



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'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement  
مخبر الميكربولوجيا التطبيقية للأغذية البيوطي والبيئة

## MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie

Option : MICROBIOLOGIE



Présenté par

CHENIKA Sarah

Intitulé du Thème

### **ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES ISOLES DANS LE SERVICE DE NEUROCHIRURGIE DU CHU DE TLEMCCEN**

Présenté le : 27-06-2013



Devant le jury composé de :

<b>Présidente</b>	M <sup>me</sup> Ghembaza L	Maitre assistante de Classe A, université de Tlemccen
<b>Promoteur</b>	M <sup>r</sup> Drissi M	Maitre de conférences, université de Tlemccen
<b>Examineur</b>	M <sup>r</sup> Belyagoubi L	Maitre assistant de classe A, université de Tlemccen

Année Universitaire : 2012-2013



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN  
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'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement  
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطبي وللبيئة

## **MEMOIRE DE MASTER**

**Filière : Biologie**

**Option : MICROBIOLOGIE**

*Présenté par*

**CHENIKA Sarah**

**Intitulé du Thème**

### ***ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES BACILLES A GRAM NEGATIF NON FERMENTAIRES ISOLEES DANS LE SERVICE DE NEUROCHIRURGIE DU CHU DE TLEMCEN***

Présenté le : 27-06-2013

Devant le jury composé de :

<b>Présidente</b>	M <sup>me</sup> Ghembaza L	Maitre assistante de Classe A, université de Tlemcen
<b>Promoteur</b>	M <sup>f</sup> Drissi M	Maitre de conférences, université de Tlemcen
<b>Examineur</b>	M <sup>f</sup> Belyagoubi L	Maitre assistant de classe A, université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2012-2013**

# Remerciement

*Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Ensuite, je tiens à remercier M<sup>r</sup> Drissi M., Maitre de conférences à l'université Abou Bekr Belkaid, pour ses précieux conseils et qui a toujours été à l'écoute et disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Mes remerciements s'adressent également à M<sup>me</sup> Ghembaza L., Maitre assistante de classe A à l'Université de Tlemcen qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*M<sup>r</sup> Belyagoubi., Maitre assistant de Classe A à l'Université de Tlemcen, je le remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également :*

*Aux personnels de l'hôpital du C.H.U de Tlemcen, M<sup>me</sup> la directrice, M<sup>r</sup> Ben Allal., chef du service de neurochirurgie, M<sup>r</sup> Benabadji., chef du laboratoire et M<sup>r</sup> Abdessamad., chef du service.*

*Un grand merci pour leur accueil, et leur gentillesse, je leur remercie profondément*

*Je tiens également à adresser mes sincères remerciements et mes profondes reconnaissances à mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.*

*Je n'oublie pas mes grands parents qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.*

*Enfin, je tiens à remercier toute personne qui a participé de près ou de loin à l'exécution de ce modeste travail.*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail*

*A*

*Mes êtres les plus chers,*

*Mes parents, qui m'ont toujours beaucoup encouragée et aidée durant tout mon parcours avec beaucoup de tendresse de dévouement de gentillesse et d'amour.*

*Mes chers grands parents,*

*Ma petite sœur Soumia*

*Mon très cher frère Iliess*

*Mes tantes Nadra, Rahima, Merieme, Zahira, Amina, ainsi que tous mes oncles.*

*Mes cousins Sidi Mohamed, Yahia, Hanane, Aziz, Yassine, Nassim, Sarah, Mohamed, Safaa, Yousra, Aya, Faiza, Rabia et ses petites filles, Sofia et Sarah.*

*Mes amies Lamaane, Soumia, Khadidja, Imène, Nesrine, Louiza, Nadia et Sihem.*

*Ainsi que toute l'équipe du laboratoire.*

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1.</b> Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines.....	2
<b>Figure 2.</b> Résistance par modification de la perméabilité des $\beta$ -lactamines.....	11
<b>Figure 3.</b> Résistance aux $\beta$ -lactamines par inactivation enzymatique.....	12
<b>Figure 4.</b> Inactivation enzymatique des aminosides.....	14
<b>Figure 5.</b> Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel.....	28
<b>Figure 6.</b> Répartition des bacilles à gram négatif isolés à partir des prélèvements.....	36
<b>Figure 7.</b> Répartition des BGNnfs isolés à partir des patients.....	36
<b>Figure 8.</b> Répartition des BGNnFs isolés à partir des prélèvements de l'environnement.....	37
<b>Figure 9.</b> Répartition des BGNnF en fonction des sites de prélèvement.....	37
<b>Figure 10.</b> Taux de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>A.baumannii</i> .....	38
<b>Figure 11.</b> Taux de résistance aux antibiotiques des souches de <i>P.aeruginosa</i> .....	39
<b>Figure 12.</b> Répartition des phénotypes de résistance des souches d' <i>A. baumannii</i> .....	40
<b>Figure 13.</b> Résultat du test à la cloxacilline.....	40
<b>Figure 14.</b> Résultat du test de Hodge.....	41
<b>Figure 15.</b> Résultat du test à l'EDTA.....	41
<b>Figure 16.</b> Répartition des phénotypes de résistance des souches de <i>P. aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines.....	42
<b>Figure 17.</b> Résultat d'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i> présente le phénotype perte OprD2.....	43
<b>Figure 18.</b> Visualisation des gènes NDM1 des <i>A. baumannii</i> sur gel d'agarose.....	43
<b>Figure 19.</b> Visualisation des gènes OprD des <i>P. aeruginosa</i> sur gel d'agarose.....	44

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1.</b> Classification, action et spectre antibactérien des Pénicillines.....	03
<b>Tableau 2.</b> Action et spectre antibactérien des céphalosporines (céphèmes).....	04
<b>Tableau .3</b> Classification, action et spectre antibactérien des monobactames, carbapénèmes et autres $\beta$ -lactamines.....	04
<b>Tableau 4.</b> Répartition des prélèvements en fonction des sites de prélèvement.....	35
<b>Tableau 5.</b> Valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) vis-à-vis des antibiotiques testés.....	39
<b>Tableau 6.</b> Valeurs des CMI des antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	42

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
--------------------------	-----------

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Chapitre 1 : Antibiotiques et leurs modes d'action.....</b>	<b>02</b>
----------------------------------------------------------------	-----------

1. Les $\beta$ -lactamines.....	02
---------------------------------	----

2. Les quinolones.....	05
------------------------	----

2. 4. Fluoroquinolones.....	06
-----------------------------	----

2. 5. Ciprofloxacin.....	06
--------------------------	----

3- Les aminosides.....	07
------------------------	----

4. Les polymyxines.....	07
-------------------------	----

<b>Chapitre 2 : Résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>09</b>
-------------------------------------------------------	-----------

1. Résistance naturelle.....	09
------------------------------	----

2. Résistance acquise.....	09
----------------------------	----

3. Multi résistance.....	10
--------------------------	----

4. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	11
--------------------------------------------	----

4. 1. Résistance acquise non enzymatique.....	11
-----------------------------------------------	----

4. 2. Résistance enzymatique.....	12
-----------------------------------	----

5. Résistance aux fluoroquinolones.....	13
-----------------------------------------	----

6. Résistance aux aminosides.....	14
-----------------------------------	----

7. Résistance aux polymyxines.....	14
------------------------------------	----

<b>Chapitre 3 : bacilles à Gram négatif non fermentaires et leurs résistances aux antibiotiques.....</b>	<b>15</b>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
----------------------------------------	----

1. 2. Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	15
1. 2. 1. Résistance naturelle.....	16
1. 2. 2. Résistance acquise.....	16
2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	18
2. 2. Résistance d' <i>Acinetabacter baumannii</i> aux antibiotiques.....	18
2. 2. 1. Résistance naturelle.....	18
2. 2. 2. Résistance acquise.....	19
3. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	20
3. 2. Résistance de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aux antibiotiques.....	21
3. 2. 1. Résistance naturelle.....	21
3. 2. 2. Résistance acquise.....	21
4. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	22
4. 2. Résistance de <i>Burkholderia cepacia</i> aux antibiotiques.....	23

## MATERIEL ET METHODES

<b>1. Matériel.....</b>	<b>24</b>
1.1. Matériel biologique.....	24
1.2. Milieux de culture.....	24
1.3. Tests biochimique.....	24
1.4. Antibiotiques.....	25
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>25</b>
2.1. Prélèvements.....	25
2.2. Isolement et purification.....	25
2.3. Identification.....	26

2.4. Antibiogramme.....	28
2.5. Détermination des CMI en milieu solide.....	39
2.6. Test à la cloxacilline.....	30
2. 7.Test de synergie.....	31
2. 8. Test de Hodge.....	31
2. 9. Test d'EDTA.....	32
2.10. Amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR).....	32

## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>1. Résultats.....</b>	<b>35</b>
1.1. Prélèvements.....	35
1.2. Souches identifiées.....	36
1.3. Sensibilité aux antibiotiques.....	38
1.4. Phénotypes de résistance.....	39
1.5. Détection des gènes responsables par technique du PCR.....	43
<b>2. Discussion.....</b>	<b>45</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>48</b>
<b>Référence bibliographique.....</b>	<b>49</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>54</b>

# ***INTRODUCTION***

## **Introduction :**

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde et dans l'industrie pharmaceutique. Les infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques sont responsables d'un taux élevé de morbidité et de mortalité (**Cangoue, 2007**).

Ce problème vient pour une grande part de la mauvaise utilisation des antibiotiques par les médecins, qui les prescrivent parfois à tort, ou par les patients, qui ne suivent pas correctement le traitement. Mais les bactéries elles-mêmes ont développé des astuces pour résister aux antibiotiques et surtout pour partager leurs résistances en les offrant généreusement à leurs homologues (**Peltier, 2011**).

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGnNF) sont des bactéries aérobies strictes, qui sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation. Ces BGnNF sont capables de résister à de nombreux antibiotiques à cause du développement de nombreux mécanismes de résistance, pouvant s'associer et rendant selon les cas leur mise en évidence très difficile (**Merens, 2012**).

L'objectif de notre travail, consiste à étudier la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif non fermentants, et à déterminer les différents phénotypes de résistance au niveau du service de neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen.

***SYNTHESE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

## Chapitre 1 : Antibiotiques et leurs modes d'action:

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes.

