de récepteurs anioniques au niveau du LPS, récepteurs qui sont très peu nombreux chez *B. cepacia*, imperméabilité à l'imipénème) (Segonds et al., 2001).
- β -lactamase de classe A (PenA) : la résistance du complexe *B. cepacia* a été liée à une β -lactamase chromosomique inductible qui a été faussement identifiée comme une enzyme

de type AmpC. Puis, Trépanier et *al* a décrit une β -lactamase de classe A (Pen A). Pen A possède un profil à spectre étroit, et elle est régulée par un régulateur transcriptionnel de type Lyse R, PenR. Cette régulation négative est responsable de l'expression inductible de Pen A (Nordmann et *al.*, 2009).

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Souches étudiées

Un total de 26 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants (15 *Acinetobacter baumannii* et 11 *Pseudomonas aeruginosa*) ont été isolées à partir de 46 prélèvements réalisés pendant une période de 4 mois (Janvier-avril 2013), au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen, dont 26 à partir des patients (prélèvements trachéaux, rectaux, des sondes urinaires, et de pus) et 20 de l'environnement (**Tableau 1**), a fait l'objectif de notre étude.

Tableau 1. Répartition des prélèvements selon les sites de prélèvement

Patients				Environnement	Total
Trachéal	Rectal	Sondes urinaires	Pus		
13	08	04	01	20	46

1.1.2. Souches de références

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Pseudomonas aeruginosa* VIM-1.
- *Klebsiella pneumoniae* Kp.

1.2. Milieux de culture

1.2.1. Milieux de culture liquides

- Bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur d'Algérie)
- Bouillon cœur cerveau (BHIB) (Fluka)

1.2.2. Milieux de culture solides

- Mac Conkey (MC) (Fluka)
- Gélose nutritif (GN) (Fluka)
- Müller-Hinton (MH) (Fluka)
- Milieu triple sucres (TSI) (Merck)
- Gélose nutritif au cétrimide (GC) (Fluka)

1.3. Tests biochimiques

- Galerie API 20NE (Bio Mérieux)

1.4. Solutions et tampons

- Solution de l'EDTA 0,5M pH 7
- Tampon TBE 0,5 M
- Tampon de charge
- Solution de BET (bromure d'éthidium) (Sigma)
- Eau ultra pure

1.5. Antibiotiques

Les antibiotiques testés sont les suivants :

1.5.1. En disque (Bio-Rad)

Ticarcilline (75µg), Ticarcilline/ Acide clavulanique (75/10µg), Pipéracilline (75µg), Pipéracilline+Tazobactam (75/10µg), Imipénème (10µg), Aztréonam (30µg), Ceftazidime (30µg), Tobramycine (10µg), Amikacine (30µg), Gentamycine (15µg), Ciprofloxacine (5µg), Colistine (50µg).

1.5.2. En poudre

Cloxacilline (Astellas), Imipénème (MSD), Ceftazidime (Glaxo Smith Kline), Amikacine (Bristol-Myers Squibb) et Ciprofloxacine (Bayer Pharma).

2. Méthodes

2.1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire antibiotique antifongique : physico-chimie, synthèse et activités biologiques. Les prélèvements ont été pratiqués au niveau du service de réanimation au CHU de Tlemcen.

2.2. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués, à partir de l'environnement (bord du lit, poignée de port, clavier, gants, mains de personnel, interrupteur, blouse et lavabo) par écouvillonnage et à partir de divers sites sur patient hospitalisés (aspiration trachéal, rectal, sonde vésicale, plaie et pus) au niveau du service de réanimation puis acheminés au laboratoire dans des tubes de bouillon nutritif pour être incubés à 37°C pendant 24 heures.

2.3. Isolement et purification

L'ensemencement des souches a été réalisé sur le milieu Mac Conkey et incubé à 37°C pendant 24 heures. La purification des colonies bactériennes est procédée par repiquage successif sur le même milieu. L'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est réalisé sur gélose nutritive additionnée au cétrimide.

2.4. Identification

On procède à l'identification des germes bactériens ciblés par le T.S.I et le Galerie API 20NE.

2.4.1. Le test TSI (milieu triple sucres)

- **Principe**

Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non de H₂S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.

- **Technique**

L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale dans le culot puis par stries sur la pente, la lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

La fermentation des sucres se traduit par le virage de la couleur de milieu au jaune, le dégagement de gaz se traduit par la formation des bulles de gaz dans la masse du culot, alors que la production d'H₂S se traduit par le noircissement du milieu.

2.4.2. Galerie API 20NE

- **Principe**

La galerie API 20NE est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif. La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, ces microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

- **Technique**

Préparation de la galerie :

- Mettre de l'eau distillée stérile sur le fond de la boîte (partie alvéolée) ;
- Placer la galerie sur le fond la boîte ;
- Recouvrir la boîte avec son couvercle ;
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85% ;
- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé ;
- Réalisez une suspension bactérienne en homogénéisation soigneusement.

Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie à l'aide d'une pipette stérile ;
- Refermer la boîte d'incubation, incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (**Annexe 1**) et l'identification des souches est obtenue à l'aide du tableau d'identification du catalogue analytique (**Annexe 2**).

2.5. Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4°C dans des tubes de gélose inclinée ou dans des tubes de gélose profonde.

2.6. Etude de la résistance aux antibiotiques

2.6.1. Antibiogramme (Vedel, 2005 ; CA-SFM, 2010)

- **Principe**

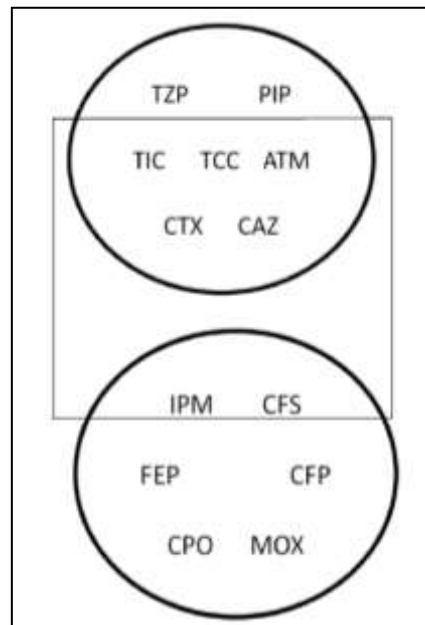
L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classe semi-quantitative (sensible S, intermédiaire I ou résistante R) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

- **Technique**

- A partir d'une culture bactérienne pure et jeune (de 24 h sur milieu gélosé), réaliser une suspension en ensemencant une colonie bien isolée dans 5 ml de bouillon BHIB et incubé 24h à 37°C,
- Réaliser une dilution de 1/100 dans 10 ml d'eau physiologique à 0,9%, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex ; sa densité optique doit être de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625nm équivalente à 0,5 Mac Farland;
- Ensemencer cette dilution par inondation sur les boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Müller-Hinton rejeter le surplus et laisser sécher les boîtes pendant 20 minutes à l'étuve à 37°C ;
- Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile. La disposition des β -lactamines a été réalisée selon le schéma de Vedel (**Figure 6**).
- Laisser les boîtes 20 minutes à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incubé pendant 18-24 heures à 37°C.

- **Lecture**

- La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'Annexe 3 et 4, classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire et Résistante.
- Interpréter les phénotypes de résistance aux β -lactamines.



Principaux marqueurs	Marqueurs secondaires	Liste complémentaires
TIC : Ticarcilline CTX : Céfotaxime CAZ : Ceftazidime IMP: Imipénème	TCC: Ticarcilline + acide clavulanique ATM: Aztréoname CFS: Cefsulodine	TZP: Pipéracilline+Tazobactame PIP: Pipéracilline FEP: Céfépime CFP: Céfopérazone CPO: Cefpirome MOX: Moxalactame

Figure 6. Schéma de Vedel (2005).

2.6.2. Détermination des CMI en milieu solide (CA-SFM, 2010)

- **Principe**

La détermination précise de la CMI d'un antibiotique est parfois nécessaire pour compléter les données de l'antibiogramme. La méthode de dilution successive en milieu solide est la

méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle consiste à préparer une série de milieux gélosés contenant des concentrations croissantes d'antibiotiques.

- **Technique**

Préparation des solutions d'antibiotiques

Pour chacun des antibiotiques préparer une solution mère à 5120 mg/l puis réaliser des dilutions en séries de progression géométrique de raison $\frac{1}{2}$ (**Annexe 5**).

Préparation des boites

- Distribuer 2 ml de chaque dilution dans des boites ;
- Ajouter 18 ml de Müller-Hinton gélosé maintenu en surfusion à 45°C ;
- Homogénéiser et laisser les boites se solidifier à la température du laboratoire ;
- Sécher les boites à 37°C pendant 30minutes à l'étuve ;

Préparation de l'inoculum

- A partir des cultures de 18 heures, préparer des suspensions de 10^8 UFC/ml pour chacune des souches à tester ;
- Diluer la suspension inoculum au 1/10 ($\sim 10^7$ UFC/ml) dans de l'eau physiologique.
- La souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisée comme contrôle de la concentration des boites.

Ensemencement

- Ensemencer par spot de 1 à 2µl de la suspension bactérienne, soit un inoculum de 2×10^4 UFC/spot ;
- Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

- **Lecture**

- S'assurer de la croissance des souches au niveau de la boite témoin ;

- Déterminer la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle la croissance est inhibée (où il n'y a pas de croissance bactérienne visible) ;
- Les souches ont été catégorisées pour chacun des antibiotiques en fonction des concentrations critiques proposées par le CA-SFM (**Annexe 3 et 4**)

2.7. Test à la Cloxacilline (De Champs et al., 2002)

- **Principe**

La cloxacilline est un antibiotique qui permet d'inhiber les β -lactamase de type AmpC. La restauration de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération en présence d'une concentration définie de cloxacilline, permet de confirmer le phénotype céphalosporinase.

- **Technique**

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé Müller-Hinton supplémentés d'un inhibiteur: la cloxacilline à une concentration finale définie (500 $\mu\text{g/ml}$ et 1000 $\mu\text{g/ml}$).

- **Lecture**

La lecture se fait en comparant les boîtes de l'antibiogramme réalisé sur Müller-Hinton additionné de la cloxacilline à celui réalisé sur Müller-Hinton sans cloxacilline. Le phénotype céphalosporinase se traduit par l'augmentation des diamètres d'inhibition d'au moins 8mm autour des disques des antibiotiques céphalosporines de 3^{ème} génération.

2.8. Test de synergie (Philippon et Arlet., 2006)

- **Principe**

La démonstration phénotypique de la présence de β -lactamase à spectre élargie consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase (l'acide clavulanique) et un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération.

- **Technique**

Appliquer sur une gélose Mueller Hinton, préalablement ensemencée par la souche à tester, un disque de ceftazidime (CAZ) et/ ou de céfotaxime (CTX) et un disque de ticarcilline + acide clavulanique (TCC), distant 1,5cm. Incuber pendant 18 heures à 37°C.

- **Lecture**

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne visible entre les deux disques.

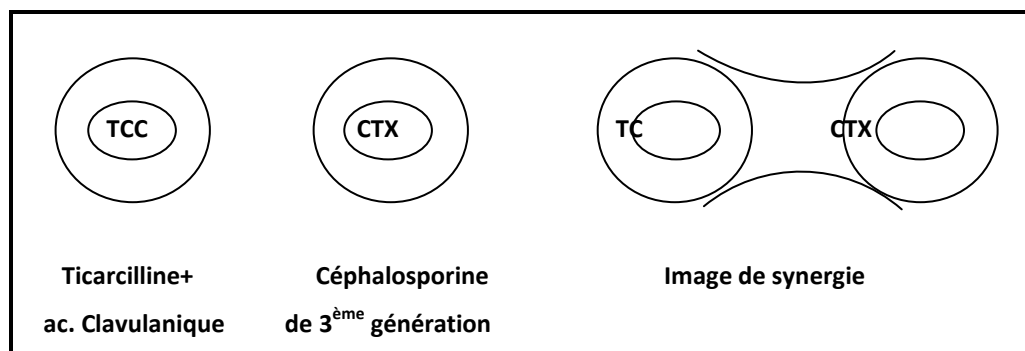


Figure 7. Schéma d'une image de synergie (Philippon et Arlet., 2006).

2.9. Test de Hodge (Lee et *al.*, 2003)

- **Principe**

Ce test permet la mise en évidence d'une enzyme hydrolysant l'imipénème chez une souche résistante à cet antibiotique à l'aide d'une souche sensible (*Escherichia coli* sauvage sensible aux carbapénèmes).

- **Technique**

- Préparer une suspension d'*Escherichia coli* 25922 de 0.5 Mc Farland ;
- Diluer la suspension à 1/10 (par l'addition de 0.5 ml de la suspension de 0.5 Mc Farland dans 4.5 ml de MHB) ;
- Ensemencer par écouvillonnage une gélose Müller-Hinton et laisser sécher ;
- Déposer un disque d'imipénème au centre ;
- Dans une ligne droite, ensemencer la souche à tester du bord de disque jusqu'au bord de la boîte ;

➤ Incuber à 35°C pendant 16 à 24 heures.

- **Lecture**

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par échancrure de la zone d'inhibition de la souche d'*Escherichia coli* indicatrice.