Les antibiotiques sont définis par leur :

- activité antibactérienne (spectre d'activité),
- toxicité sélective (mode d'action),
- activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Yala et al., 2001).

### 1. Les $\beta$ -lactamines :

#### 1.1. Définition :

La famille des  $\beta$ -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité antibiotique, une faible toxicité, associées à un mode d'action fort complexe agissant sur la paroi bactérienne comme démontre la figure n°1, plus particulièrement sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) ou penicillin binding proteins, d'où elles bloquent la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al., 2004).

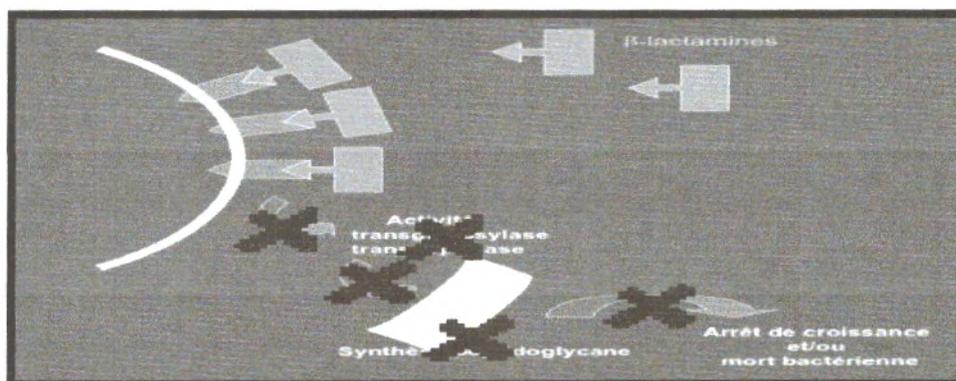


Figure 1. Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines (Laurent, 2009).

## 1.2. Classification :

On distingue les  $\beta$ -lactamines en 5 groupes : Les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et autres inhibiteurs (Tableau n° 1, 2 et 3).

## 1.3. Action et spectre antibactérien :

### 1.3.1. Les pénicillines (pénames) :

**Tableau 1.** Classification, action et spectre antibactérien des Pénicillines (**Kastalli & El Aidli, 2009**).

$\beta$ -lactames	Classification		Action et spectre antibactérien
Pénames	Pénicillines G et V	Pénicilline G	Spectre étroit, orienté sur les coques et les bacilles Gram (+). Pas d'action sur les bacilles Gram (-).
		Pénicilline V	
	Pénicillines A	Amino-pénicilline (Ampicilline)	Spectre élargi vers certains bacilles Gram (-). Certains entérocoques et entérobactéries.
		Amoxicilline	
		Carboxy-pénicilline : antipyocyanique (ticarcilline)	Spectre élargi au <i>pseudomonas</i> .
		Uréido-pénicilline (Pipéracilline, mezlocilline)	Spectre plus large, bacilles à Gram (-) ampi-R. Entérocoques, stérptocoques, anaérobies.
		amidino-pénicilline (pévmécillinam)	Spectre entérobactéries des voies urinaires.
	Pénicillines M	Méticilline	Spectre limité au staph producteurs de $\beta$ -lactamases (sauf staphylocoques méti-R).
		Oxacilline	
		Cloxacilline	

**1.3.2. Les céphalosporines :**

**Tableau 2.** Action et spectre antibactérien des céphalosporines (céphèmes) (Laurent, 2009).

	Classification		Action et spectre antibactérien
Céphèmes	C1G (Céphalosporines de 1 <sup>ère</sup> génération)	céfalotine, céfalexine, céfapirine, céfazoline, céfadroxil, céfaclor, céfatrizine, céfradine.	Spectre large. Actives sur les Staphylocoques producteurs de $\beta$ -lactamases, streptocoques, entérocoques, entérobactéries.
	C2G (Céphalosporines de 2 <sup>e</sup> génération)	céfamandole, céfuroxime, céfoxitime, céfotétan.	Certaines d'entre elles (céfamandole, céfuroxime) sont utilisées en antibioprofylaxie chirurgicale. Spectre plus étendu sur les entérobactéries Gram (-).
	C3G (Céphalosporines de 3 <sup>e</sup> génération)	céfotaxime, céfopérazone, ceftriaxone, ceftizoxime, ceftazidime, cefsulodine, céfépime, céfixime, cefpodoxime proxétyl, céfotiam hexétyl.	Activité vis-à-vis des bacilles Gram(-). Leur activité sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> est variable ; la céfopérazone a une bonne activité sur cette bactérie, et elles sont inactives sur les <i>Listeria</i> (G+) et les entérocoques.
	C4G (Céphalosporines de 4 <sup>e</sup> génération)	Céfépime, cefpirome.	Actives sur les bactéries à Gram (+), notamment sur les staphylocoques et les streptocoques.

**1.3.3. Monobactames, Carbapénèmes et autres  $\beta$ -lactamines (inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases) :**

**Tableau .3** Classification, action et spectre antibactérien des monobactames, carbapénèmes et autres  $\beta$ -lactamines (Kastalli & El Aidli, 2009).

$\beta$ -laclames	classification	Action et spectre antibactérien
Monobactames	Aztréonam	Spectre limité aux bactéries Gram (-) aérobies. Affinité plus importante pour la PLP3.

Carbapénèmes	Imipénème	Exceptionnellement étendu (exclu Staphylocoques méti-R). La cible principale d'action est PLP2, pénétration plus importante et plus rapide (porine particulière).
	Ertapénème	
	Méropénème	
Autres $\beta$ -lactamines	Acide clavulanique+Amoxicilline	Ces produits n'ont pas d'activité antibactérienne propre; ils sont utilisés en association avec une autre $\beta$ -lactamine dont ils restaurent l'activité antibactérienne neutralisée par l'action des $\beta$ -lactamases.
	Acide clavulanique+Ticarcilline	
	Tazobactam+Pipéracilline	
	Sulbactam+Ampicilline	

## 2. Les quinolones :

### 2.1. Définition :

Les quinolones sont des antibactériens de synthèse. Leur structure est fondée sur deux cycles aromatiques accolés. Les quinolones ont pour cible les topo-isomérases, enzymes servant à enrouler et dérouler, nouer et dénouer le chromosome bactérien lors de la réplication et la transcription, leur inhibition entraîne l'arrêt de la réplication et de la transcription, donc de la synthèse des acides nucléiques (bactériostase), puis la mort de la bactérie (bactéricide) (Perronne, 1999).

### 2.2. Classification :

- Les quinolones de première génération appelés aussi les quinolones classiques: L'acide nalidixique, l'acide oxolinique, l'acide pipémidique, l'acide piromidique, rosoxacin, fluméquine.
- Les quinolones de deuxième génération : On retrouve dans le groupe les fluoroquinolones : Ofloxacin, levofloxacin, péfloxacin, norfloxacin, sparfloxacin, ciprofloxacin, enoxacin (Yala et al., 2001).

### 2.3. Action et spectre antibactérien :

- **Action :**

Les quinolones inhibent l'action des topo-isomérases de type II : l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV. Ces enzymes sont essentielles à la croissance bactérienne en contrôlant la topologie de l'ADN lors des étapes de réplication, de transcription, et de recombinaison/réparation de l'ADN. Ces enzymes tétramériques, homologues entre elles, sont

constituées de deux sous-unités GyrA et GyrB (ADN gyrase) ou ParC et ParE (topo-isomérase IV). L'ADN gyrase est généralement la cible préférentielle chez les bactéries à Gram négatif tandis que la topo-isomérase IV l'est chez les bactéries à Gram positif (**Cattoir, 2012**).

- **Spectre :**

Les premières quinolones, dites de première génération comprennent des molécules à spectre étroit, jadis utilisées dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries. Les quinolones de deuxième génération présentent un spectre élargi aux bacilles à Gram négatif (ex. *Pseudomonas aeruginosa* pour la ciprofloxacine), et à certaines coques à Gram positif (ex. *Staphylococcus aureus*) et aux bactéries intracellulaires (**Cattoir, 2012**).

#### **2.4. Les fluoroquinolones :**

Les dérivés des quinolones synthétisés sont désignés « fluoroquinolones » du fait de la présence d'un atome de fluor en position C6. Ces molécules présentent un spectre d'activité élargi. Les molécules de troisième génération, ou dites fluoroquinolones anti-pneumococciques, ont été développées pour étendre le spectre à *Streptococcus pneumoniae* (ex. sparfloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine) (**Cattoir, 2012**). Et de plus sont actives sur d'autres bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) et sur des bactéries à Gram positif (staphylocoques) (**Perronne, 1999**). Enfin, des fluoroquinolones de quatrième génération (ex. trovafloxacine, gatifloxacine), présentant une activité accrue sur les bactéries anaérobies strictes, sont disponibles dans certains pays étrangers (**Cattoir, 2012**).

#### **2.5. La ciprofloxacine :**

La ciprofloxacine est une fluoroquinolone de synthèse qui inhibe spécifiquement l'ADN-gyrase bactérien. Elle possède un vaste spectre d'activité contre les bactéries aérobies à Gram négatif et à Gram positif. Un transfert de gènes contenant de l'ADN codant pour la résistance aux antimicrobiens a été rapporté mais n'a encore que peu de signification clinique (**OMS, 2003**).

## 3. Les aminosides :

### 3.1. Définition :

Chimiquement, les aminosides ont en commun un ou plusieurs cycles glucosidiques et un cycle cyclohexane substitué, en position 4,6 pour la majorité d'entre eux (amikacine, dibékacine, gentamicine, isépamicine, kanamycine, nétilmicine, sisomicine et tobramycine). Ce sont des cations, stables aux variations de température et de PH, très hydrosolubles, qui possèdent un large spectre antibactérien. Leur activité antibactérienne varie en fonction du PH (**Lambert, 1997**).

### 3.2. Classification :

Ils sont classés d'après la formule chimique du noyau central en trois groupes :

- Streptomycines : Streptomycine.
- Désoxystreptamines : néomycine, kanamycine, paromomycine, gentamicine, dibékacine, tobramycine, nétilmicine, sisomicine, amikacine, habekacine.
- Fortimicines : astromicine, dactimicine (**Toumi, 2008**).