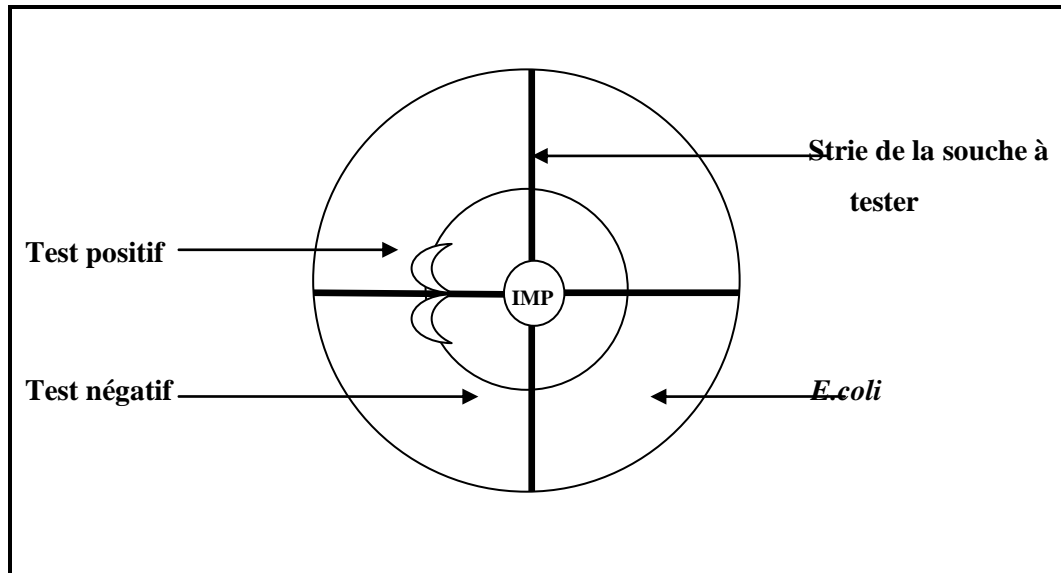


Figure 8. Lecture du test de Hodge (Lee et *al.*, 2003)

2.10. Test IMP-EDTA (Behera et *al.*, 2008)

- **Principe**

Ce test permet de différencier les métallo- β -lactamases (M β L) des autres β -lactamases hydrolysant les carbapénèmes.

- **Technique**

- Ensemencer l'inoculum bactérien sur gélose Muller-Hinton et déposer deux disques d'imipénème (10 μ g) à 20mm centre à centre l'un comme témoin, et sur l'autre, un volume contenant 4 μ l d'EDTA 0,5 M ;
- Déposer un autre disque d'IMP (10 μ g) à 20mm centre à centre d'un disque non imprégné stérile sur lequel a été déposée 10 μ l d'EDTA et incuber 18 à 24 heures à 37°C.

- Un témoin positif correspond à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de métallob- β -lactamase VIM à été utilisé.

- **Lecture**

Un résultat positif se traduit par une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui de l'EDTA.

2.11. Etude de l'ADN par la technique de PCR (Borde Isabelle, 2006)

2.11.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est extrait comme le suivant :

- Pour chacune des souches à testé, récolter dans un tube à eppendorf une colonie bactérienne pure et jeune à l'aide d'une pipette pasteur stérile et les suspendre dans 200 μ l de l'eau ultra pure, puis en vortexant.
- La souche de *Klebsiella pneumoniae* (Kp) a été utilisée comme contrôle positif.

Pour la conservation de l'ADN de longue durée, il est recommandé de le mettre à -20°C.

2.11.2. Amplification de l'ADN par PCR

- **Principe**

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

- **Technique**

Préparation de la réaction

Chaque réaction d'amplification comprend un volume final de 50 μ l incluant : 5 μ l de tampon 3 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 0.5 μ l dNTPs (dATP, dGTP, dTTP et dCTP), 2 μ l d'amorces, 40 μ g

d'ADN et une unité de Taq polymérase (0.25 µl). Le volume final de l'échantillon est complété par l'ajout d'eau stérile.

Réaction d'amplification

Les séquences nucléotidiques utilisées pour la détection de gène de résistance enzymatique (NDM) sont les suivants :

Amorce 1 (NDM-F) : TTC GTG CTT TGT AAA AGT AG

Amorce 2 (NDM-R): CCC TCA CTT GCC ATG ATT TT

Après extraction de l'ADN, la réaction d'amplification d'ADN par la Taq polymérase est réalisées à l'aide d'un thermocycleur débute avec une étape de dénaturation de l'ADN, effectuée à 94°C sur une période de 10 minutes. L'étape suivante consiste à amplifier l'ADN ce qui est fait sur une période de 30 cycles. Chaque cycle comprend: 1 minute de dénaturation (94°C), Suite à ces cycles d'amplification, la réaction se termine par une période additionnelle d'élongation de 10 minutes à 72°C.

Analyse par migration sur gel d'agarose

L'évaluation de la taille de différents fragments d'ADN est rendue possible suite à la migration électrophorétique des échantillons sur un gel d'agarose. La technique fait appel à la préparation d'un gel composé à la fois d'agarose et de tampon TBE 1X (0.09 M Tris, 0.09 M Acide borique, 0.002 M EDTA). Une quantité précise d'agarose, préétablie en fonction de la taille estimée des fragments d'ADN à séparer, est mélangée à 100 ml de TBE 1X et chauffée jusqu'à dissolution. L'ajout de bromure d'éthidium (0.25 µg/ml) permet de visualiser l'ADN.

La solution est ensuite coulée dans un moule comprenant un nombre déterminé de puits.

Une fois le gel figé, il est déposé dans une chambre à électrophorèse comprenant du tampon de migration (TBE). Les échantillons d'ADN, sont déposés dans les puits et soumis à un voltage de 120 V pour une période d'environ 20 minutes. À la fin de la migration, le gel est photographié et la taille des fragments d'ADN est comparée à deux différentes échelles, de 100 pb ou de 1 kb.

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Souches identifiées

Durant la période d'étude, 50 bacilles à Gram négatif (BGN) ont été répertoriés, la **Figure 9** ci-dessous montre que le groupe des non fermentant (BGNnF) présente 26 souches avec un taux 52%, tandis que (48 %) c'est-à-dire 23 souches appartiennent à la famille des entérobactéries.

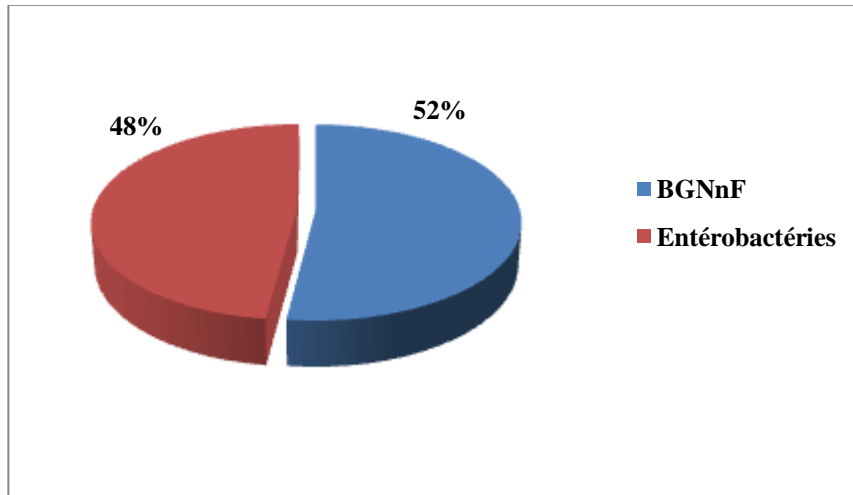


Figure 9. Répartition des bacilles à Gram négatif

Sur un total de 26 souches de BGNnF ont été identifiées 15 *Acinetobacter baumannii* (57,7 %) et 11 *Pseudomonas aeruginosa* (42,3%) (**Figure 10**).

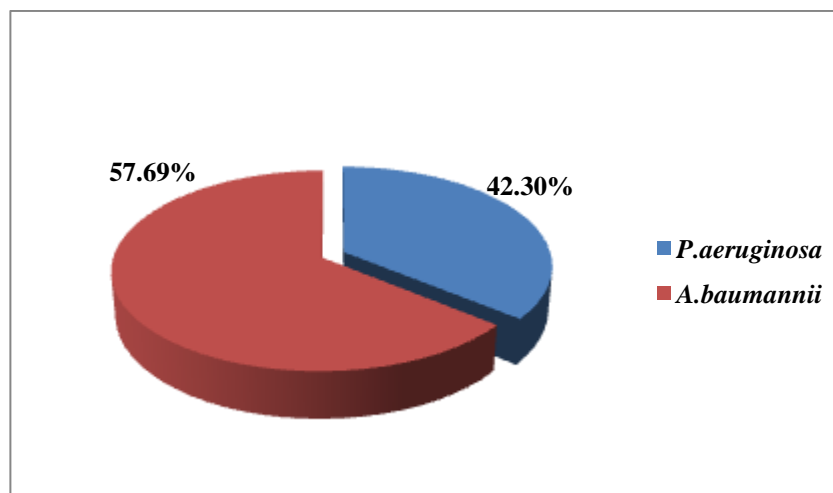


Figure 10. Répartition des BGNnF isolés à partir du service de réanimation

Ces 26 BGNnF comprennent 14 souches isolées à partir de 26 prélèvements sur patients avec un taux de 53,8% dont 09 souches de *P. aeruginosa* (64,3%) et 05 *A. baumannii* (35,7%) (**Figure 11**). À partir de 20 prélèvements de l'environnement, 12 souches ont été isolées (60%), dont 10 *A. baumannii* (83,3%) et seulement 02 *P. aeruginosa* (16,6%) (**Figure 12**).

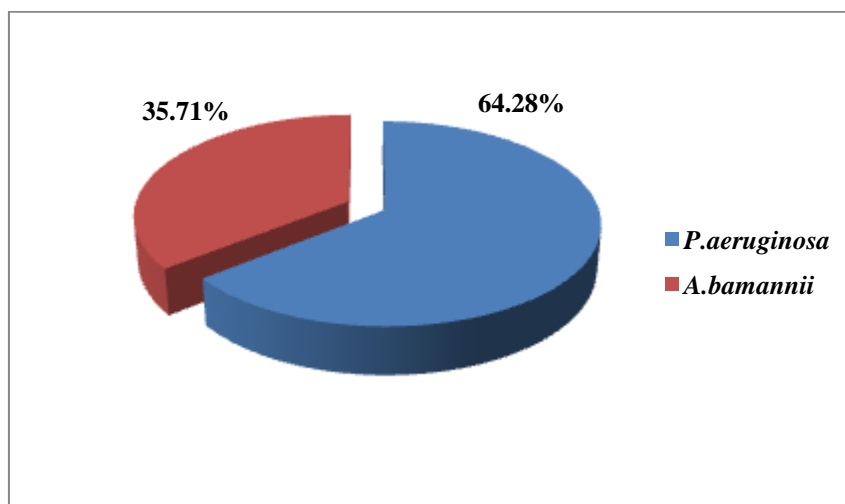


Figure 11. Répartition des BGNnF isolés à partir des prélèvements sur patients

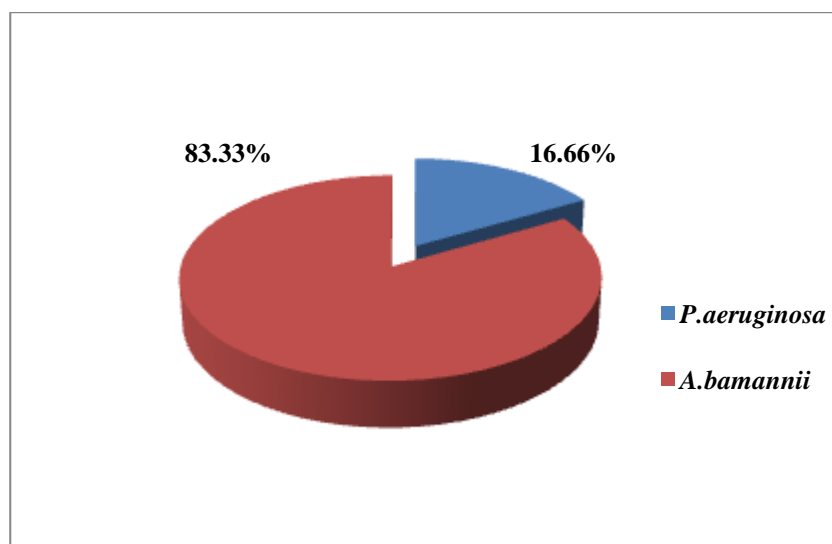


Figure 12. Répartition des BGNnF isolés à partir des prélèvements l'environnement

1.1.1. Répartitions des BGNnF en fonction du site de prélèvement

La répartition des bactéries étudiées et isolées à partir du service de réanimation en fonction de la nature du prélèvement est montrée par l'historgramme ci-après :

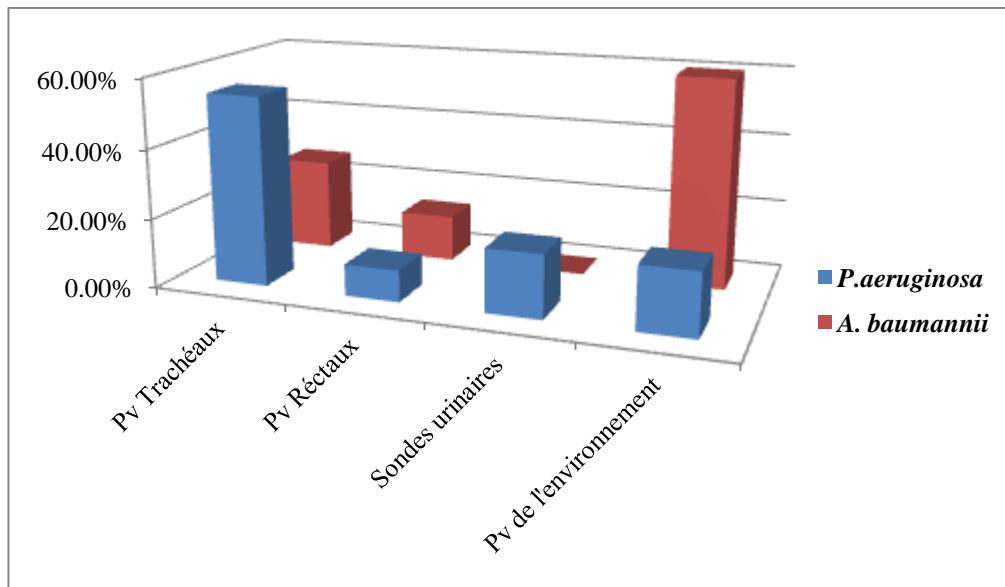


Figure 13. Répartition des souches selon les prélèvements.