### 3.3. Action et spectre antibactérien :

Ce sont des antibiotiques à large spectre, sont actives sur les germes à Gram négatif aérobies (bacilles, cocci et coccobacilles), staphylocoques et sur les bacilles à Gram positif (**Toumi, 2008**). Ils perturbent la lecture du message génétique. La spectiomycine a une structure apparentée aux aminosides; son usage est limité au traitement de la blennorragie gonococcique (**Baudry & Brézellec, 2006**).

## 4. Polymyxines :

### 4.1. Définition :

Appartiennent à la famille peptidique et au groupe V lipopeptides. Les lipopeptides se caractérisent par une chaîne peptidique à laquelle est fixée une chaîne lipidique. On distingue : Polymyxine B et la Polymyxine E (**Yala et al., 2001**).

### 4.1. Action et spectre antibactérien :

- **Action :**

Les polymyxines pénètrent au travers de la paroi des bacilles à Gram négatif par un mécanisme qu'elles auto-induisent. En chélatant les cations divalents, elles déstabilisent la paroi dans laquelle elles peuvent s'insérer. Elles agissent au niveau de la membrane cytoplasmique des bacilles à Gram négatif. L'activité bactéricide des polymyxines résulte de l'interaction avec la membrane cytoplasmique entraînant une désorganisation de cette structure avec relargage des constituants intracellulaires dans le milieu extracellulaire (**Bryskier et al., 1999**). Leur utilisation actuelle reste exceptionnelle en raison de leur toxicité rénale potentielle. Cependant, l'émergence évolutive de bactéries multirésistantes, notamment parmi les *Pseudomonas aeruginosa* et les *Acinetobacter baumannii* et l'absence de nouvelles molécules efficaces sur ces bactéries dans un avenir proche devraient favoriser la renaissance de ces antibiotiques (**Sotto & Lavigne, 2007**).

- **Spectre :**

Ce sont des antibiotiques bactéricides à spectre étroit (**Yala et al., 2001**). Sont actives sur les entérobactéries comme *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* mais elles sont inactives sur les *proteus spp* et *Serratia marcescens*. Elles possèdent une bonne activité sur *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Haemophilus influenzae* et *Bordetella pertussis* (**Bryskier et al., 1999**).

## Chapitre 2 : Résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Aujourd'hui, souvent d'origine synthétique et produits par l'homme, les antibiotiques sont au départ des substances naturelles générées par des champignons mais aussi par certaines bactéries pour se "défendre" contre les autres bactéries. Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développé dans le même temps les moyens de s'en protéger, il s'agit de résistance naturelle aux antibiotiques (**Lozniewski et al., 2010**).

### 1. Résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre à un ou plusieurs antibiotiques. Elle est liée au fond génétique et correspond au caractère normal ou sauvage appelé aussi phénotype sensible ou sauvage de l'espèce considérée. Son support génétique est généralement chromosomique (**Pourriat & Martin, 2005**).

### 2. Résistance acquise :

La résistance acquise ne se manifeste que chez certaines bactéries, les bactéries résistantes sont sélectionnées par l'usage de l'antibiotique et leur proportion s'accroît avec le temps.

Le problème de la résistance des bactéries est aggravé par :

- L'emploi prophylactique des antibiotiques.
- L'usage inadapté et indifférencié des antibiotiques, un bon exemple est donné par l'emploi systématique d'un antibiotique pour traiter une angine alors que 80% des angines sont virales.
- L'administration aux volailles et aux autres animaux d'élevage (**Mathieu & Fonteneau, 2008**).

La résistance acquise apparaît à la suite d'un mécanisme de mutation chromosomique ou extra-chromosomique :

**2.1. La mutation chromosomique :** une altération du chromosome entraîne la synthèse de protéines modifiées : paroi et membranes ne laissent plus passer l'antibiotique, la cible (enzyme, ribosome) ne fixe plus l'antibiotique. Elle est relativement rare, mais elle est stable

et héréditaire. Par exemple, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Mathieu & Fonteneau, 2008).

### 2.2. La mutation extra-chromosomique ou plasmidique :

Ces résistances dont le support est un plasmide ou un transposon. Les plasmides transmettent des résistances multiples à différentes espèces bactériennes. La résistance plasmidique concerne la plupart des antibiotiques. Seuls y échappent les rifamycines, les polypeptides, les nitrofuranes, les quinolones et les glycopeptides. Toutes les espèces bactériennes y sont sujettes. Le danger majeur est lié à la diffusion épidémique de plasmides portant de multiples caractères de résistance aux antibiotiques. Cette diffusion est amplifiée par la dissémination des souches (Boukerzaza, 2006).

Trois mécanismes permettent ces transferts de plasmide : la transduction, la transformation, la conjugaison :

\* **Transduction:** le vecteur est un bactériophage (virus) qui, en se répliquant, intègre son ADN à celui de la bactérie, il peut amener des gènes bactériens dont celui de la résistance à l'antibiotique. Il pourra ensuite transférer ces gènes de résistance aux nouvelles bactéries qu'il contaminera.

\* **Transformation:** elle correspond à la capture d'ADN exogène par des bactéries. Cet ADN exogène peut provenir d'une bactérie lysée.

\* **Conjugaison:** La conjugaison est un processus au cours duquel de l'ADN est transféré d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par un mécanisme nécessitant un contact entre les deux bactéries. C'est le phénomène le plus répandu (Baudry & Brézellec, 2006).

### 3. Multi résistance :

Il s'agit d'une terminologie très couramment utilisée même si elle ne répond pas à une définition univoque. Il est d'usage de parler de multirésistance face à "une bactérie qui, du fait de l'accumulation de résistances naturelles ou acquises, n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique" ou face à "une bactérie sensible à moins de 3 familles d'antibiotiques". La multirésistance peut donc être acquise, mais aussi naturelle, comme par exemple pour *Burkholderia cepacia*, ou à un moindre degré pour *Acinetobacter spp.* Au total, ce terme s'emploie généralement pour une bactérie qui pose en général un problème de ressource thérapeutique (Lozniewski et al., 2010).

## 4. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

### 4.1. Résistance acquise non enzymatique :

#### 4.1.1. Imperméabilité de la membrane externe :

Chez les bactéries à Gram négatif, la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines, soit par modification quantitative des structures permettant la perméabilité : augmentation d'épaisseur de la paroi, ou diminution du nombre de porines, soit par modifications qualitative des structures permettant la perméabilité : Changement de structure des porines comme démontre la figure n°2, ou synthèse de nouveau composé (Laurent, 2009). Chez *P. aeruginosa*, ce mécanisme prédominant de la résistance spécifique aux carbapénèmes est la perte de la porine OprD qui agit de façon synergique avec l'hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase constitutive de cette espèce. Ainsi, la diminution de la synthèse des porines peut jouer un rôle dans l'apparition de la résistance aux  $\beta$ -lactamines en cours de traitement chez les bactéries à Gram négatif (Cavallo et al., 2004).

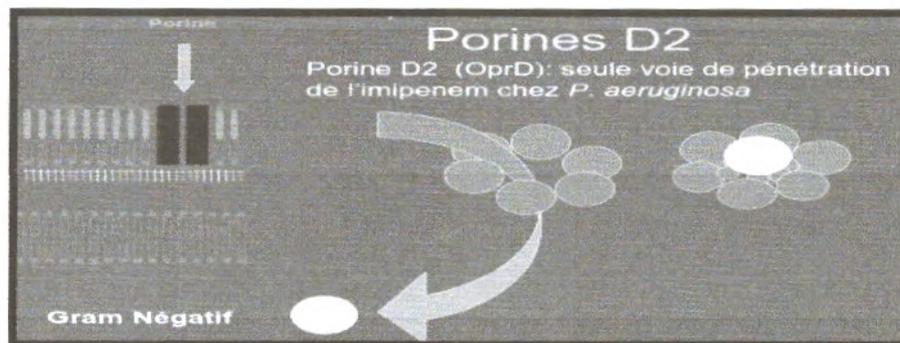


Figure 2. Résistance par modification de la perméabilité des  $\beta$ -lactamines (Laurent, 2009).

#### 4.1.2. Système d'efflux :

Les résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines liées à l'hyperexpression de ces systèmes d'efflux n'ont été décrites que chez des bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa*. Cette hyperexpression fait souvent suite à des mutations survenant dans les gènes répresseurs qui régulent la transcription de tous ces systèmes transporteurs, comme par exemple le gène *mexR* pour la pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. Ces systèmes d'efflux sont surtout actifs sur les  $\beta$ -lactamines les plus hydrophobes qui ne passent pas la barrière de la membrane cytoplasmique et s'accumulent dans l'espace périplasmique (Cavallo et al., 2004).

### 4.1.3. Modification des protéines liant la pénicilline (PLP) :

La résistance acquise est principalement observée en clinique chez les germes à Gram positif. Les mécanismes de cette résistance sont en relation avec une diminution d'affinité (10 à 500 fois) d'une ou de plusieurs PLP à la suite de mutations, nécessitant plus d'antibiotique. Cette affinité modifiée peut s'accompagner d'une nette augmentation de production de la PLP. La résistance est quelques fois en rapport avec l'apparition d'une nouvelle PLP « essentielle », inductible et de très faible affinité. La résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* pourrait être liée à une modification d'affinité de la PLP 2 (Le minor & Véron, 1989).

### 4.2. Résistance enzymatique :

La synthèse des enzymes ( $\beta$ -lactamases) est une cause d'inactivation des  $\beta$ -lactamines par modification chimique, comme il est représenté sur la figure n°3. Les  $\beta$ -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des antibiotiques de la famille  $\beta$ -lactamines, donnant un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique (Cangoue, 2007).

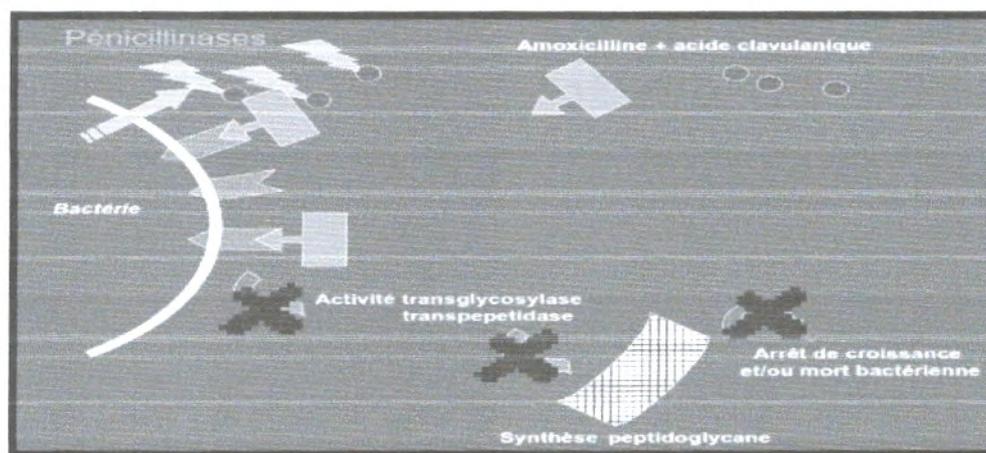


Figure 3. Résistance aux  $\beta$ -lactamines par inactivation enzymatique (Laurent, 2009).

#### 4.2.1. Classification des $\beta$ -lactamases :

Il existe plusieurs centaines de  $\beta$ -lactamases qui se distinguent par leur structure protéique et leur spectre d'hydrolyse :

- **Pénicillinases** : Elles hydrolysent les pénicillines mais épargnent la plupart des céphalosporines (sauf les C1G : céphalosporines de première génération), les monobactames,

les carbapénèmes. Elles sont sensibles aux inhibiteurs (acide clavulanique et tazobactam) (**Mammeri, 2007**).

-  **$\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE)** : Constituent un groupe d'enzymes qui ont la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération de céphalosporines, à l'aztréonam (mais non aux céphamycines et carbapénèmes) par hydrolyse de ces antibiotiques et qui sont inhibées par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases tel l'acide clavulanique.

- **Céphalosporinases** : Sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactam ; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactam. Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains bacilles à Gram négatif. Les représentants de ce groupe sont les enzymes du type, AmpC, Fox, ACT, CMY (**Cangoue, 2007**).

- **Carbapénémases** : ces enzymes présentent un spectre qui est caractérisé par une hydrolyse importante des carbapénèmes. Les carbapénémases plasmidiques acquises par des souches de *P. aeruginosa* est un mécanisme rare (**Mammeri, 2007**).

### **5. Résistance aux fluoroquinolones :**

La diminution de la concentration intracellulaire peut être liée soit à une imperméabilité par mutation des gènes régulateurs de la synthèse des porines soit à une hyperexpression de pompes d'efflux actif. Le mécanisme de la dégradation partielle de l'antibiotique par une enzyme, n'est décrit pour l'instant que chez les entérobactéries. En présence d'une protéine (QnrA) qui vient interférer dans le complexe ADN gyrase/ADN/quinolones, les fonctions de surenroulement, relâchement, de l'ADN gyrase sont rétablies. Il s'agit de résistance de bas niveau décrite chez les entérobactéries. La modification de la cible suite à la mutation des gènes de structure, il s'agit du mécanisme principal, chez toutes les espèces bactériennes. Ces mutations surviennent principalement dans les gènes de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV, selon la cible préférentielle de la molécule et selon l'espèce bactérienne (**Mérens & Servonnet, 2010**).

## 6. Résistance aux aminosides :

Trois mécanismes principaux de résistance aux aminosides peuvent être retrouvés et s'associer chez une même bactérie:

-L'altération de la cible ribosomale, rare, par mutation d'origine chromosomique.

-Le défaut de l'altération de l'antibiotique, par mutation chromosomique (**Ribadeau, 2007**).

-L'inactivation enzymatique des aminosides : Il existe trois classes d'enzymes différentes classées en fonction du radical qu'elles ajoutent à la molécule d'aminoside: les N-acétyltransférases (AAC), les O-nucléotidyltransférases (ANT), et les O-phosphotransférases (APH) (Figure n° 4). Les gènes codant pour ces enzymes sont le plus souvent plasmatiques (**Boukerzara, 2006**).

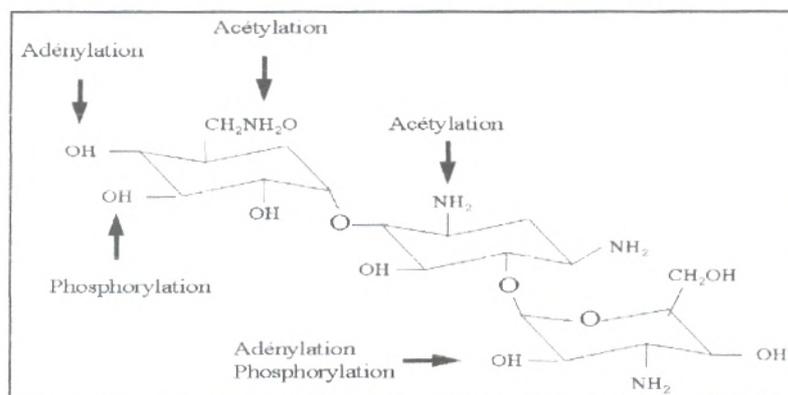


Figure 4. Inactivation enzymatique des aminosides (**Boukerzara, 2006**).

## 4)- Résistance aux polymyxines :

La résistance aux polymyxines est d'origine chromosomique et elle est peu fréquente. La résistance a pour origine une modification de la paroi bactérienne, notamment une augmentation de la quantité de la protéine membranaire H1, qui entraîne une diminution de la quantité de cations divalents nécessaires pour la paroi bactérienne, et sa fixation sur les cations divalents, et la protéine H1 joue le rôle des cations divalents ; les polymyxines perdent leur point d'ancrage dans la paroi bactérienne. La modification des phospholipides de la membrane cytoplasmique interviendrait également (**Bryskier et al., 1999**).

### Chapitre 3 : Bacilles à Gram négatif non fermentants et leurs résistances aux antibiotiques :

Les bacilles à Gram négatif non fermentants le glucose représentent un très vaste groupe de bactéries réparties dans plusieurs familles et plusieurs genres. De très nombreux remaniements taxonomiques ont amené un certain ordre, tout en complexifiant leur étude. Actuellement, plusieurs genres et familles apparentés sont groupés autour de *Pseudomonas* : *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Shewanella*, *Methylobacterium*, *Roseomonas*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, *Myroides*, *Bergeyella* et *Agrobacterium* (Monteil, 2006).

#### 1. *Pseudomonas aeruginosa* :

En milieu hospitalier, l'épidémiologie de *P. aeruginosa* est endémo-épidémique, variant selon le type de l'unité concernée. *P. aeruginosa* infecte préférentiellement les sujets hospitalisés dans les unités de soins intensifs et de chirurgie, services où le risque de colonisation et d'infection est important vu le terrain particulier des patients et la fréquence des manœuvres invasives. Elle est susceptible de coloniser la peau, le tube digestif, le nez et la gorge de l'homme. Il est responsable essentiellement d'infections nosocomiales chez des patients fragilisés (Ben Abdallah et al., 2008).

##### 1.1. Définition :

*P. aeruginosa*, est un bacille Gram négatif, de 0,5 à 0,8 $\mu$ m de diamètre sur 1 à 3 $\mu$ m de long, mobile grâce à une flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules et possède une oxydase positive. *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. C'est un germe hautement versatile doté d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. *P. aeruginosa* peut être isolé en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par l'addition d'inhibiteur, tel le ceftrimide. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C strictement aérobie (Hafiane & Ravaoarino, 2008).

##### 1.2. Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques :

Cette bactérie opportuniste est caractérisée par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnant et par sa rapidité d'acquisition de résistances aux antibiotiques. *P. aeruginosa* présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules

habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre limité et sont représentées par certaines  $\beta$ -lactamines (pipéracilline et ticarcilline, avec ou sans inhibiteur, ceftazidime, céfépime, aztréonam, imipénème, méropénème, doripénème), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine), les aminosides (sauf la kanamycine), la fosfomycine et la colimycine (**Khakhkhar et al., 2012**).

### 1.2.1. Résistance naturelle :

La résistance intrinsèque du bacille pyocyanique résulte de l'action combinée de plusieurs mécanismes, potentialisés par la très faible perméabilité de la membrane externe. Par ailleurs, presque toutes les souches de *P. aeruginosa* produisent une  $\beta$ -lactamase à large spectre (AmpC). En revanche, par un mécanisme encore mal compris, l'enzyme AmpC est capable de « neutraliser » le céfotaxime et la ceftriaxone, conférant ainsi au bacille pyocyanique une résistance naturelle de bas niveau à ces antibiotiques largement utilisés en milieu hospitalier. *Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire pas moins de douze systèmes d'efflux actif différents. Toutefois, seuls deux de ces systèmes appelés Mex (Multiple efflux) contribuent réellement à la résistance naturelle aux antibiotiques (**Mérens et al., 2011**). L'hyperexpression de ces systèmes chez *P. aeruginosa* qui sont naturellement peu perméables et possédant une céphalosporinase constitutive Amp-C, peut conférer des résistances croisées cliniquement significatives à des antibiotiques appartenant à différentes familles comme les  $\beta$ -lactamines, les quinolones, le chloramphénicol ou les tétracyclines (**Cavallo et al., 2004**). La résistance naturelle est liée aussi à la petite taille des canaux formés par les porines qui limite la pénétration des  $\beta$ -lactamines hydrophiles. La présence de  $\beta$ -lactamases chromosomiques inductibles contribue également à la résistance naturelle à de nombreuses  $\beta$ -lactamines. Le phénotype sauvage est caractérisé par une résistance naturelle aux aminopénicillines (**Mérens et al., 2012**).

### 1.2.2. Résistance acquise :

L'apparition de nouvelles résistances chez *P. aeruginosa* est fréquemment liée à l'acquisition de matériel génétique étranger, récupéré d'autres bactéries à Gram négatif voire à Gram positif (gènes codant des méthylases de l'ARN 16S). Enfin, les plasmides comme les transposons peuvent porter des structures génétiques, appelées intégrons, capables de capturer les gènes de résistance les plus divers et conférer, de ce fait, une résistance à de nombreux antibiotiques, notamment aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides (**Khakhkhar et al., 2012**).