Pour les prélèvements trachéaux, la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* (54,5%) est le double de celle d'*A. baumannii* (26,6%). Et pour les prélèvements rectaux les taux d'isolement d'*A.baumannii* (13,3%) est plus important par rapport à *P. aeruginosa* (9%). Notons l'absence d'*A.baumannii* au niveau des sondes urinaires, alors que 2 souches de *P.aeruginosa* ont été isolées (18,8%). Au niveau des prélèvements de l'environnement *A. baumannii* occupe la première place avec un taux d'isolement de 60%.

1.2. Résistance des BGNnF aux antibiotiques

1.2.1. *Acinetobacter baumannii*

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* étudiées présentent une résistance importante vis-à-vis de la famille des β -lactamines, avec des taux de résistance de 93,3% à la pipéracilline, ticarcilline, ticarcilline+ac.clavulanique et à l'aztréonam, 86,6% à la ceftazidime, et 80% à la pipéracilline+tazobactam, alors que l'imipénème est le moins touché avec un taux de résistance de 53,3% (**Figure 14 ; Annexe 6**).

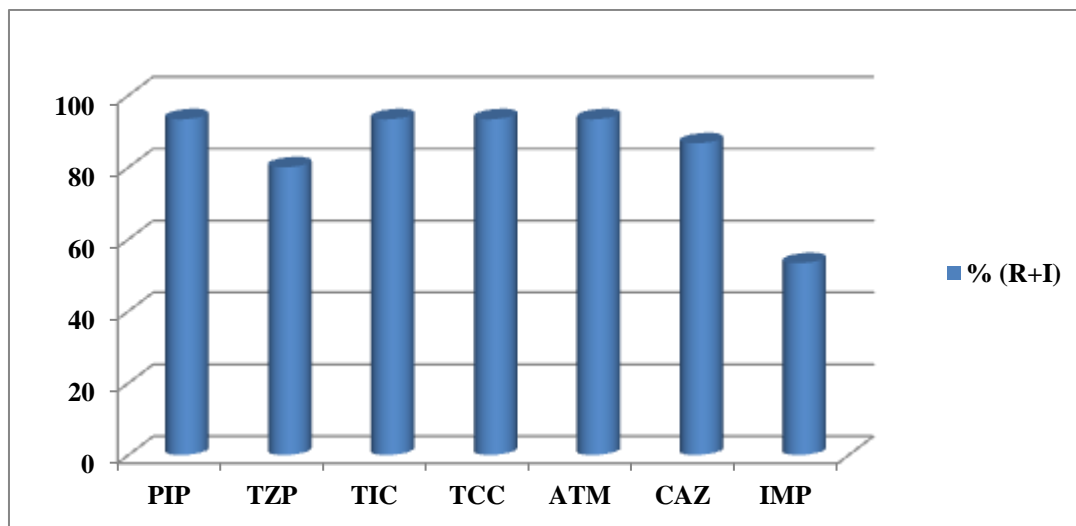


Figure 14. Taux de résistance aux β -lactamines des souches d'*A.baumannii*

Concernant les autres classes d'antibiotiques, pour les aminosides le taux de résistance le plus important est noté pour l'amikacine (80%) et la gentamycine (66,6%), cependant, la tobramycine conserve son activité avec un taux de résistance de 33,3%.

Pour les fluoroquinolones le taux de la résistance important est observé pour la ciprofloxacine (73,3%).

La colistine demeure le seul antibiotique potentiellement efficace avec 100% de souches sensibles (**Figure 15 ; Annexe 6**).

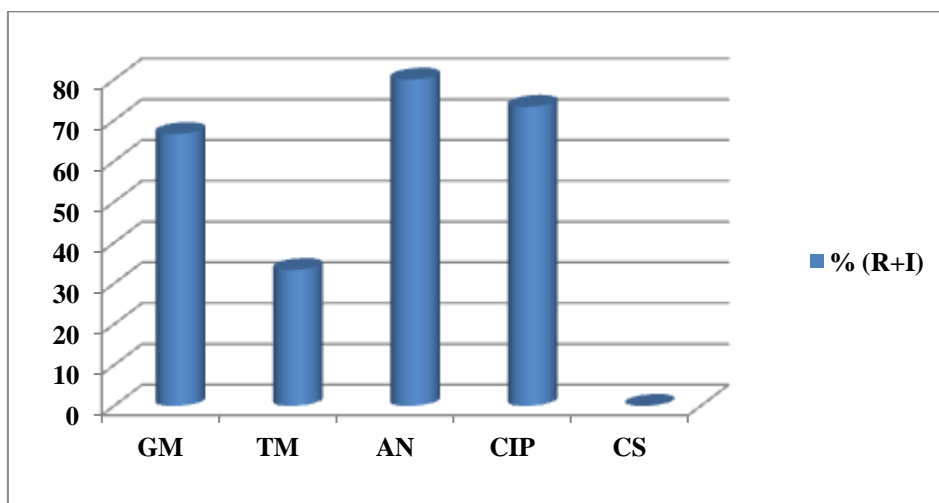


Figure 15. Taux de résistance aux autres classes d'antibiotiques des souches d'*A.baumannii*.

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Contrairement à la multirésistance des souches d'*Acinetobacter baumannii*, les bacilles pyocyaniques ont montré une bonne sensibilité aux antibiotiques testés.

On note une sensibilité totale à la pipéracilline. Les taux de résistance aux β -lactamines sont les suivants : 81,8% à la ticarcilline+ac.clavulanique et ticarcilline, 72,7% à l'aztréonam, 18,8% à la pipéracilline+tazobactam, ceftazidime et l'imipénème (**Figure 16 ; Annexe 7**).

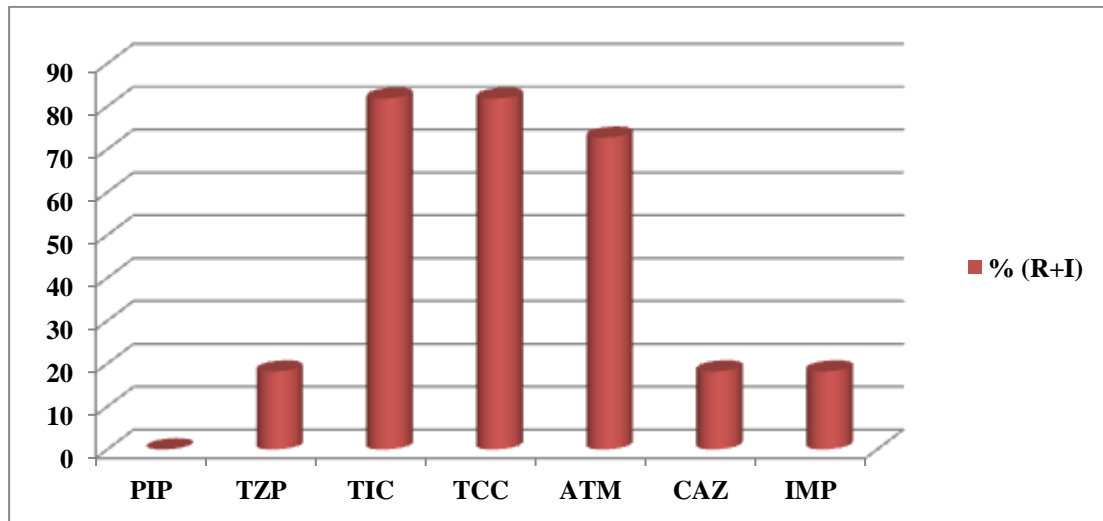
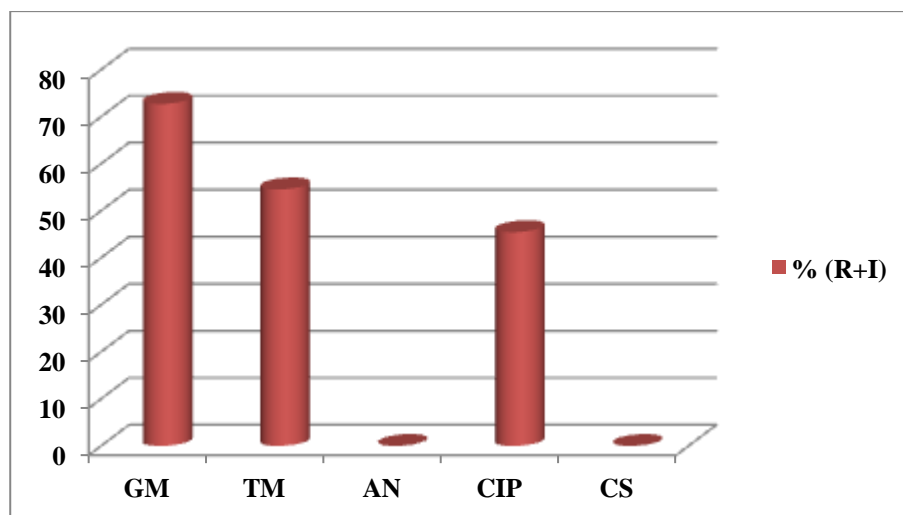


Figure 16. Taux de résistance aux β -lactamines des souches de *P. aeruginosa*

Pour la famille des aminosides, les résultats révèlent une très bonne activité de l'amikacine (100% de souches sensibles), tandis que la gentamicine présente une résistance pour 72,7% des souches et la tobramycine, 54,5%. Aussi 45,5% des souches résistent aux fluoroquinolones (**Figure 17 ; Annexe 7**).

Aucune résistance n'a été observée pour la colistine.



**Figure 17. Taux de résistance aux autres classes d'antibiotiques des souches de
*P. aeruginosa***

1.3. Phénotypes de résistance aux β -lactamines

1.3.1. *Acinetobacter baumannii*

La majorité des souches étudiées sont résistantes à toutes les β -lactamines testées. Cette multirésistance a été confirmée par l'étude des CMI. Les résultats de CMI montrent un niveau de résistance élevé à la céftazidime pour l'ensemble des souches étudiées (256 μ g/ml), alors que les niveaux de résistance à l'imipénème sont variables. Et pour les autres classes d'antibiotiques les souches sont résistantes à l'amikacine et à la ciprofloxacine avec des CMI de 32 et 256 μ g/ml, et de 32 et 128 μ g/ml respectivement (**Tableau 2 ; Annexe 8**).

Tableau 2. Intervalles de CMI (μ g/ml) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux antibiotiques

IMP $\leq 2 > 8$	CAZ $\leq 4 > 8$	CIP $\leq 1 > 1$	AN $\leq 8 > 16$	Phénotype observés
1	0,25	<0,125	2	Sauvage
1-2	32-256	64-128	128-256	Multirésistant (IMP S)
32-64	64-256	32-128	32-256	Multirésistant (IMP R)

L'analyse du comportement de chaque souche vis-à-vis des β -lactamines testées nous a permis de distinguer 3 phénotypes de résistance : phénotype sensible (6,6%), phénotype multirésistant sensible à l'imipénème (40%) et phénotype multirésistant y compris l'imipénème (53,3%) (**Figure 18**).

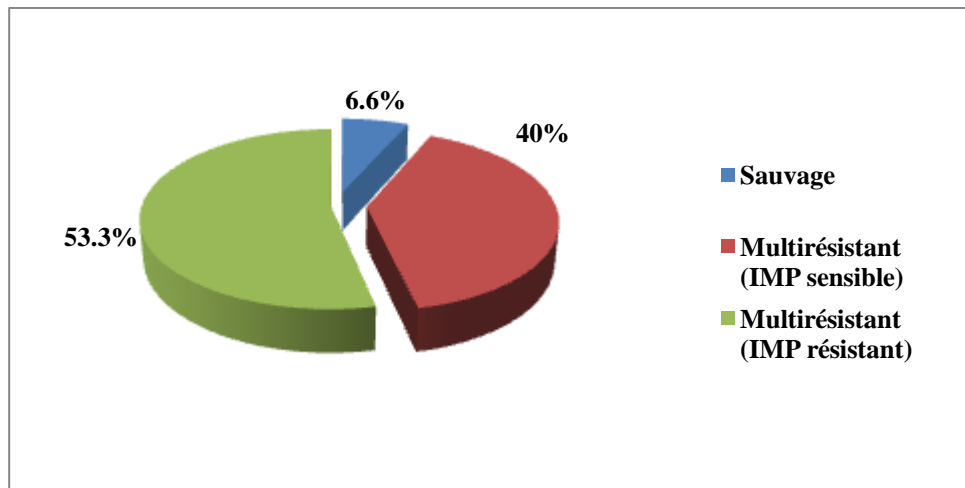


Figure 18. Répartition des phénotypes de résistance des souches d'*A.baumannii*

La récupération de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération par la cloxacilline a permis de mettre en évidence la présence d'une AmpC, mais pour la majorité des souches testées, la sensibilité à la céftazidime n'était pas complètement restaurée sur gélose MH additionné de cloxacilline, ce qui indique la présence d'un mécanisme additionnel à l'hyperexpression de céphalosporinases (**Figure 19**).