### 1.2.3. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

Pour l'imipénème, le mécanisme essentiel de résistance est la perte de la porine D2 alors que les mécanismes enzymatiques (imipénémases) sont exceptionnels en France. Pour les autres  $\beta$ -lactamines, les mécanismes enzymatiques (hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique, pénicillinase acquise essentiellement PSE-1) isolés ou associés, confèrent le plus souvent des résistances de plus haut niveau que les résistances non enzymatiques (dominées par les phénomènes d'hyperexpression des pompes d'efflux membranaire). **(Cavallo & Fabre, 2004)**. L'observation d'un antagonisme entre un disque d'imipénème et un disque de C3G est assez classique, témoignant du mécanisme régulateur de la  $\beta$ -lactamase constitutive PenA. Les deux  $\beta$ -lactamines les plus constamment actives sont la ceftazidime et le méropénème **(Mérens et al., 2012)**.

### 1.2.4. Résistance aux fluoroquinolones :

Chez *P. aeruginosa*, la résistance de haut niveau est principalement liée à des mutations au niveau de *gyrA*. La surproduction des pompes d'efflux, est due à des mutations dans les gènes régulateurs contrôlant l'expression des opérons *mexAB-OprM* (mutants *nalB*, *nalC*, *nalD*), ou *mexXY-OprM* (mutants *agrZ* ou *agrW*), ou *mexCD-OprJ* (mutants *nfxB*), ou *mexEF-OprN* (mutants *nfxC*). Ces pompes d'efflux augmentent la CMI de 2 à 8 fois, et ne sont donc pas toujours responsables d'une catégorisation clinique de la souche en « résistante », s'il n'existe pas de mutations associées au niveau des cibles des quinolones. Cependant, elles pourraient diminuer l'efficacité des fluoroquinolones **(Mérens et al., 2010)**.

### 1.2.5. Résistance aux aminosides :

*Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance naturelle à la kanamycine et à la néomycine en raison de la présence chromosomique d'une enzyme APH(3)-IIb. Une résistance de bas niveau aux aminosides est en général liée à la surproduction de la pompe d'efflux *MexXY(OprM)*. Une résistance de haut niveau aux aminosides est le plus souvent liée à des enzymes modifiant de façon variable les différents aminosides par nucléotidylation (O nucléotidyltransférase), phosphorylation (O-phosphotransférase) ou acétylation (N-amino acétyltransférase). Ces enzymes inactivent plus souvent la gentamicine et la tobramycine que l'amikacine **(Mérens et al., 2012)**.

### 1.2.6. Résistance à la colistine :

La colistine est une polymyxine active sur *P. aeruginosa*. Les résistances acquises sont rares parmi les souches cliniques. Le phénotype «*Pseudomonas aeruginosa* résistant à la colistine » est même considéré comme exceptionnel par l'EUCAST. Cependant, ces résistances peuvent être rencontrées chez les patients atteints de mucoviscidose (Mérens et al., 2012).

### 2. *Acinetobacter baumannii* :

La fréquence des infections à *Acinetobacter baumannii* a augmenté au cours des dix dernières années. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent responsable d'infections nosocomiales, principalement des pneumopathies liées à la ventilation mécanique, d'infections de la peau et des tissus mous, d'infections urinaires, de bactériémies et de méningites postopératoires. Cette augmentation de fréquence des infections à *Acinetobacter baumannii* s'accompagne d'une augmentation de fréquence de la résistance aux antibiotiques chez cette bactérie (Eveillard & Joly-Guillou, 2012).

#### 2.1. Définition :

Les *Acinetobacter* sont définis comme des diplo-coccobacilles à Gram négatif. Comme leur nom l'indique, ils sont immobiles, non sporulés, aérobies strictes, associés en paires ou en courtes chainettes (Hidri, 2012).

#### 2.2. Résistance d'*Acinetobacter Baumannii* aux antibiotiques:

Cette bactérie opportuniste est en revanche mortellement dangereuse pour les patients dont le système immunitaire est fragilisé, comme c'est le cas de la majorité des patients des services de soins intensifs. Cette bactérie est résistante à de très nombreux antibiotiques, dont les pénicillines, les aminosides, les céphalosporines et les quinolones (Namy, 2003).

##### 2.2.1. Résistance naturelle :

*A. baumannii*, était décrit comme sensible à tous les antibiotiques à l'exception de la pénicilline. En effet, *Acinetobacter* possède dans son génome un gène codant pour la production d'une  $\beta$ -lactamase de type céphalosporinase. Plusieurs types de céphalosporinases sont à l'origine de la résistance aux aminopénicillines, à céfalotine et la cefoxitine. Elle n'est pas sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase comme l'acide clavulanique (Decré, 2012). *A. baumannii* possède un gène codant une enzyme de classe D ou oxacillinase

chromosomique naturelle OXA-51, le rôle de ces enzymes dans l'expression de la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui très faible voire inexistant. *A. baumannii* dispose de porines présente une imperméabilité naturelle, qui est associée à une pompe à efflux appartenant au système RND, Ade/IJK, naturellement active vis-à-vis d'un large spectre d'antibiotiques incluant notamment le chloramphénicol et le triméthoprimé mais excluant les aminoglycosides. *A. baumannii* est également naturellement résistant à l'ertapénème, à la fosfomycine, au triméthoprimé, à l'acide pipémidique, à la norfloxacine (mais pas à l'acide nalidixique), aux furanes et, est peu sensible à l'aztréonam (Decré, 2012).

### 2.2.2. Résistance acquise :

#### 2.2.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

*Acinetobacter baumannii* présente une résistance à la ceftazidime, à l'aztréonam et au céfépime (Mansour et al., 2008). La résistance aux carbapénèmes liée à l'association d'hyperproduction de céphalosporinase et d'imperméabilité ne concerne qu'un nombre limité de souches a explosé au cours des dernières années. (Très rare chez *Acinetobacter Baumannii*) (Decré, 2012).

Pour les mécanismes de résistance acquise à l'imipénème, deux types d'enzymes ont été décrits : les MBL et les oxacillines à activité carbapénémase. La résistance acquise aux carbapénèmes peut aussi être due à la production par la bactérie d'oxacillines à activité carbapénémases (Mansour et al., 2008).

#### 2.2.2.2. Résistance aux fluoroquinolones :

La résistance d'*A. baumannii* aux fluoroquinolones est très fréquente. Les nouvelles fluoroquinolones telles que clinafloxacine, gatifloxacine, lévofloxacine et gémifloxacine seraient plus actives sur *A. baumannii* que la ciprofloxacine. La fréquence de survenue de mutation de la *gyrA* semble plus faible avec ces nouvelles fluoroquinolones surtout avec la gémifloxacine. Ces nouvelles molécules, n'ont pas été testées dans cette étude (Elouennass et al., 2003).

Le principal mécanisme de résistance est du à des mutations au niveau des gènes *gyrA* et *parC*, gènes à l'origine de l'ADN gyrase et la topo-isomérase 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. Pour atteindre

un niveau de résistance élevé, plusieurs mutations concomitantes sont nécessaires. Les systèmes d'efflux de types RND (AdeABC, AdeIJK) et de type MATE (AdeM) jouent un rôle important dans la résistance aux fluoroquinolones **(Decré, 2012)**.

### 2.2.2.3. Résistance aux aminosides :

Pour les aminosides, la résistance d'*A. baumannii* a connu depuis 1980, une évolution très brutale. Elle affecterait selon les études 70 à 85 % des souches pour les quatre principales molécules d'aminosides : Amikacine, gentamicine, tobramycine et nétilmicine. Les *Acinetobacter* produisent fréquemment plusieurs enzymes parmi les acétylases, les adénylases et les phosphotransférases. Plus récemment, des méthylations de l'ARNr 16S par des méthylases, ont été décrites chez des souches d'*A. baumannii* isolées à travers le monde. Ce mécanisme confère une résistance de haut niveau à tous les aminoglycosides utilisés en thérapeutique. Enfin, la Résistance aux aminosides est également associée à des mécanismes d'efflux impliquant la pompe AdeABC et la pompe AbeM **(Decré, 2012)**.

### 2.2.2.4. Résistance à la colistine :

*A. baumannii* est sensible à la colistine. Par ailleurs, l'augmentation de l'usage de cette molécule pour le traitement des infections à souches multirésistantes serait à l'origine de l'apparition de résistances **(Elouennass et al., 2003)**.

## 3. *Stenotrophomonas maltophilia* :

*S. maltophilia* est une bactérie ubiquitaire de l'environnement (eau, air, animaux, plantes. . .), mais également un saprophyte de l'homme, colonisant le nez, la gorge et le tube digestif **(Lavigne et al., 2008)**. *S. maltophilia* est un pathogène potentiel chez des patients affaiblis et immunodéprimés. Il est responsable d'une mortalité élevée chez des patients atteints de malignité hématologique. *S. maltophilia* est un agent rare de septicémie (infection par cathéter), d'infection pulmonaire (fibrose kystique), d'infection des plaies. On signale également des cas de méningite et d'endocardite **(Goubau & Pellegrims, 2000)**. *S. maltophilia* est surtout devenue une des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les infections nosocomiales **(Lavigne et al., 2008)**.

### 3.1. Définition :

*Stenotrophomonas* sont des bacilles saprophytaires à Gram négatif, aérobies non fermentants classées précédemment sous le genre *Pseudomonas* (plus tard *Xanthomonas*) **(Goubau &**

**Pellegrims, 2000**). Les souches de *Stenotrophomonas maltophilia* rassemblent des bacilles à Gram négatif, d'environ 0,5 µm de diamètre sur 1,5 µm de longueur, non sporulés, mobiles grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires, possédant des fimbriae, oxydase négative (ou faiblement et tardivement positive), catalase positive et nitrate réductase positive. La mobilité est constamment observée à 18 °C, mais certaines souches sont immobiles à 37°C (**Euzéby, 2005**).

### **3.2. Résistance de *Stenotrophomonas maltophilia* aux antibiotiques :**

#### **3.2.1. Résistance naturelle :**

*S. maltophilia* possède une résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques liée à la présence de β-lactamases, d'imperméabilité membranaire (**Mérens et al., 2012**), dont la membrane externe ne possède qu'un nombre limité de porines et elle s'oppose à la pénétration de plusieurs antibiotiques (**Euzéby, 2005**) et de pompes d'efflux de type « ATP binding cassette ». Le phénotype hypersensible est rare (5-10 %) (**Mérens et al., 2012**).