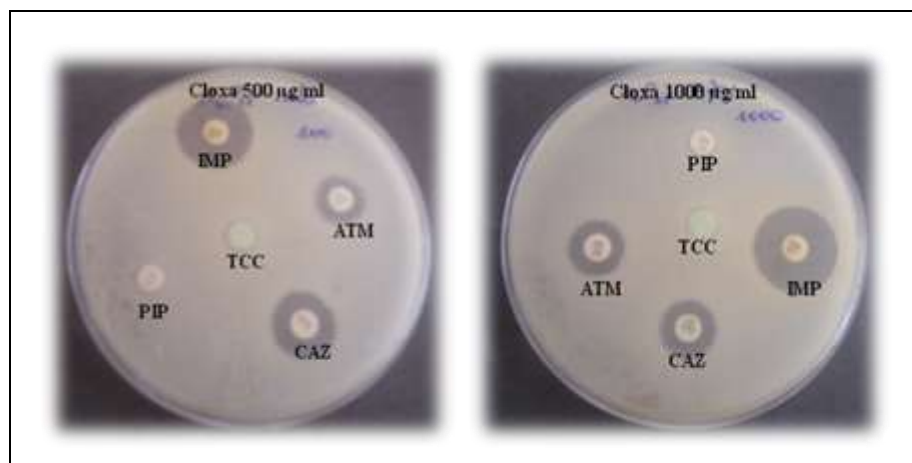


Figure 19. Résultat du test à la cloxacilline

La recherche d'enzymes ayant une activité de carbapénémases a été systématique chez les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite à l'imipénème.

Le test de Hodge a permis la mise en évidence de l'enzyme à activité carbapénémase. Toutes les souches d'*A .baumannii* testées se sont révélées positives (**Figure 20**).

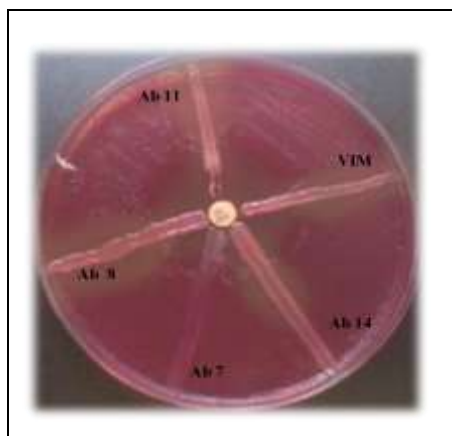


Figure 20. Résultat de test de Hodge

Le test IMP-EDTA a permis de mettre en évidence les métallo- β -lactamases. Les souches testées n'ont pas montré un accroissement de la zone autour du disque contenant l'IMP + EDTA, et aucune image de synergie n'a été observée. Les souches testées ne possèdent pas de métallo- β -lactamases conférant leur résistance à l'imipénème (**Figure 21**).

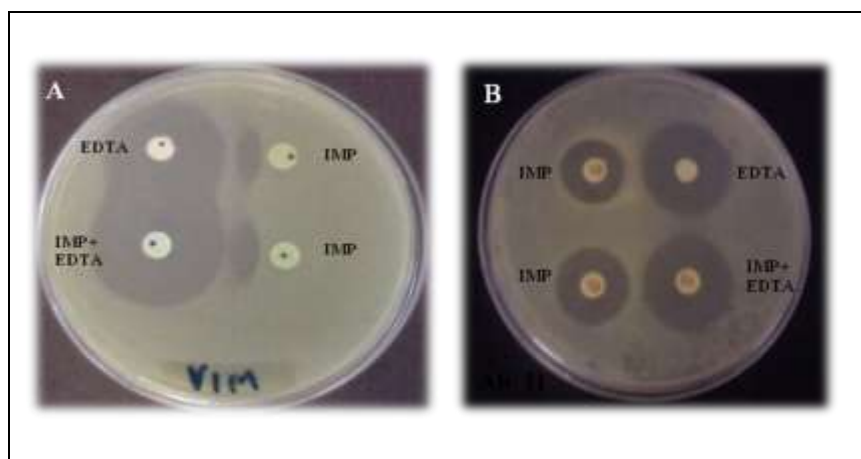


Figure 21. Résultat du test à EDTA

(A) Souche de référence productrice d'une métallo- β -lactamase (VIM-1)

(B) Souche d'*Acinetobacter baumannii* testée

1.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

La répartition des phénotypes de résistance des bacilles pyocyaniques vis-à-vis des β -lactamines a révélé la prédominance d'un seul mécanisme non enzymatique représenté par le système d'efflux (54,5%). Les mécanismes enzymatiques étaient représentés par

l'hyperproduction de céphalosporinase (18,8%), et le reste est représenté par le phénotype sauvage (18,8%) (**Figure 22**).

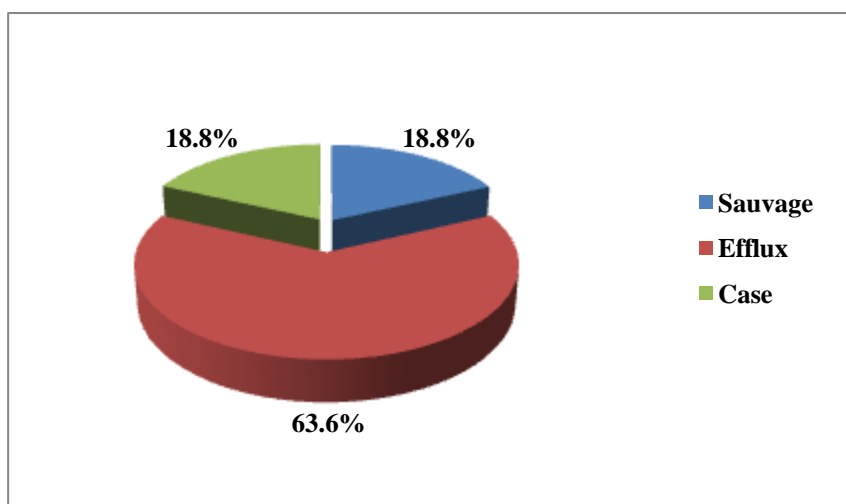


Figure 22. Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches de *P. aeruginosa*

Les souches présentant le phénotype d'efflux actif sont caractérisées par une diminution de l'activité de la ticarcilline, alors que les deux souches de phénotype céphalosporinase montrent une résistance à la ceftazidime (**Tableau 3**).

Tableau 3. Phénotypes de résistance observés chez les souches de *P.aeruginosa*

	PIP	TZP	TIC	TCC	ATM	CAZ	IMP	Mécanisme suspecté
<i>Pa. 9</i>	S	R	R	R	R	R	R	Case
<i>Pa. 10</i>	S	S	R	R	I	S	S	Efflux

R : résistante/ S : sensible/ I : intermédiaire.

1.4. Amplification de l'ADN par PCR

La production de métallob- β -lactamases a été suspectée par l'utilisation d'un test de disque combiné, sur la base de l'inhibition de l'activité de métallob- β -lactamase par EDTA comme

décrit précédemment. Tous les isolats étaient négatifs pour la production de métallo- β -lactamases.

Pour l'ensemble des huit isolats d'*A.baumannii* résistants à l'imipénème, la technique de PCR visant à détecter le gène carbapénémase, en utilisant des amorces décrites ailleurs (NDM F, NDM R), conduit à l'identification du gène bla_{NDM-1}.

La cartographie par PCR des isolats a montré qu'ils ne possédaient pas ce gène de résistance. Les isolats ne s'hybrident pas avec l'amorce bla_{NDM-1} spécifique, ce qui suggère que le gène bla_{NDM-1} est réprimé. Alors le mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez ces isolats d'*A. baumannii* est certainement dû à d'autres mécanismes acquis probablement de type oxacillines, qui sont souvent identifiés dans le monde entier et sont regroupés en trois grandes sous-familles (bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, et bla_{OXA-58}) (Boulanger et al., 2012).

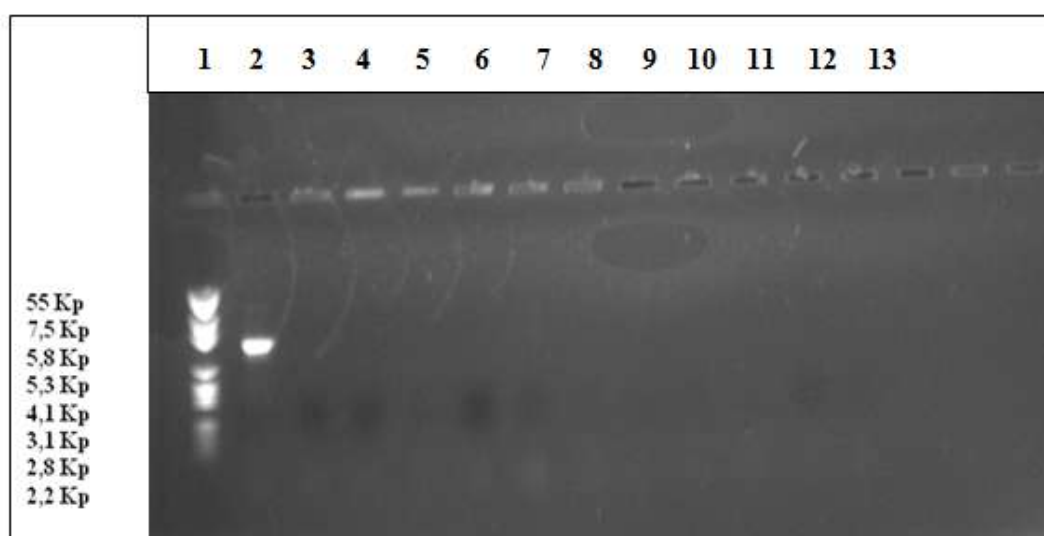


Figure 23. Visualisation de l'ADN génomique sur gel d'agarose

1 : (Marqueur de taille) ; 2 : témoin positif (**Kp**) ; 3 : témoin négatif ; 4 : Ab 5 ; 5 : Ab 6 ; 6 : Ab 7 ; 7 : Ab 8 ; 8 : Ab 11 ; 9 : témoin négatif ; 10 : Ab 12 ; 11 : Ab 13 ; 12 : Ab 14 ; 13 : témoin négatif.

Kp : *Klebsiella pneumoniae* ; Ab : *Acinetobacter baumannii*

2. Discussion

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des agents pathogènes opportunistes responsables essentiellement d'infections nosocomiales sévères (**McGowan, 2006**).

Au cours de la période de l'étude, nous avons isolé 50 bacilles à Gram négatif à partir du service de réanimation du CHU de Tlemcen, dont 24 appartiennent à la famille des entérobactéries et 26 au groupe des non fermentaires, ce qui correspond à des fréquences d'isolement de 48% et 52% respectivement. Nos résultats concordent avec ceux obtenus au sein du laboratoire « LAAPSAB » de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen par **Rabhi (2012)**, dont la fréquence d'isolement des BGNnF était (68,7%) supérieure à celle des entérobactéries (31,5%).

Notre étude a montré qu'à partir des prélèvements effectués au niveau du service de réanimation, *Acinetobacter baumannii* représente plus de 50% des souches isolées du groupe des bactéries non fermentantes avec une fréquence d'isolement de 32,6%, alors que la fréquence d'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* est moins importante (24%), ce qui concorde avec ceux obtenus par l'étude de **Rabhi (2012)** à Tlemcen et **Sefraoui (2011)** à Sidi Bel Abbas, avec des fréquences de 61,3% et 65,2% pour *Acinetobacter baumannii*, et 38,6% et 34,8% pour *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, en Tunisie, **Ben Haj Khalifa (2010)** a trouvé 11,2% d'*Acinetobacter baumannii* et 5,6% de *Pseudomonas aeruginosa* dans le service de réanimation de l'hôpital Tahar Sfar de Mahdia. De même une autre étude effectuée au niveau du même service de l'hôpital militaire d'instruction Mohammed-V au Maroc le taux d'isolement d'*Acinetobacter baumannii* présente 13,64%, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* est de 7% (**Elouennass et al., 2008**). Ces fréquences d'isolement sont liées au caractère nosocomial fréquent en réanimation, elles suggèrent un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier. En effet, ces deux espèces sont des bactéries nosocomiales par excellence, se trouvant essentiellement dans l'environnement hospitalier, ayant une capacité d'acquérir et de cumuler facilement plusieurs mécanismes de résistance. La multiplication des manœuvres invasives sur des terrains fragilisés (ventilation artificielle, manœuvres de sondage) et la pression de sélection des antibiotiques (Céphalosporines et imipénème) sont des éléments favorisant (**Ben Haj Khalifa et al., 2010**).

La répartition des espèces isolées diffère selon le site de prélèvement. En effet, la présente étude montre une prédominance des souches d'*Acinetobacter baumannii*, où les prélèvements concernés, proviennent du tractus respiratoire suivis par les prélèvements rectaux et urinaires. Ceci concorde avec les données d'une étude marocaine décrivant l'importance de cette espèce surtout en unité de soins intensifs (**Elouennass et al., 2003**).

La résistance des bacilles à Gram négatif non fermentant (BGNnF) aux β -lactamines, notamment d'*Acinetobacter baumannii*, pose un véritable problème épidémique. En effet, les souches étudiées présentent un taux de résistance assez élevé aux pénicillines (93,3%), et aux céphalosporines de 3^{ème} génération (86,6%) testées, mais le taux obtenu pour l'imipénème (53,3%) est nettement inférieur à celui de **Rabhi (2012)** (92,6 %). Citons aussi d'autres travaux réalisés en 2006 par **Saidani** à l'hôpital Charles- Nicolle à Tunis montrant un taux de résistance de 72% aussi bien pour l'imipénème que pour la ceftazidime.