#### **3.2.2. Résistance acquise :**

Des plasmides associés à la résistance aux β-lactamines ont été décrit chez *S. maltophilia*. Leur rôle dans la résistance acquise n'a pas été clairement démontré, et les enzymes correspondantes ne sont pas encore connues (**Sougakoff & Trystram, 2003**).

#### **3.2.3. Résistance aux β-lactamines :**

*S. maltophilia* présente une résistance naturelle à la plupart des β-lactamines, sauf le moxolactame, par production d'une métallo-β-lactamase de classe B et d'une β-lactamase à sérine active de classe A hydrolysant les pénicillines et les céphalosporines, en particulier le céfotaxime. La β-lactamase de classe A est inductible et inhibée par l'acide clavulanique, ce qui explique la sensibilité de *S. maltophilia* à l'association ticarcilline - acide clavulanique (**Sougakoff & Trystram, 2003**). La détection phénotypique des BLSE dans cette espèce est souvent complexe : le test de synergie est souvent positif du fait de l'inhibition de la β-lactamase chromosomique de classe A. En plus de ces deux β-lactamases, la membrane externe de *S. maltophilia* est très peu perméable (par un nombre de porines très faibles et un système d'efflux efficace) rendant difficile l'entrée des antibiotiques et participant au caractère multirésistant de ces bactéries. Il semble évident que les bacilles à Gram négatif non

fermentants tels que *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* représentent des réservoirs masqués de BLSE (Lavigne et al., 2008).

L'existence d'autres  $\beta$ -lactamases produites par *S. maltophilia* a été suggérée pour la première fois par Cullman et Dick, qui décrivent la présence d'enzymes différentes. D'autres études ont confirmé l'hétérogénéité de la production de  $\beta$ -lactamases chez *S. maltophilia*, avec la présence d'enzymes de type sérine (notamment de TEM-2) et de métalloenzymes. La faible diffusion des pénicillines et des céphalosporines dans la membrane bactérienne contribue également à la résistance à ces antibiotiques, même si aucune étude n'a permis de savoir si cette faible diffusion est due à des différences quantitatives ou qualitatives des porines de la paroi bactérienne. Plus récemment, des résistances transférables aux céphalosporines et à l'aztréonam ont été décrites de souches nosocomiales de *S. maltophilia* vers des souches d'*E. Coli*, *Proteus mirabilis* et *P. aeruginosa* (Lavigne et al., 2008).

### 3.2.4. Résistance aux quinolones :

La résistance aux quinolones est principalement liée à l'hyperexpression de pompes d'efflux et à une imperméabilité de la paroi. D'après cette étude, on confirme une résistance de bas niveau aux quinolones et suggère des résistances de haut niveau en cas d'hyperexpression (Mérens et al., 2012).

### 3.2.5. Résistance aux aminosides :

*S. maltophilia* présente une faible sensibilité aux aminosides et une résistance naturelle au triméthoprime, mais une sensibilité conservée au sulfaméthoxazole avec un maintien de la synergie entre ces deux antibiotiques. La bactérie est donc naturellement sensible au triméthoprime/sulfaméthoxazole, association très active sur *S. maltophilia*. Cependant, des souches résistantes au cotrimoxazole peuvent être rencontrées (Mérens et al., 2012).

## 4. *Burkholderia cepacia* :

Ces bactéries sont épisodiquement rapportées dans des infections nosocomiales en dehors de la mucoviscidose, survenant souvent sous forme de cas groupés à partir d'une source commune contaminée (Segonds et al., 2006). *B.cepacia* se comporte parfois comme un pathogène opportuniste chez l'homme ou l'animal. Les effets de la bactérie restent bénins chez les sujets immunocompétents mais elle pose des problèmes à certains patients immunodéprimés notamment les malades atteints de la mucoviscidose et les patients atteints

de la granulomatose septique chronique et les sujets drépanocytaires. Certaines souches de *B.cepacia* sont responsables de maladies nosocomiales observables sous forme du « syndrome cepacia » (Klaramsr, 2011).

### 4.1. Définition :

Auparavant classée dans le genre *Pseudomonas*, cette bactérie appartient depuis 1992 au nouveau genre *Burkholderia* (d'après Burkholder) (Segonds & Chabanon, 2001). Il s'agit d'un bacille à Gram négatif, aérobic strict, mobile, oxydase positif. *B.cepacia* ait été cultivé à partir d'eau, de sol, des végétaux, et peu fréquent dans les sources naturelles et les hôpitaux. Elle survient lors de contacts directs (à l'hôpital) ou à partir de l'environnement immédiat (Avril et al., 2000).

### 4.2. Résistance de *Burkholderia cepacia* aux antibiotiques :

Ces espèces sont caractérisées par leur multirésistance naturelle à de nombreux antibiotiques, qui restreint très nettement les choix thérapeutiques. Celle-ci est expliquée par l'association de plusieurs mécanismes de résistance qui restent encore mal connus (Mérens et al., 2012). Cette résistance est liée à la faible perméabilité de la membrane externe, d'un système d'efflux actif (le gène est connu, la séquence de la lipoprotéine est identique à Opr-M de *P. aeruginosa*) (Avril et al., 2000). Les options thérapeutiques sont limitées en raison d'une résistance naturelle à la ticarcilline, aux aminoglycosides et à la colistine, et de fréquentes résistances acquises. Des synergies ont été observées in vitro avec des associations doubles ou triples d'antibiotiques, mais aussi des antagonismes, et actuellement aucune association thérapeutique n'est réellement validée en clinique (Segonds et al., 2006). La sensibilité à l'imipénème est variable, le méropénème est plus actif. Il est uniformément résistant à la colistine, aux aminosides et aux fluoroquinolones (Avril et al., 2000).

***MATERIEL ET  
METHODES***

## 1. Matériel :

### 1.1. Matériel biologique :

#### 1.1.1. Souches étudiées :

Durant la période s'étalant entre Février et Mai 2013, ont été incluses dans l'étude des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, qui ont été isolées au service de la neurochirurgie, provenant de divers prélèvements d'environnement (chariot, lavabo, poignet de porte,...) et de patients (cathéter, plaie, sonde urinaire...).

#### 1.1.2. Souches de référence :

- ATCC 25922 (*Escherichia coli*).
- ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa*).
- VP517 (*Escherichia coli*).

### 1.2. Milieux de culture :

- **Liquide**

- Bouillon nutritif (BN).
- Bouillon cœur cerveau (BHIB).

- **Solide :**

- Mac Conkey.
- Gélose nutritive.
- Gélose au cétrimide.
- Gélose TSI (Tripl Sugar Iron).
- Mueller Hinton.

### 1.3. Tests biochimique :

- Galerie API 20 NE (Bio Mérieux).

### **1.4. Antibiotiques :**

#### **1.4.1. En disque (Bio Rad) :**

Ticarcilline (Tic), Ticarcilline + Acide clavulanique (TCC), Pipéracilline (PIP), Pipéracilline + Tazobactam (TZP), Imipénème (IPM), Aztréonam (ATM), Céfotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Gentamycine (GM), Tobramycine (TOB), Amikacine (AN), Acide nalidixique (NA), Kanamycine (KA), Ciprofloxacine (CIP), Norfloxacine (NOR), Colistine (CS).

#### **1.4.2. En poudre :**

Cloxacilline (Orbénine), Imipénème (Tienam), Céfotaxime (Glaxo Smith Kline), Amikacine (Merck).

#### **1.4.3. En liquide :**

Ciprofloxacine (Bayer Pharma).

### **2. Méthodes :**

#### **2.1. Prélèvements :**

Les différents prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage sur des plaies post-opératoires infectées et au niveau de l'environnement, ainsi que par récupération des sondes d'intubation et des sondes urinaires des patients hospitalisés au niveau du service du neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen, puis acheminés au laboratoire dans des tubes de bouillon pour être incubés 18 à 24h à 37°C.

#### **2.2. Isolement et purification :**

L'isolement des souches a été réalisé après ensemencement sur le milieu Mac Conkey pendant 24h à 37°C. Elles sont ensuite purifiées après plusieurs passages sur le même milieu. L'ensemencement sur gélose au cétrimide (0,02% de cétrimide) a été fait pour sélectionner les bacilles pyocyaniques.

### 2.3. Identification :

#### 2.3.1 : TSI (milieu triple sucres) :

- **Principe :**

La gélose TSI permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non de H<sub>2</sub>S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.

- **Technique :**

La technique consiste à ensemencer la pente en stries serrées avec 2-3 colonies semblables et piquer le culot au centre. La lecture se fait après 18 à 24h d'incubation à 37°C.

- **Lecture :**

La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

1. Fermentation du glucose :

- Culot rouge : glucose non fermenté.
- Culot jaune : glucose fermenté.

2. Fermentation du lactose et /ou du saccharose :

- Pente rouge : lactose et saccharose non fermentés.
- Pente jaune : lactose et saccharose fermenté(s).

3. Production de gaz :

- Apparition de gaz dans le culot.

4. Formation d'H<sub>2</sub>S :

- Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure.

### 2.3.2. Galerie API 20NE :

- **Principe :**

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants.

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

- **Technique :**

- ✓ **Préparation de la galerie :**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée.

- ✓ **Préparation de l'inoculum :**

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml).
- A l'aide d'une pipette, prélever 1 à 4 colonies, par aspirations. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 Mc Farland.

- ✓ **Inoculation de la galerie :**

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente.
- Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE).
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture :**

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**Annexe.1**) et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification (**Annexe.2**).

### 2.4. Antibiogramme (CA-SFM 2010) :

L'antibiogramme a été réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé (Mueller Hinton), méthode recommandée par le CA-SFM.