Pour les mécanismes de résistance acquise à l'imipénème, deux types enzymes ont été décrits : les Métallo- β -Lactamases (M β L) et les oxacillinases (OXA) à activité carbapénémase. Dans notre série on a réalisé des tests phénotypiques à la recherche de métallo- β -lactamases (M β L). Toutes les bactéries étudiées ne présentaient aucun M β L acquise à activité carbapénémase (Decré, 2012).

Suite à la résistance à l'imipénème, nous avons réalisé une expérience d'amplification génique pour la recherche de métallo- β -lactamases (M β L) de huit souches d'*Acinetobacter baumannii*, mais s'est révélée négatif. À partir des isolats cliniques d'*Acinetobacter baumannii* récupérés de trois hôpitaux différents dans l'Ouest d'Algérie (Tlemcen, Oran et Sid Bel Abbes), entre 2008 et 2012, **Mesli (2013)** ont identifié des métallo- β -lactamases de classe B (NDM-1, 16%). Cette présente étude est la première description de souches d'*Acinetobacter baumannii* productrices de métallo- β -lactamase bla_{NDM-1-like} dans l'Ouest d'Algérie.

De même, la résistance aux carbapénèmes est principalement médiée par la production d'oxacillinases, principalement les OXA-23, OXA-24 et OXA-58 (**Boulanger et al., 2012**), d'autres études similaires effectuées sur la même espèce ont permis l'identification d'oxacillinases appartenant au groupe OXA-23 (48,75%) et des OXA-24 (20%) (**Mesli et al., 2013**) et au groupe OXA-58 (100%) (**Drissi et al., 2010**) au niveau de CHU de Tlemcen.

Ainsi, une autre analyse génotypique par PCR au niveau de l'hôpital de Bicêtre en France mené par **Bonnin (2012)** sur des isolats originaires d'Afrique du nord ont permis d'identifier le gène (bla_{NDM-1})

Parmi les aminosides, la tobramycine reste la molécule la plus active. Les fluoroquinolones ont perdu beaucoup de leur efficacité contre *Acinetobacter baumannii* ces dernières années (**Ben Haj Khalifa et al., 2010**). Dans notre étude, le taux de résistance était 73,3% pour la ciprofloxacine, mais en comparant avec celui de l'étude de **Rabhi (2012)** qui est de 92,6% on remarque qu'il est inférieur. Cependant, il est supérieur à celui obtenu en Tunisie par **Ben Haj Khalifa (2010)** (63,3%).

Les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* présentent des taux de résistance très inférieurs à ceux observés pour *Acinetobacter baumannii*. Le taux de l'imipénème est de (18,8%) dans notre étude, il est identique à celui trouvé par **Ben Haj Khalifa (2010)** (18,7%). Cependant, il est complètement différent et inférieur à celui de l'étude de **Rabhi (2012)** (76,5%), et il est comparable à celui observé dans l'étude tunisienne (23%) (**Benjemaa et al., 2004**).

La résistance à l'imipénème, pourrait être due à un défaut de pénétration suite à une perte de la porine (OprD) ou d'une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique (AmpC) (**Decré, 2012**) et peut être expliquée par la forte consommation de l'imipénème dans l'hôpital de Tlemcen, où ce composé est prescrit pour le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* (**Drissi et al., 2008**). Dans notre étude, les bacilles pyocyaniques présentent un taux de résistance très élevé à la ticarcilline (81,8%). Cette résistance est probablement lié à des mécanismes non enzymatiques, essentiellement par un mécanisme d'efflux actif (**Cavallo et al., 1997**).

L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa* montre une nette dominance des souches présentant le phénotype d'efflux (63,6%). L'hyperproduction de céphalosporinases comme seul mécanisme de résistance enzymatique est observée chez 18,8% de nos souches, et les autres n'ont présenté aucune résistance acquise, donc considérées comme « sauvages ».

L'activité des fluoroquinolones sur le *Pseudomonas aeruginosa* est très variable selon les études : 45,5% de résistance à la ciprofloxacine dans notre série contre 33,3% de **Ben Haj Khalifa (2010)**, 25% en Amérique latine et 2% au Canada et aux Etats-Unis (**Dickema et al., 2000**). Aucune souche testée n'était résistante à l'amikacine.

La ceftazidime, l'imipénème et l'amikacine restent les antibiotiques les plus régulièrement actifs sur *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Ben Haj Khalifa et al., 2010**).

Les résultats ci-dessus montrent que les fréquences des souches multirésistantes d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* augmentent de façon inquiétante au niveau du service de réanimation de CHU de Tlemcen. Cependant, au cours de cette étude,

de même que celle de **Mesli (2010)**, **Sefraoui (2011)** et **Rabhi (2012)** aucune souche résistante à la colistine n'a été isolée. Ceci est en accord avec de nombreuses études (**Li et al., 2005**).

Conclusion

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance causant de réelles difficultés thérapeutiques.

Notre étude sur l'antibiorésistance des bacilles à Gram négatif non fermentants au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen a permis d'apprécier l'efficacité des antibiotiques utilisés.

La pression de sélection exercée par l'usage abusif des antibiotiques à large spectre est à l'origine de l'émergence préoccupante de souches d'*A.baumannii* multirésistantes. En plus de l'antibiothérapie, les procédures invasives (pose de sonde, intubation, ventilation artificielle, intervention chirurgicale) sont d'importants éléments à considérer.

Toutefois, aucune résistance à la colistine n'a été observée. Par ailleurs, l'augmentation de l'usage de cette molécule pour le traitement des infections à souches multirésistantes d'*A.baumannii* pourrait favoriser l'apparition de mutants résistants.

Un grand nombre d'antibiotiques reste efficace sur les bacilles pyocyaniques. La prédominance d'un seul mécanisme non enzymatique des souches de *P.aeruginosa* a été attribuée à la résistance à la ticarcilline pour le phénotype Efflux. Le mécanisme de résistance enzymatique est représenté par l'hyperproduction de céphalosporinase montrant une résistance à la ceftazidime.

L'analyse du contenu génomique par PCR est un complément nécessaire pour la comparaison et le suivi de l'évolution des souches pathogènes, et qui se révèle indispensable à une meilleure caractérisation épidémiologique des souches hospitalières pour déterminer l'origine clonale ou non d'une souche.

L'amélioration du pronostic de ces infections nosocomiales repose sur une antibiothérapie de première intention précoce et efficace, une surveillance régulière de la résistance aux antibiotiques afin d'adapter les schémas thérapeutiques adéquats et la sensibilisation du personnel soignant pour une application rigoureuse des mesures d'hygiène susceptible d'éviter leur dissémination.

Références bibliographiques

1. **Baron E-J, Pfaller M, Tenover F-C, Yolken R-H, Murray P-R. (1995).** Manual of clinical microbiology Graveniz, AV. *Acinetobacter baumannii, Alcaligenes, Moraxella*, and other non-fermentative bacteria. In: Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology. pp 520.
2. **Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. (2008).** An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. Indian Journal of Medical Microbiology. 26 (3): 233-37.
3. **Ben Haj Khalifa, Khedher M. (2010).** Fréquence et profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des hémocultures au chu de mahdia. Revue Tunisienne d'Infectiologie. 3 : 92 – 95.
4. **Benjemaa Z, Mahjoubi F, Ben Haj Hemida Y. (2004).** Profil bactériologique des bactériémies et sensibilité aux antibiotiques des bactéries en cause dans la région de Sfax (1993–1998). Pathol Biol 52 : 82-8.
5. **Berthelot P, Grattard F, Mallaval F-O, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. (2005).** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ed Elsevier. Pathologie Biologie. 53: 341-348.
6. **Bertrand X, Bailly P, Blasco G, Balvay P, Boillot A, Talon D. (2000).** Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. Clin Infect Dis; 31(4): E9-E14.
7. **Bonnin R-A, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J (2012).** Dissemination of New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. Clin Microbiol Infect. 18:E362–5.
8. **Bonten MJ, Austin DJ, Lipsitch M. (2001).** Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. Clin Infect Dis; 33(10): 1739-46.
9. **Borde Isabelle. (2006).** LA PCR *Polymerase chain reaction*, ou réaction de polymérisation en chaîne. *Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie*.
10. **Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P (2012).** NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. Antimicrob Agents Chemother. 56:2214–5.
11. **Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, Cattoen C, et al. (2005).** Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. J Hosp Infect. 60: 14-18.

12. **CA-SFM. (2010).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
13. **Cattoir Vincent. (2004).** Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. 52 : 607-616.
14. **Cattoir Vincent. (2012).** Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue francophone des laboratoires* 445 :79-87.
15. **Cavallo J-D, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. (2004).** Bêtalactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1 : 129-202.
16. **Cavallo J-D, Plesiat P, Couetdic G, Leblanc F, Fabre R. (1997).** Mechanism of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a french multicentre study. *J Antimicrob Chemother*; 50: 1039-43.
17. **Chaabane A, Aouama K, Boughattas NA, Chakroun M. (2009).** Allergie aux bêtalactamines: mythe et réalités. Ed Elsevier Masson. *Médecine et maladies infectieuses* 39 :278-287.
18. **Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Galleni C, Joris B. (1998).** Résistance bactérienne aux bêta-lactamines. *Médecine science* 14 :544-555.
19. **Corvec S, Caroff N, Espaze E, et al. (2003).** AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *antimicrob chemother*. 52 (4) :629-35.
20. **Courvalin Patrice. (2000).** Rapport d'activité de l'unité Agents antibactériens pour l'année 1999. Institut Pasteur. <http://www.pasteur.fr/units/aab>.
21. **De Champs C, Poirel L, Bonet R, Sirot D, Chanal C, Nordmann P. (2002).** Prospective survey of β -lactamases produced by Cefazidime resistant Agent. *Chemother*. 46: 3031-3034.
22. **Decré Dominique. (2012).** *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. *Revue francophone des laboratoires*. 441 : 43-52.
23. **Denton M, Kerr KC. (1998).** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clin. Microbial. Rev.* 11: 57-80.
24. **Dickema D-J, Pfaller M-A, Jones R-N, Doern G-V, Sader H-S. (2000).** Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection in the USA, Canada and Latine America. *Int J Antimicrob Agents* 13: 257-71.
25. **Drissi M, Baba Ahmed Z, Dehecq B, Bkour R, Pésiat P, Hocquet D. (2008).** Sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance aux β -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* : première étude en Algérie. *Médecine et Maladies infectieuses*. 38: 187-191.

26. **Drissi M, Poirel L, Mugnier P-D, Baba Ahmed Z, Nordmann P. (2010).** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. DOI: 10/1007/s 10096-010-1011-2. Letter to the Editor.
27. **Dupont M, Pagès J-M, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. (2005).** Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 4: 2386-90.
28. **Elouennass M, Bajjou T, Lemnouer A-H, Foissaud V, Hervé . (2003).** *Acinetobacter baumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses*. 33 : 361-364.
29. **Elouennass M, Sahnoun I, Zrara A, Bajjou T, Elhamzaoui S. (2008).** Epidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002-2005). *Médecine et maladies infectieuses*. 38 : 18-24.
30. **Eyquem A, Alouf J, Montagnier L. (2000).** *Traité de microbiologie clinique : Deuxièmes mises à jour et compléments*. pp43.
31. **Fauchère J-L, Avril J-L (2002).** *Bactériologie générale et médicale*. Ed ellipses. pp 280.
32. **Faure S. (2008).** Les quinolones et les fluoroquinolones. *Actualités pharmaceutiques*. 447: 41-43.
33. **Faure S. (2009).** Les aminosides. *Actualités pharmaceutiques*. 480 : 49-53.
34. **Fisher J-F, Meroueh S-O et al. (2005).** "Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity". *Chem Rev* 105 (2):395-424.
35. **Floret N, Bertrand X, Thouverez M, Talon D. (2009).** Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*. 57 : 9-12.
36. **Fomba Modibo (2006).** Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Acinetobacter* et des *Staphylococcus* a coagulasse négatif à l'hôpital du point G. thèse de doctorat en pharmacie.
37. **Gellen-Dautremer J. (2007).** Bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* en médecine intern : revue rétrospective de 51 épisodes. Thèse de doctorat en médecine Paris.
38. **Grace Yim. (2011).** L'Attaque des superbactéries: Résistance aux antibiotiques. *The Science Creative Quarterly*. Issue Six. Lapsus Nivium.
39. **Henry D-A, Mahenthiralingam E, Vandamm P, Coenye T, Speer D-P. (2001).** Phenotypic methods for determining genovar status of *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin. Microbial*; 39: 1073-1078.

40. **Héritier C, Poirel L, Fournier P-E, Nordmann P., et al. (2005).** Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 49(10): 4174–4179.
41. **Higgins P-G, Fluit A-C, Milatovic D, Verhoet J, Schmitz F-J. (2003).** Mutation in GyrA, ParC, Mex, and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agent*. 21: 490-13.
42. **Hocquet D. (2003).** Résistance aux antibiotiques par efflux actif chez *Pseudomonas aeruginosa*. mémoire de thèse Science de la vie et de la santé, Université d Franche-Comté, Besançon.
43. **Kettner M, Milosevic P, Hletkova M-J. (1995).** Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype 011. Isolates. *Infection*. 23(6): 380-3.
44. **Lahlou Amin I, Salord H, Gille Y, Roure C, Tigaud S, Bajou T, Ratbi N, Kassmi H-L. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance isolée à l'imipénème : clone émergent en milieu hospitalier. *Les techniques de laboratoire*. 11 : 4-9.
45. **Lastours V, Fantin B. (2010).** Résistance aux fluoroquinolones en 2010 : quel impact pour la prescription en réanimation ? Service de médecine interne, hôpital Beaujon, Assistance publique-Hôpitaux de Paris. 19 : 347-353.
46. **Lavigne J-P. (2007).** Effet des antibioques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
47. **Lavigne J-P, Gaillard J-B, Bourg G, Tichit C, Lecaillon E, Soto A. (2008).** Etude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLES : détection de CTX-M et étude de la virulence. *Pathologie Biologie*. 65 : 447-453.
48. **Le Bourgeois Muriel, Vrielynck Stéphanie. (2005).** Infection bronchopulmonaire dans la mucoviscidose. *Médecine Thérapeutique/ Pédiatrie*. 8 (3): 157-81.
49. **Lee K, Lim Y, Yong S D, Yum J-H, Y Chong. (2003).** Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -Lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp.
50. **Li Jian, Nation Roger L, Milne Robet W, Turnidge John D, Coulthard K. (2005).** Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int Journal of Antimicrobial Agent*. 25: 11-25.
51. **Liaw S-J, Lee Y-L, Hsueh P-R. (2010).** Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase

- (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agent*.35: 126-130.
52. **Liaïd A. (2012).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Mémoire de magister. Université d'Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
53. **Mammeri Hedi, (2007).** Mécanismes de résistance aux antibiotiques (DCEM1). MCU-PH, Service de Bactériologie-Hygiène, CHU Amiens. Hôpital de Nantes.
54. **Matthaiou D-K, Chasou E, Atmatzidis S, Tsolkas P. (2011).** A case of bacteremia due to *Burkholderia cepacia* in a patient without cystic fibrosis. *Resperatory Medecine CME*. 4: 144-145.
55. **McGowan J-E. (2006).** Resistance in no fermenting Gram-negative bacteria: Multidrug resistance to maximum. *The American Journal of Medecine*. 119: S29-S36.
56. **Meghdas I, Loie C, Baida N, Hamze M, Husson. (2003).** Epidémiologie des infections provoquées par les bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* au cours de la mucoviscidose. *Archives de pédiatrie*. 11 :360-366.
57. **Mérens A, Frédéric J, Hoan V-T, Cavallo J-D, Katy J. (2012).** Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. *Revue francophone des laboratoires*. 445 : 59-74.
58. **Mérens Audrey, Aurélie Servonnet. (2010).** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. La résistance aux anti-infectieux. *Revue francophone des laboratoires*. 422 : 33-41.
59. **Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha S-N, Rolain J-M. (2013).** Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- β -lactamase in *Acinetobacter species*, Algeria. (2013). [Int J Infect Dis](#). 16: S1201-9712.
60. **Mesli E. (2010).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* au niveau de CHU de Tlemcen. . Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
61. **Minchella A, Molinari L, Alonso S, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J-P. (2010).** évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie Biologie*. 58 : 1-6.
62. **Naas T. (2003).** Phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche d'*Acinetobacter baumannii* productrice de la β -lactamase VEB-1. *Journal of clinical microbiology*. 41:3542-7.
63. **Nauciel C. (2000).** Bactériologie médicale. Ed ellipses. pp 56.

64. **Niang O. (2003).** Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à gram négatif non fermentaires. Thèse de Pharm., Dakar. n° 60.
65. **Nordmann P, Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Plésiat P. (2009).** Naturally Occurring Class A β -Lactamases from the *Burkholderia cepacia* Complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(3): 876–882.
66. **Nordmann P. (2006).** l'émergence de la résistance aux quinolones chez les entérobactéries. *Pathologie Biologie.* 54 : 7-9.
67. **Nukaga M, Mayama K, Hujer A-M, Bonoma R-A, Knox J-R. (2003).** Ultrahigh resolution of class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *J.Mol.Biol.* 328:289-301.
68. **Page Clive P, Curtis Michael J, Sutter Morly C. (1999).** *Pharmacologie intégrée.* pp 491.
69. **Perronne Christain. (1999).** *Maladies infectieuses, volume 1.* pp65.
70. **Philippon A. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa: Phénotype de résistance aux antibiotiques.* *Méd Mal Infct ;* 28 :134-49.
71. **Philippon, Arlet. (2006).** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de Biologie Clinique. Volume 64, Revue générale.* 1 : 37-51
72. **Poirel L, Nordmann P. (2006).** Résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques. Edition Masson.* 8 (2) : 100-107.
73. **Poirel Laurent. (2006).** Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives. XVIIe Congrès nationale de la SFHH-Nantes. P 25.
74. **Poisson J. (1992).** Glycoaminosides. In *Traite de chimie thérapeutique volume 2 : Médicaments antibiotiques.* Edition Tec et Doc. Lavoisier.
75. **Poole K. (2004).** Efflux mediated multiresistance in Gram-négatif bacteria. *Clin. Microbial. Infect.* 10:12-13.
76. **Rabhi F. (2012).** *Contribution à l'étude de la résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants aux antibiotiques : cas de la colistine en réanimation. Mémoire de master en microbiologie.* Université d'Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
77. **Richard C, Keredjian M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobie stricts : *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella.* Inst Pasteur, 2^e édition. 2 : 22-26.
78. **Richard. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA 3498 chez *Pseudomonas aeruginosa.* *Maitrise en microbiologie-immunologie.*

79. **Richet H. (2003).** Prise en charge d'une épidémie à *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals Françaises d'Anesthésie et Réanimation*. 2 : 544-547.
80. **Saïdani M, Boutiba I, Ghozzi R, Kammoun A, Ben Redjeb S. (2006).** Profil bactériologique des bactériémies à germes multirésistants à l'hôpital Charles- Nicolle de Tunis. *Med Mal Infect* 2006 ; 36 : 163-6.
81. **Saito K, Yoneyama H, Nakae T. (1999).** nalB-type mutation causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* . *FEMS Microbiology Letters*. 179: 67-72.
82. **Sefraoui I. (2011).** Épidémiologie de la résistance aux antibiotiques des bactéries à gram négatif non hétérofermentaires au niveau du CHU de sidi Bel Abbes. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaïd- Tlemcen.
83. **Segonds C, Chabanon G, Monteil H. (2006).** Espèces du complexe *Burkholderia cepacia*: épidémiologie, pathogénicité et résistance aux antibiotiques. *Antibiotiques*. 8 : 43-50.
84. **Segonds C, Chabanon G. (2001).** *Burkholderia cepacia*: dangers of a phytopathogen organism for patients with cystic fibrosis. *Ann Bio Clin*. 59 : 69-259.
85. **Segonds C, Marty N, Agueda L, Chabanon G. (1995).** *Pseudomonas cepacia*: la percée d'un opportuniste. *Revue française des laboratoires*. 247 : 87-93.
86. **Sougakoff W, Trystram D. (2003).** Résistance aux β -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de médecine. P 59.
87. **Soussy C-J. (2007).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Monographies en urologie*. P: 21-46.
88. **Speert D. (2002).** Infections au complexe *Burkholderia cepacia* chez les patients atteints de fibrose kystique — Questions les plus souvent posées. *Canadian Cystic Fibrosis Foundation*.
89. **Turner P-J, Greenhalgh J-M. (2003).** Activity of méropénème and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospital. *Clin Microbiol Inf*. 9:563-7.
90. **Vedel G (2005).** Simple method to determine β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 56(4): 657-664.
91. **Walsh T-R, Toleman M-A, Poirel L, Nordmann P. (2005).** The quiet before the storm? *Clin Microbial Rev*. 39: 757-62.

92. **Weldhagen G-F, Poirel L, Nordmann P. (2003).** Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agent Chemother.* 47: 2385-92.
93. **Wolff M, Joly-Guillou ML, Pajot O. (2009).** Les carbapénèmases. Comparative review of carbapenemes. *Reanimation* 18: S199-S208.
94. **Yala D, Merad A-S, Mohameddi D, Ooar Korich M-N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Ed Médecine du Maghreb. 91 :1.
95. **Yétérian E. (2010).** Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.
96. **Yoneyama H, Ocaktan A, Tsuda M, Nakae T. (1997).** The role of mex6gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 233: 611-618.
97. **Zahoun A, Dao I, Karfo R, Essayagh T, Sekhsokh Y, Bousta M, Elhamzaoui S. (2010).** Méningite nosocomiale postopératoire à *Acinetobacter baumannii* multirésistant en neurochirurgie : à propos d'un cas nosocomial. *Pathologie Biologie.* 29-31.

Annexes

Annexe 1. Tableau de lecture de la Galerie API 20 NE.

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1 + NIT2/5min	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	Zn / 5mn	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	James/ immédiate	
			Incolore vert pâle/jaune	Rose
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	orange/ rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse (β -glucosidase)	Jaune	Gris/marron/ noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	assimilation	transparence	Trouble
ARA	Arabinose	assimilation	transparence	Trouble
MNE	Mannose	assimilation	transparence	Trouble
MAN	Mannitol	assimilation	transparence	Trouble
NAG	N-acétyl- glucosamine	assimilation	transparence	Trouble
MAL	Maltose	assimilation	transparence	Trouble
GNT	Gluconate	assimilation	transparence	Trouble
CAP	Caprate	assimilation	transparence	Trouble
ADI	Adipate	assimilation	transparence	Trouble
MLT	Malate	assimilation	transparence	Trouble
CIT	Citrate	assimilation	transparence	Trouble
PAC	Phényl-acétate	assimilation	transparence	Trouble

Annexe 2. Tableau d'identification du catalogue analytique PI 20NE

API 20 NE	V7.0	NOs	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUs	ARAs	MNEs	MANs	NAGs	MALs	GNTs	CAFs	ADIs	MLTs	CITs	FACs	OX
<i>Achromobacter denitrificans</i>		83	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	88	20	98	98	84	83	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	89	0	30	1	1	1	100	81	84	98	88	88	100
<i>Acinetobacter baumannii/coloceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	87	70	1	1	1	1	20	88	80	100	89	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	88	0	1	0	0	0	0	0	89	2	98	81	1	0	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	89	4	95	70	0	0	0
<i>Acinetobacter lawfi</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	70	20	48	1	38	0	0
<i>Acinetobacter radiocrescens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	87	100	2	2	87	0	0
<i>Aeromonas hydrophila/bavise</i>		89	89	88	78	1	89	87	88	89	80	78	89	89	89	85	84	1	89	37	1	89
<i>Aer.salm.ssp.masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	88	0	33	60	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	67	38	0	100	89	18	84	1	0	88	84	89	89	0	1	89	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	88	88	88	0	1	89	89	100	12	89	89	89	100	100	83	0	89	81	0	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	87	87	88
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	89	73	91	100	89	73	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	89	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	89
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	98	100	100	100	85
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		78	0	0	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	84	85	91	80	100	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	89	33	0	100
<i>Brevundimonas vesiculans</i>		16	0	0	0	0	88	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	88
<i>Burkholderia cypica</i>		38	0	24	1	1	48	70	72	100	75	89	88	88	8	87	89	83	100	89	89	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	88	0	5	100	0	100	0	89	100	100	0	100	100	99	100	88	84	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>		87	1	89	100	0	0	100	0	100	0	88	10	87	0	100	76	0	100	38	0	87
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	88	89	22	65	12	37	1	0	88	1	0	1	1	12	12	88
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	89	86	83	88	1	80	78	70	81	0	0	1	0	25	0	89
<i>Comamonas testosteroni/Pls. alcaligenes</i>		76	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	66	38	87	32	3	88
<i>Deiftia acidovorans</i>		88	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	78	0	0	89	71	89	89	28	83	100
<i>Grimontia hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	87	88	0	24	1	41	0	0	84	0	0	100
<i>Mannheimia haemolytica/Pasteurella tetratos</i>		86	0	2	0	0	2	0	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	78	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	88
<i>Moraxella lacunata</i>		89	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	89
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	89
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	84	1	89	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	100
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		89	0	0	0	84	1	0	1	82	76	80	20	76	78	34	34	4	89	47	1	89
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	89	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	85	85	28	88
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	87	0	100	0	0	100	89	76	87	1	80	89	87	0	0	86	0	0	77
<i>Pasteurella multocida</i>		88	88	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	88
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	81	28	0	86	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		88	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		89	0	84	88	88	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	83	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		89	88	88	88	0	0	88	84	0	12	0	77	88	89	77	0	84	0	0	0	89
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		88	0	0	88	20	1	82	1	89	1	1	89	84	1	87	88	81	88	89	1	88
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	38	1	89	71	87	89	86	1	89	89	10	89	89	15	89
<i>Pseudomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	30	88	89	89	89	88	12	78	85	82	1	84	84	1	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	84	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	89	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas oryzae/habitans</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	89	89	100	0	84	89	88	2	89	89	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	89	68	67	5	2	1	87	89	1	100	89	68	89
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		84	0	0	1	1	0	1	0	88	1	10	87	0	76	87	87	1	89	85	1	100
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		89	0	0	0	86	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	88	36	1	10	14	0	89	88	82	89	88	15	89
<i>Rhizobium radiobacter</i>		88	0	0	0	85	89	1	89	100	100	100	100	89	89	89	2	0	100	0	1	89
<i>Shewanella putrefaciens group</i>		88	0	1	0	1	71	86	0	6	11	0	0	86	10	1	71	1	80	2	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	86	100	1	89	89	81	89	0	89	89	0	0	0	1	0	0	88
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	89	10	100	100	0	0	0	0	0	0	88
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	87	1	80	89	83	75	15	84	86	34	9	3	81	45	1	78
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	88	89	87	84	3	86	2	88	89	2	1	0	88	88	0	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>		88	83	83	0	0	85	81	10	78	1	18	76	67	74	78	1	0	89	1	0	89
<i>Vibrio cholerae</i>		89	100	89	0	0	1	89	89	88	0	30	78	76	87	88	1	0	89	87	1	100
<i>Vibrio matschikovi</i>		0	60	84	0	0	7	100	60	100	0	71	89	89	89	89	17	0	89	60	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		88	88	100	1	6	1	88	87	89	81	82	89	61	88	89	0	1	89	21	1	89
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	86	86	0	1	86	89	89	9	0	10	9	1	6	28	0	0	86	81	0	100
<i>Wastleria paucula</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	88	88	88	88	88	14	88
<i>Weekseella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	88

Annexe 3. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa* (CA SFM, 2010).