- **Inoculum :**

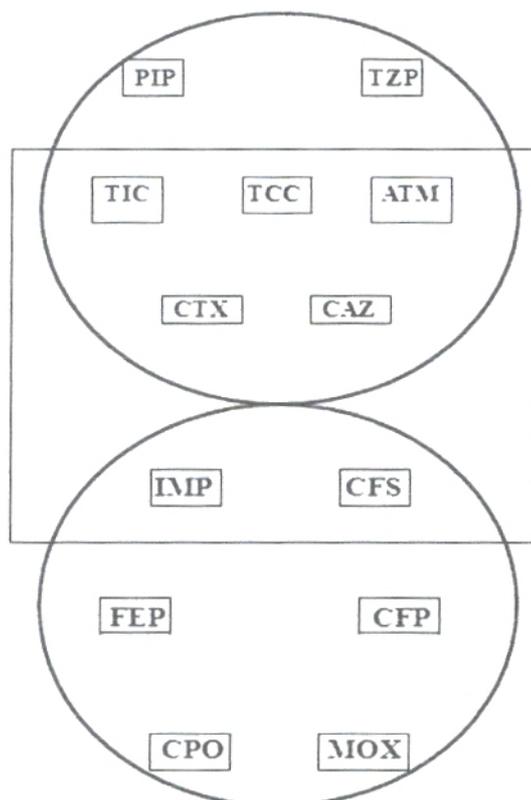
Milieu gélosé (Mueller Hinton)

- **Ensemencement :**

La solution est diluée au 1/100 dans l'eau physiologique, la suspension diluée est ensemencée sur les boîtes de Mueller Hinton par méthode d'inondation. L'excès est rejeté, et les boîtes sont mises à sécher.

- **Application des disques (Vedel, 2005) :**

Les disques sont appliqués sur les boîtes, la disposition des  $\beta$ -lactamines a été réalisée selon le schéma de Vedel (**Figure. 5**).



**Figure 5.** Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel (2005).

## MATERIEL ET METHODES

Principaux marqueurs	Marqueurs secondaires	Liste complémentaire
Tic : Ticarcilline	TCC: Ticarcilline+ac.clavulanique	PIP: Pipéracilline
CAZ : Ceftazidime	ATM: Aztréonam	TZP: Pipéracilline+tazobactam
IMP : Imipénème	CFS: Cefsulodine	FEP: Céfépime
		CPO: Céfpirome
		CFP: céfopérazone

- **Lecture :**

Après 24h d'incubation à 37°C, mesurer les diamètres de sensibilité. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'**annexe 3 et 4**, et interpréter les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

### 2.5. Détermination des CMI en milieu solide (CA-SFM, 2010) :

- **Principe :**

CMI : concentration minimale inhibitrice : plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

Cette méthode permet d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.

- **Technique :**

- ✓ **Préparation des solutions d'antibiotiques :**

Pour chacun des antibiotiques préparer une solution mère à 5120 mg/ml puis réaliser des dilutions sériées de progression géométrique (**Annexe. 5**).

- ✓ **Préparation des boîtes :**

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

### ✓ Préparation de l'inoculum :

Préparer des suspensions de densité de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester.

La souche de référence *P.aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisé comme contrôle de la concentration des boîtes.

### ✓ Ensemencement :

-Diluer la suspension au 1/10.

-Ensemencer par spot  $2\mu\text{l}$ , soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

#### • Lecture :

La lecture se fait après 24 heures d'incubation. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle la croissance est inhibée.

Les souches ont été catégorisées pour chacun des antibiotiques en fonction des concentrations critiques proposées par le CA-SFM (**Annexe. 3 et 4**).

### 2.6. Test à la cloxacilline (Naas, 2003) :

#### • Principe :

Ces géloses sont utilisées pour la détection de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu. La cloxacilline est un inhibiteur des céphalosporinases de la classe C d'Ambler chromosomiques ou plasmidiques.

#### • Technique :

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton additionné de cloxacilline à  $500\mu\text{g/ml}$  et à  $1000\mu\text{g/ml}$ .

#### • Lecture :

On observe une restauration de l'activité des céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération.

### 2. 7. Test de synergie (Naas, 2003) :

- **Principe :**

Le test consiste à rechercher une image de synergie entre les disques FEP et/ou CAZ et TCC, évocatrice de BLSE, est masquée par la présence de la céphalosporinase.

- **Technique :**

Deux techniques peuvent être utilisées :

1. Rapprocher les disques FEP et/ou CAZ et TCC (tester différentes distances entre les deux disques (de bord à bord : 1 cm et 1,5 cm).
2. Réaliser un test de synergie sur milieu de Mueller Hinton contenant 250 µg/ml de cloxacilline.

La cloxacilline inhibe partiellement l'activité de la céphalosporinase.

- **Lecture :**

- Si BLSE, la synergie est visible entre les disques FEP et/ou CAZ et TCC. De plus, les diamètres autour des disques de FEP et CAZ ne sont pas modifiés en l'absence d'acide clavulanique.
- Si absence de BLSE, les diamètres autour des disques de FEP et CAZ augmentent et aucune synergie n'est visible.

### 2. 8. 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.

- **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 de Mac Conkey et laisser sécher.

-Déposer un disque d'imipénème au centre.

-Dans une ligne droite, ensemer la souche à tester du bord de disque jusqu'au bord de la boîte.

-Incuber à 37°C pendant 16 à 24 heures.

- **Lecture :**

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

### 2. 9. Test d'EDTA (Behera et al., 2008) :

- **Principe**

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

- **Technique**

Elle consiste à déposer 5  $\mu$ l d'EDTA 0,5 M sur un disque blanc (papier filtre wathmann, diamètre 6mm), placé 10 à 25 mm centre à centre avec un disque d'imipénème.

- **Lecture :**

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

### 2.10. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Borde, 2006).

- **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**

- ✓ **Extraction de l'ADN:**

L'extraction de l'ADN se réalise par la méthode d'ébullition/centrifugation.

- A partir du bouillon nutritif ensemencé, prendre 1,5 ml dans un eppendorf puis centrifuger à 13000 tours pendant 3 minutes,
- Jeter le surnageant et ajouter 100 µl d'eau ultra pure.
- Chauffer au bain marie pendant 10 minutes (jusqu'à ébullition).
- Refroidire et centrifuger à 1300 tours pendant 3 minutes.
- Le surnageant obtenu est l'ADN utilisé pour la PCR (**Freschi et al, 2005**).

- ✓ **Préparation de la réaction**

Chaque réaction d'amplification comprend un volume final de 25 µl incluant : 5 µl de tampon 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.5 µl dNTPs (dATP, dGTP, dTTP et dCTP), 2 µl d'amorces, une unité de Taq polymérase (0.5 µl), 4 µg d'ADN.

- ✓ **Réaction d'amplification**

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (3 heures pour une PCR de 30 cycles).

Chaque cycle comprend: 1 minute de dénaturation (94°C), pour une dissociation complète des deux brins d'ADN. L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C), cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé. Suite à ces cycles d'amplification, la réaction se termine par une période additionnelle d'élongation de 10 min à 72°C. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

- ✓ **Analyse par migration sur gel d'agarose**

## MATERIEL ET METHODES

---

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  $\mu$ d 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 130V pour une période d'environ 30 min.

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.

***RESULTATS ET  
DISCUSSION***

### 1. Résultats :

#### 1.1. Prélèvements :

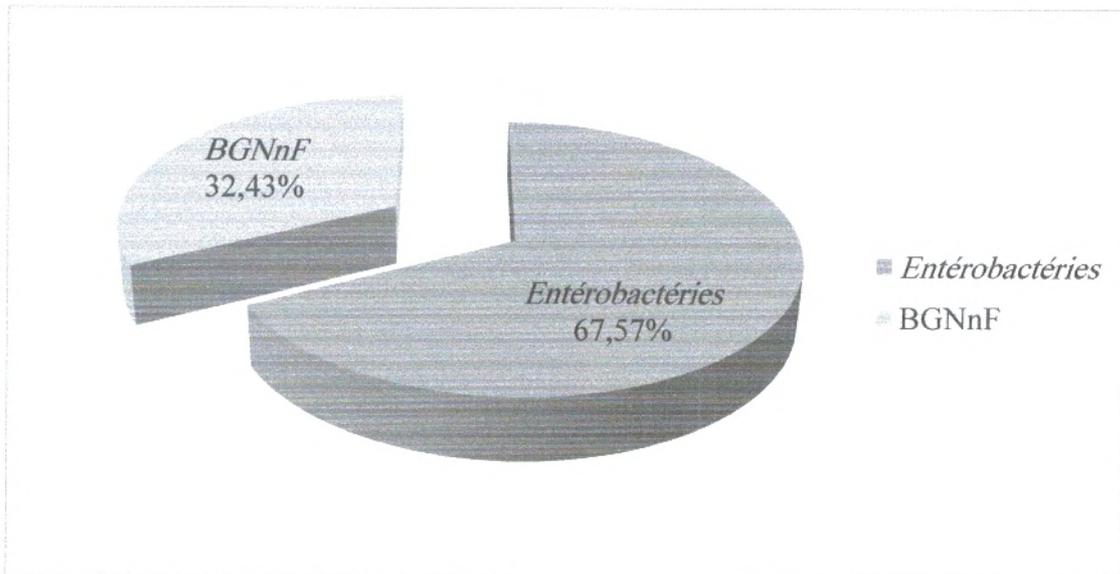
53 prélèvements ont été réalisés pendant la période d'étude de 5 mois (Janvier au Mai 2013), au niveau du service de neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen (**Tableau. 4**).

**Tableau 4.** Répartition des prélèvements en fonction des sites de prélèvement.

Environnement		Patients	
Main, blouse du personnel	4	Plaie	3
Interrupteur	4	Sonde urinaire	3
Lavabo	3	Cathéter	4
Chariot anesthésie, instruments	5	Prélèvement nasal	2
Poignet de porte	3	Divers	4
Divers	19		
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>Total</b>	<b>16</b>

**Divers:** Mur, table, bord du lit du malade, téléphone fixe et clavier d'ordinateur utilisés par les personnels, ascenseur, poubelle, potence, scialytique, boîte aspiration, pince.