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testées	Signe	Charge des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
<i>β-lactamines</i>	Ticarcilline	TIC	75µg	≤16	> 64	≥22	<18
	Ticarcilline+ac. clavulanique	TCC	75/10µg/ml	≤ 16/2	>64/2	≥22	<18
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤16	>64	≥18	<12
	Pipéracilline+ta zobactam	TZP	75/10µg/ml	≤16/4	>64/4	≥19	<14
	Aztréonam	ATM	30µg/ml	≤4	>8	≥23	<21
	Ceftazidime	CAZ	30µg/ml	≤4	>8	≥21	<19
	Imipénème	IMP	30µg/ml	≤2	>8	≥24	<17
<i>Aminosides</i>	Amikacine	AN	30µg/ml	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamycine	GM	15µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
	Tobramycine	TM	30µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
<i>FQuinolones</i>	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml	≤1	>1	≥22	<22
<i>Autres</i>	Colistine	CS	50µg/ml	≤2	>2	≥15	<15

**Annexe 4. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour
Acinetobacter spp., *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*
(CASFM,2010).**

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testées	Signe	Charge des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
<i>β-lactamines</i>	Ticarcilline	TIC	75µg	≤16	> 16	≥22	<22
	Ticarcilline+ac. clavulanique	TCC	75/10µg/ml	≤ 16/2	>16/2	≥22	<22
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤16	>16	≥18	<18
	Pipéracilline+ta zobactam	TZP	75/10µg/ml	≤16/4	>16/4	≥19	<19
	Aztréonam	ATM	30µg/ml	≤1	>16	≥27	<19
	Ceftazidime	CAZ	30µg/ml	≤8	>8	≥19	<19
	Imipénème	IMP	30µg/ml	≤4	>8	≥22	<17
<i>Aminosides</i>	Amikacine	AN	30µg/ml	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamycine	GM	15µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
	Tobramycine	TM	30µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
<i>FQuinolones</i>	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml	≤0,5	>1	≥25	<22
<i>Autres</i>	Colistine	CS	50µg/ml	≤2	>2		

Annexe 5. Préparation des solutions d'antibiotiques.

Solution initiale ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Solution mère (ml)	Eau distillée (ml)	Concentration obtenue ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentration finale dans le milieu ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25

Annexe 6. Résultats d'antibiogramme obtenus pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*

1. β -lactamines

Souches	PIP ≥18<12	TZP ≥19<14	TIC ≥22<18	TCC ≥22<18	ATM ≥23<21	CAZ ≥21<19	IMP ≥24<17	Mécanisme suspecté
A.b 1	9 R	13 R	15 R	13 R	7 R	7 R	27 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 2	8 R	15 I	13 R	15 R	7 R	7 R	28 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 3	9 R	12 R	13 R	16 R	7 R	8 R	28 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 4	21 S	22 S	22 S	22S	21 I	21S	30 S	Sauvage
A.b 5	10 R	13 R	7 R	7 R	12 R	7 R	12R	Multirésistante (IMP R)
A.b 6	7 R	9 R	7 R	7 R	8 R	7 R	10 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 7	7 R	11 R	7 R	7 R	7 R	9 R	11 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 8	7 R	8R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 9	9 R	12 R	13 R	16 R	7 R	8 R	28 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 10	8 R	15 I	14 R	14 R	12 R	7 R	24 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 11	7 R	8 R	7 R	7 R	8 R	7 R	8 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 12	7 R	9 R	7 R	7 R	7 R	7 R	11 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 13	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	10 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 14	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 15	7 R	11 R	7 R	8 R	7 R	8 R	24 S	Multirésistante (IMP S)

2. Autres classes d'antibiotiques

Souches	Aminosides			Fluoroquinolones	Autres
	Tobramycine ≥16<16	Gentamicine ≥16<16	Amikacine ≥17<15	Ciprofloxacine ≥22<22	Colistine ≥15<15
A.b 1	25 S	10 R	7 R	22 S	24 S
A.b 2	10 R	23 S	8 R	8 R	19 S
A.b 3	10 R	11 R	13 R	11 R	16 S
A.b 4	21 S	23 S	21 S	28 S	18 S
A.b 5	18 S	15 R	11 R	11 R	21 S
A.b 6	9 R	17 S	9 R	22 S	18 S
A.b 7	7 R	13 R	11 R	7 R	17 S
A.b 8	24 S	23 S	10 R	7 R	22 S
A.b 9	10 R	12 R	18 S	8 R	18 S
A.b 10	10 R	7 R	13 R	10 R	19 S
A.b 11	9 R	15 R	8 R	7 R	16 S
A.b 12	21 S	7 R	10 R	8 R	16 S
A.b 13	18 S	7 R	7 R	9 R	18 S
A.b 14	11 R	14 R	21 S	9 R	22 S
A.b 15	20 S	17 S	8 R	22 S	16 S

Annexe 7. Résultats d'antibiogramme obtenus pour les souches de

Pseudomonas aeruginosa

1. β -lactamines

Souches	PIP	TZP	TIC	TCC	ATM	CAZ	IMP	Mécanisme suspecté
	$\geq 18 < 18$	$\geq 19 < 19$	$\geq 22 < 22$	$\geq 22 < 22$	$\geq 27 < 19$	$\geq 19 < 19$	$\geq 22 < 17$	
P.a 1	26 S	17 R	20 R	20 R	27 S	16 R	13 R	Case
P.a 2	22 S	23 S	16 R	17 R	23 I	24 S	28 S	Efflux
P.a 3	19 S	21 S	20 R	20 R	26 I	26 S	27 S	Efflux
P.a 4	21 S	25 S	17 R	15 R	24 I	24 S	23 S	Efflux
P.a 5	25 S	22 S	21 R	17 R	23 I	20 S	26 S	Efflux
P.a 6	23 S	20 S	20 R	19 R	25 I	22 S	22 S	Efflux
P.a 7	25 S	25 S	25 S	23 S	28 S	26 S	27 S	Sauvage
P.a 8	24 S	27 S	26 S	23 S	27 S	24 S	24 S	Sauvage
P.a 9	20 S	16 R	14 R	20 R	19 R	17 R	14 R	Case
P.a 10	19 S	26 S	25 S	25 S	26 I	22 S	26 S	Efflux
P.a 11	21 S	23 S	20 R	18 R	17 R	23 S	24 S	Efflux

2. Autres classes d'antibiotiques

Souches	Aminosides			Fluoroquinolones	Autres
	Tobramycine $\geq 16 < 16$	Gentamicine $\geq 16 < 16$	Amikacine $\geq 17 < 15$	Ciprofloxacine $\geq 25 < 22$	Colistine
P.a 1	15 R	13 R	19 S	27 S	19 S
P.a 2	15 R	15 R	20 S	20 R	17 S
P.a 3	19 S	14 R	17 S	22 R	17 S
P.a 4	23 S	15 R	22 S	21 R	20 S
P.a 5	13 R	16 R	19 S	29 S	18 S
P.a 6	15 R	15 R	23 S	23 I	21 S
P.a 7	15 R	13 R	14 S	35 S	21 S
P.a 8	17 S	20 S	23 S	33 S	10 S
P.a 9	15 R	15 R	19 S	22 I	19 S
P.a 10	17 S	18 S	17 S	29 S	20 S
P.a 11	17 S	19 S	22 S	26 S	18 S

Annexe 8. Résultats de CMI ($\mu\text{g/ml}$) d'*Acinetobacter baumannii*.

Souches	IMP $\leq 2 > 8$	CAZ $\leq 4 > 8$	CIP $\leq 1 > 1$	AN $\leq 8 > 16$	Mécanisme suspecté
A.b 1	2	4	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 2	32	128	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 3	2	256	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 4	1	0,25	<0,125	2	Sauvage
A.b 5	64	256	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 6	32	64	32	128	Multirésistante (IMP R)
A.b 7	64	256	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 8	32	64	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 9	1	32	64	128	Multirésistante (IMP S)
A.b 10	2	64	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 11	32	128	128	128	Multirésistante (IMP R)
A.b 12	32	64	128	32	Multirésistante (IMP R)
A.b 13	32	128	32	128	Multirésistante (IMP R)
A.b 14	64	64	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 15	32	256	128	128	Multirésistante (IMP S)

Annexe 1. Tableau de lecture de la Galerie API 20 NE.

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1 + NIT2/5min	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des	Zn / 5mn	

		nitrates en azote	Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	James/ immédiate	
			Incolore vert pâle/jaune	Rose
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	orange/ rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse (β -glucosidase)	Jaune	Gris/marron/ noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophénil- β D-galactopyranoside	β -galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	assimilation	transparence	Trouble
ARA	Arabinose	assimilation	transparence	Trouble
MNE	Mannose	assimilation	transparence	Trouble
MAN	Mannitol	assimilation	transparence	Trouble
NAG	N-acétyl- glucosamine	assimilation	transparence	Trouble
MAL	Maltose	assimilation	transparence	Trouble
GNT	Gluconate	assimilation	transparence	Trouble
CAP	Caprate	assimilation	transparence	Trouble
ADI	Adipate	assimilation	transparence	Trouble
MLT	Malate	assimilation	transparence	Trouble
CIT	Citrate	assimilation	transparence	Trouble
PAC	Phényl-acétate	assimilation	transparence	Trouble

Annexe 2. Tableau d'identification du catalogue analytique PI 20NE

API 20 NE	V7.0	NOs	TRF	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUs	ARAs	MNEs	MANs	NAGs	MALs	GNTs	CAFs	ADIs	MLTs	CITs	FACs	OX
<i>Achromobacter denitrificans</i>		83	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	88	20	98	98	84	93	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	89	0	90	1	1	1	100	81	84	99	98	98	100
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	87	70	1	1	1	1	20	88	80	100	98	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	88	0	1	0	0	0	0	0	89	2	98	81	1	0	
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	89	4	95	70	0	0	
<i>Acinetobacter lawii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	70	20	48	1	38	0	
<i>Acinetobacter radiorubens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	87	100	2	2	87	0	
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		89	89	89	78	1	89	87	88	89	80	78	89	89	89	85	84	1	89	37	1	89
<i>Aer.salm.ssp.masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	88	0	33	60	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	67	38	0	100	89	18	84	1	0	98	84	99	89	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	89	88	88	0	1	89	89	100	12	89	89	89	100	100	83	0	89	81	0	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	87	87	88
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	89	73	91	100	88	73	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	89	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	89
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	96
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		78	0	0	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	84	85	91	80	100	
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	88	33	0	100	
<i>Brevundimonas vesiculans</i>		16	0	0	0	0	88	12	84	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	88
<i>Burkholderia cepacia</i>		38	0	24	1	1	48	70	72	100	75	89	88	88	8	87	89	83	100	89	89	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	88	0	5	100	0	100	0	89	100	100	0	100	100	99	100	88	84	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>		87	1	88	100	0	0	100	0	100	0	88	10	87	0	100	75	0	100	38	0	87
<i>Chryseobacterium oligogenes</i>		20	81	1	0	78	88	89	22	65	12	37	1	0	88	1	0	1	1	12	12	88
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	89	86	83	88	1	89	78	70	81	0	0	1	0	25	0	89
<i>Comamonas testosteroni/Pls. alcaligenes</i>		76	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	65	38	87	32	3	88
<i>Delta acidovorans</i>		88	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	78	0	0	89	71	89	99	28	83	100
<i>Grimontia hollisae</i>		100	100	81	0	0	0	0	3	10	87	88	0	24	1	41	0	0	84	0	0	100
<i>Mannheimia haemolytica/Pasteurella tetratos</i>		85	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Methylobacterium mesophilum</i>		21	0	0	0	78	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	88
<i>Moraxella lacunata</i>		80	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	89	
<i>Moraxella spp.</i>		84	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	88
<i>Myroides spp.</i>		0	1	0	0	84	1	89	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	80	20	75	78	34	34	4	99	47	1	89
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	89	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	85	85	28	88
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	87	0	100	0	0	100	89	76	87	1	80	89	87	0	0	85	0	0	77
<i>Pasteurella multocida</i>		88	88	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	88
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	81	28	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp.</i>		88	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		89	0	84	89	89	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	83	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		89	89	88	88	0	0	88	84	0	12	0	77	88	89	77	0	84	0	0	88	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		89	0	0	89	20	1	82	1	89	1	1	89	84	1	87	88	91	88	89	1	88
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	89	1	1	39	1	89	71	87	89	85	1	89	89	10	89	89	15	89
<i>Pseudomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	39	88	89	89	88	88	12	78	85	82	1	84	84	1	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	84	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	89	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	89	89	100	0	84	89	88	2	89	89	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	89	68	67	5	2	1	87	89	1	100	89	68	89
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		84	0	0	1	1	0	1	0	88	1	10	87	0	75	87	87	1	88	85	1	100
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		89	0	0	0	85	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	89	35	1	10	14	0	89	88	82	89	88	15	88
<i>Rhizobium radiobacter</i>		88	0	0	0	85	88	1	89	100	100	100	100	89	89	89	2	0	100	0	1	88
<i>Shewanella putrefaciens group</i>		88	0	1	0	1	71	85	0	6	11	0	0	85	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	85	100	1	89	89	81	89	0	89	89	0	0	0	1	0	0	89
<i>Sphingobacterium spiritovorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	89	10	100	100	0	0	0	0	0	0	89
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	87	1	89	89	83	75	15	84	85	34	9	3	81	45	1	78
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	89	89	87	84	3	85	2	88	89	2	1	0	89	88	0	7
<i>Vibro alginolyticus</i>		88	83	83	0	0	85	81	10	78	1	18	75	67	74	78	1	0	88	1	0	88
<i>Vibro cholerae</i>		89	100	89	0	0	1	89	89	88	0	30	78	76	87	88	1	0	88	87	1	100
<i>Vibro matschkovi</i>		0	60	84	0	0	7	100	60	100	0	71	89	89	89	89	17	0	89	60	0	0
<i>Vibro parahaemolyticus</i>		89	89	100	1	6	1	88	87	89	81	82	89	61	88	90	0	1	89	21	1	88
<i>Vibro vulnificus</i>		100	85	85	0	1	85	89	89	9	0	10	9	1	6	28	0	0	85	81	0	100
<i>Wastleria paucula</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	88	88	89	88	14	88
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	88

Annexe 3. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa* (CA SFM, 2010).

Famille d'antibiotiques	Antibiotiques testées	Signe	Charge des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
<i>β-lactamines</i>	Ticarcilline	TIC	75µg	≤16	> 64	≥22	<18
	Ticarcilline+ac. clavulanique	TCC	75/10µg/ml	≤ 16/2	>64/2	≥22	<18
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤16	>64	≥18	<12
	Pipéracilline+ta zobactam	TZP	75/10µg/ml	≤16/4	>64/4	≥19	<14
	Aztréonam	ATM	30µg/ml	≤4	>8	≥23	<21
	Ceftazidime	CAZ	30µg/ml	≤4	>8	≥21	<19
	Imipénème	IMP	30µg/ml	≤2	>8	≥24	<17
<i>Aminosides</i>	Amikacine	AN	30µg/ml	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamycine	GM	15µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
	Tobramycine	TM	30µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
<i>FQuinolones</i>	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml	≤1	>1	≥22	<22
<i>Autres</i>	Colistine	CS	50µg/ml	≤2	>2	≥15	<15

**Annexe 4. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour
Acinetobacter spp., *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*
(CASFM,2010).**

<i>Familles d'antibiotiques</i>	<i>Antibiotiques testées</i>	<i>Signe</i>	<i>Charge des disques</i>	<i>Concentrations critiques (mg/L)</i>		<i>Diamètres critiques (mm)</i>	
				<i>Sensible S</i>	<i>Résistante R</i>	<i>Sensible S</i>	<i>Résistante R</i>
<i>β-lactamines</i>	Ticarcilline	TIC	75µg	≤16	> 16	≥22	<22
	Ticarcilline+ac. clavulanique	TCC	75/10µg/ml	≤ 16/2	>16/2	≥22	<22
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤16	>16	≥18	<18
	Pipéracilline+ta zobactam	TZP	75/10µg/ml	≤16/4	>16/4	≥19	<19
	Aztréonam	ATM	30µg/ml	≤1	>16	≥27	<19
	Ceftazidime	CAZ	30µg/ml	≤8	>8	≥19	<19
	Imipénème	IMP	30µg/ml	≤4	>8	≥22	<17
<i>Aminosides</i>	Amikacine	AN	30µg/ml	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamycine	GM	15µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
	Tobramycine	TM	30µg/ml	≤4	>4	≥16	<16
<i>FQuinolones</i>	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml	≤0,5	>1	≥25	<22
<i>Autres</i>	Colistine	CS	50µg/ml	≤2	>2		

Annexe 5. Préparation des solutions d'antibiotiques.

Solution initiale ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Solution mère (ml)	Eau distillée (ml)	Concentration obtenue ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentration finale dans le milieu ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25

Annexe 6. Résultats d'antibiogramme obtenus pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*

3. β -lactamines

Souches	PIP ≥18<12	TZP ≥19<14	TIC ≥22<18	TCC ≥22<18	ATM ≥23<21	CAZ ≥21<19	IMP ≥24<17	Mécanisme suspecté
A.b 1	9 R	13 R	15 R	13 R	7 R	7 R	27 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 2	8 R	15 I	13 R	15 R	7 R	7 R	28 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 3	9 R	12 R	13 R	16 R	7 R	8 R	28 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 4	21 S	22 S	22 S	22S	21 I	21S	30 S	Sauvage
A.b 5	10 R	13 R	7 R	7 R	12 R	7 R	12R	Multirésistante (IMP R)
A.b 6	7 R	9 R	7 R	7 R	8 R	7 R	10 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 7	7 R	11 R	7 R	7 R	7 R	9 R	11 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 8	7 R	8R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 9	9 R	12 R	13 R	16 R	7 R	8 R	28 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 10	8 R	15 I	14 R	14 R	12 R	7 R	24 S	Multirésistante (IMP S)
A.b 11	7 R	8 R	7 R	7 R	8 R	7 R	8 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 12	7 R	9 R	7 R	7 R	7 R	7 R	11 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 13	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	10 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 14	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	Multirésistante (IMP R)
A.b 15	7 R	11 R	7 R	8 R	7 R	8 R	24 S	Multirésistante (IMP S)

4. Autres classes d'antibiotiques

Souches	Aminosides			Fluoroquinolones	Autres
	Tobramycine ≥16<16	Gentamicine ≥16<16	Amikacine ≥17<15	Ciprofloxacine ≥22<22	Colistine ≥15<15
A.b 1	25 S	10 R	7 R	22 S	24 S
A.b 2	10 R	23 S	8 R	8 R	19 S
A.b 3	10 R	11 R	13 R	11 R	16 S
A.b 4	21 S	23 S	21 S	28 S	18 S
A.b 5	18 S	15 R	11 R	11 R	21 S
A.b 6	9 R	17 S	9 R	22 S	18 S
A.b 7	7 R	13 R	11 R	7 R	17 S
A.b 8	24 S	23 S	10 R	7 R	22 S
A.b 9	10 R	12 R	18 S	8 R	18 S
A.b 10	10 R	7 R	13 R	10 R	19 S
A.b 11	9 R	15 R	8 R	7 R	16 S
A.b 12	21 S	7 R	10 R	8 R	16 S
A.b 13	18 S	7 R	7 R	9 R	18 S
A.b 14	11 R	14 R	21 S	9 R	22 S
A.b 15	20 S	17 S	8 R	22 S	16 S

Annexe 7. Résultats d'antibiogramme obtenus pour les souches de

Pseudomonas aeruginosa

2. β -lactamines

Souches	PIP ≥18<18	TZP ≥19<19	TIC ≥22<22	TCC ≥22<22	ATM ≥27<19	CAZ ≥19<19	IMP ≥22<17	Mécanisme suspecté
P.a 1	26 S	17 R	20 R	20 R	27 S	16 R	13 R	Case
P.a 2	22 S	23 S	16 R	17 R	23 I	24 S	28 S	Efflux
P.a 3	19 S	21 S	20 R	20 R	26 I	26 S	27 S	Efflux
P.a 4	21 S	25 S	17 R	15 R	24 I	24 S	23 S	Efflux
P.a 5	25 S	22 S	21 R	17 R	23 I	20 S	26 S	Efflux
P.a 6	23 S	20 S	20 R	19 R	25 I	22 S	22 S	Efflux
P.a 7	25 S	25 S	25 S	23 S	28 S	26 S	27 S	Sauvage
P.a 8	24 S	27 S	26 S	23 S	27 S	24 S	24 S	Sauvage
P.a 9	20 S	16 R	14 R	20 R	19 R	17 R	14 R	Case
P.a 10	19 S	26 S	25 S	25 S	26 I	22 S	26 S	Efflux
P.a 11	21 S	23 S	20 R	18 R	17 R	23 S	24 S	Efflux

3. Autres classes d'antibiotiques

Souches	Aminosides			Fluoroquinolones	Autres
	Tobramycine ≥16<16	Gentamicine ≥16<16	Amikacine ≥17<15	Ciprofloxacine ≥25<22	Colistine
P.a 1	15 R	13 R	19 S	27 S	19 S
P.a 2	15 R	15 R	20 S	20 R	17 S
P.a 3	19 S	14 R	17 S	22 R	17 S
P.a 4	23 S	15 R	22 S	21 R	20 S
P.a 5	13 R	16 R	19 S	29 S	18 S
P.a 6	15 R	15 R	23 S	23 I	21 S
P.a 7	15 R	13 R	14 S	35 S	21 S
P.a 8	17 S	20 S	23 S	33 S	10 S
P.a 9	15 R	15 R	19 S	22 I	19 S
P.a 10	17 S	18 S	17 S	29 S	20 S

P.a 11	17 S	19 S	22 S	26 S	18 S
---------------	------	------	------	------	------

Annexe 8. Résultats de CMI ($\mu\text{g/ml}$) d'*Acinetobacter baumannii*.

Souches	IMP $\leq 2 > 8$	CAZ $\leq 4 > 8$	CIP $\leq 1 > 1$	AN $\leq 8 > 16$	Mécanisme suspecté
A.b 1	2	4	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 2	32	128	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 3	2	256	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 4	1	0,25	<0,125	2	Sauvage
A.b 5	64	256	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 6	32	64	32	128	Multirésistante (IMP R)
A.b 7	64	256	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 8	32	64	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 9	1	32	64	128	Multirésistante (IMP S)
A.b 10	2	64	128	256	Multirésistante (IMP S)
A.b 11	32	128	128	128	Multirésistante (IMP R)
A.b 12	32	64	128	32	Multirésistante (IMP R)
A.b 13	32	128	32	128	Multirésistante (IMP R)
A.b 14	64	64	128	256	Multirésistante (IMP R)
A.b 15	32	256	128	128	Multirésistante (IMP S)

ملخص:

العصيات الغير مخمرة (BGNnF) هي جراثيم ممرضة انتهازية مسؤولة أساسا عن عدوى المستشفيات و تظهر هذه البكتيريا قدرة التكيف اتجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان . مجموع 26 جرثوم من العصيات الغير مخمرة تم عزلها ما بين جانفي و أفريل 2013 على مستوى وحدة العناية المركزة بمركز الإستشفائي الجامعي بتلمسان . دراسة حساسية هذه الجراثيم إلى 12 مضاد حيوي منهم 7 β -لاكتامين ، 3 أمينوزيد ، 1 فليوركوينولون و الكولستين بطريقة الإنتشار على الأجار حسب معايير CA-SFM تبين ظهور الجراثيم *Acinetobacter baumannii* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية . مراقبة طبع المقاومات ل β -لاكتامين للجراثيم من نوع *Pseudomonas aeruginosa*، أظهرت أن الطبع الغالب هو طبع المقاومة الغير إنزيمية (54.5% ; Efflux) يليه طبع المقاومة الإنزيمية (18.8% ; Céphalosporinase) و في الأخير سمحت التحاليل الجينية بواسطة PCR، التعرف على الجين (bla_{NDM-1}) هو المسؤول عن إنتاج الإنزيمات كاربابينيماز من فئة « B » .

الكلمات المفتاحية:

BGNnF ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Acinetobacter baumannii* ; مقاومة المضادات الحيوية ; β -لاكتامين ; المقاومة المتعددة ; PCR.

Résumé

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des pathogènes opportunistes responsables essentiellement d'infection nosocomiales. Ces bactéries manifestent vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Un total de 26 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants (15 *Acinetobacter baumannii* et 11 *Pseudomonas aeruginosa*) ont été isolées, entre Janvier et Avril 2013, à partir du service de réanimation au niveau du C.H.U de Tlemcen. L'étude de la sensibilité *in vitro* de ces germes vis-à-vis de 12 molécules d'antibiotiques dont 7 β -lactamines, 3 aminosides, 1 fluoroquinolone et la colistine, par la méthode des disques selon les normes du CA-SFM, a révélé l'émergence de souches *Acinetobacter baumannii* multirésistantes aux antibiotiques testés. L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines des bacilles pyocyaniques a révélé la prédominance du phénotype de résistance non enzymatique représenté par la surexpression du système d'efflux (54,5%), suivi du phénotype enzymatique par l'hyperproduction de céphalosporinase (18,8%), et enfin par le phénotype sauvage. Puis des expériences d'amplification génique par PCR ont permis d'identifier le gène (bla_{NDM-1}) codant pour la production de carbapénémase de classe B.

Mots clés: BGNnF ; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; résistance aux antibiotiques; β -lactamines; multirésistance; PCR.

Abstract

Non-fermentative Gram negative rods are opportunistic pathogens mainly responsible for nosocomial infection. These bacteria exhibit a big power of adapting for the antibiotic resulting in therapeutic problems often acute. A total of 26 Non-fermentative Gram negative rods (15 *Acinetobacter baumannii* and 11 *Pseudomonas aeruginosa*) were isolated between January and April 2013, from the intensive care unit at the University Hospital of Tlemcen. The study in vitro of susceptibility of these organisms to 12 antibiotics including 7 β -lactams, 3 aminoglycosides, 1 fluoroquinolones and colistin, by the disc method according to the standards of the CA-SFM, revealed the emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* to antibiotics tested. The Analysis of resistance phenotypes to β -lactams of *Pseudomonas aeruginosa* revealed the predominance of non-enzymatic resistance phenotypes represented by the overexpression of efflux system (54.5%), followed by enzymatic phenotypes were identified by the overproduction cephalosporinase (18.8%), and the rest is showed by the wild type. And finally, the experiences of gene amplification by PCR identified the gene (bla_{NDM-1}) coding for the production of carbapenemase class B.

Key words: BGNnF; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; antibiotics resistance; β -lactams; multiresistance; PCR.