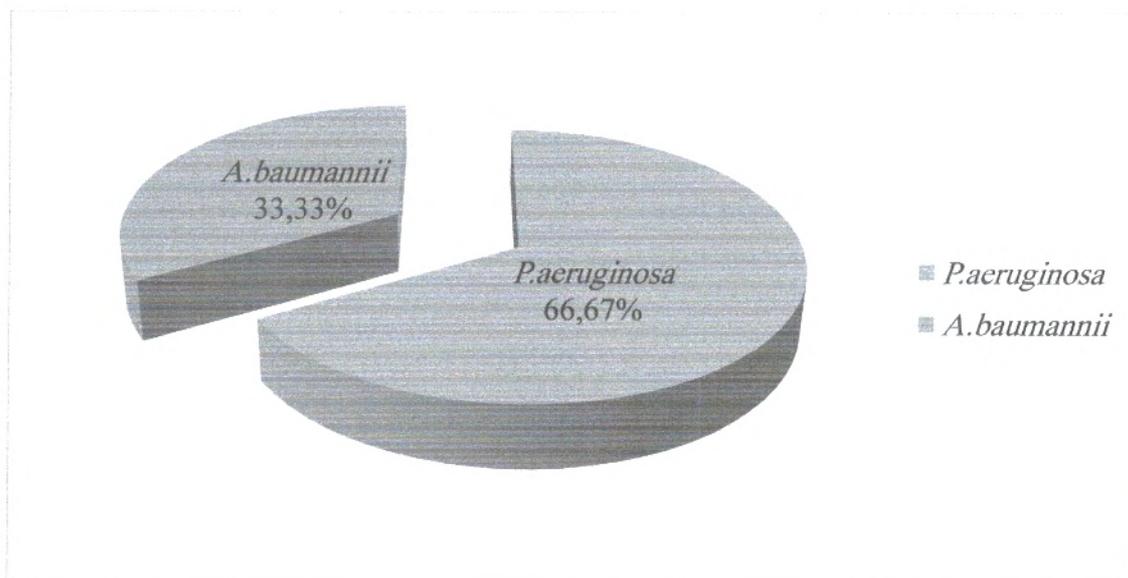
L'analyse des prélèvements a permis d'isoler 37 bacilles à Gram négatif, dont 25 (67,57%) appartenant à la famille des entérobactéries et 12 au groupe des non fermentants, avec une fréquence d'isolement de 32,43% (**Figure. 6**).



**Figure 6.** Répartition des bacilles à gram négatif isolés à partir des prélèvements.

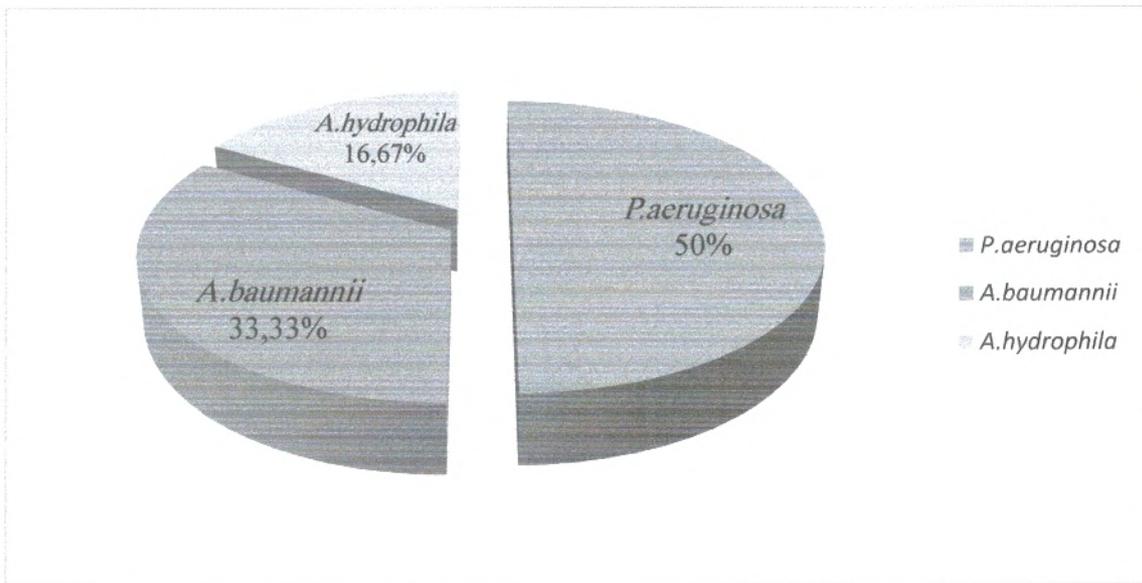
### 1.2 Souches identifiées :

Parmi les 12 BGNnF, 06 ont été isolés à partir de 18 prélèvements effectués sur patients (50%) dont 04 souches de *P.aeruginosa* (66,67%) et 02 *A.baumannii* (33,33%) (**Figure. 7**).



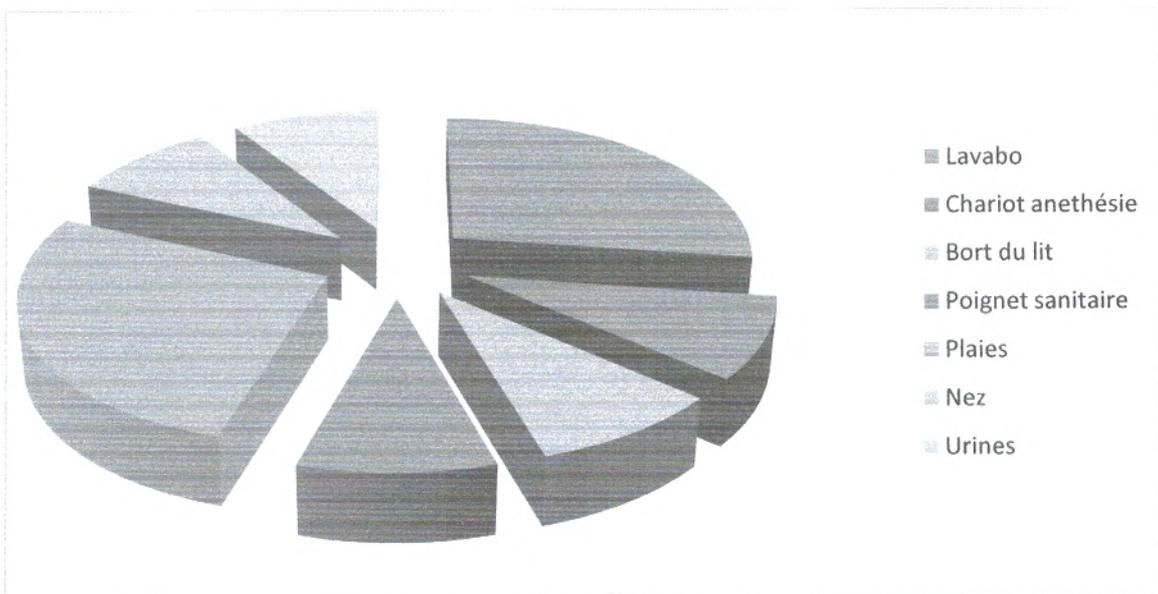
**Figure 7.** Répartition des BGNnFs isolés à partir des patients.

A partir de 38 prélèvements de l'environnement, 06 BGNnF ont été isolés dont 03 souches de *P.aeruginosa* (50%), 02 *A.baumannii* (33,33%) et 01 *Aeromonas hydrophila* (16,67%) (**Figure. 8**).



**Figure 8.** Répartition des BGNnFs isolés à partir des prélèvements de l'environnement.

Dans notre étude, nous avons noté que les plaies chirurgicales et les lavabos représentaient les principaux sites d'isolement des BGNnF (50%) (**Figure. 9**).



**Figure 9.** Répartition des BGNnF en fonction des sites de prélèvement.

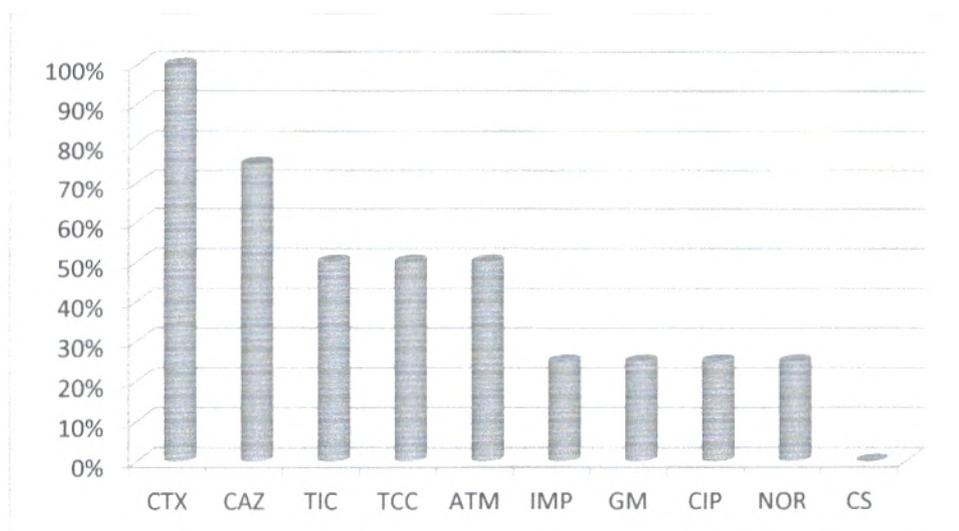
### 1.3. Sensibilité aux antibiotiques :

#### 1.3.1. *Acinetobacter baumannii* :

Les souches d'*A. baumannii* présentent une résistance importante vis-à-vis de la famille des  $\beta$ -lactamines, avec un taux de résistance de 100% à la céfotaxime, 75% à la ceftazidime et 50% à la ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique et l'aztréonam. L'imipénème est le moins touché avec un taux de résistance de 25%.

La résistance aux aminosides présente un pourcentage plus faible : 25% à la gentamycine et kanamycine, et aux fluoroquinolones : 25% à la ciprofloxacine, norfloxacine.

La colistine demeure le seul antibiotique potentiellement efficace avec 100% de souches sensibles (**Figure. 10, Annexe. 7**).



**Figure 10.** Taux de résistance aux antibiotiques des souches d'*A.baumannii*.

#### 1.3.2. *Pseudomonas aeruginosa* :

Pour les bacilles pyocyaniques, on note une sensibilité totale à la pipéracilline, pipéracilline + tazobactam, céftazidime, et une résistance à la ticarcilline (51,14%), ticarcilline + ac.clavulanique (71,42%) et à l'imipénème (14,28%).

Les taux de résistance aux aminosides sont : Gentamycine et kanamycine (14,28%), tobramycine (28,57%), et aux fluoroquinolones sont : Ciprofloxacine et norfloxacine (42,86%).

Aucune résistance n'a été observée pour la colistine (**Figure. 11, Annexe. 6**).

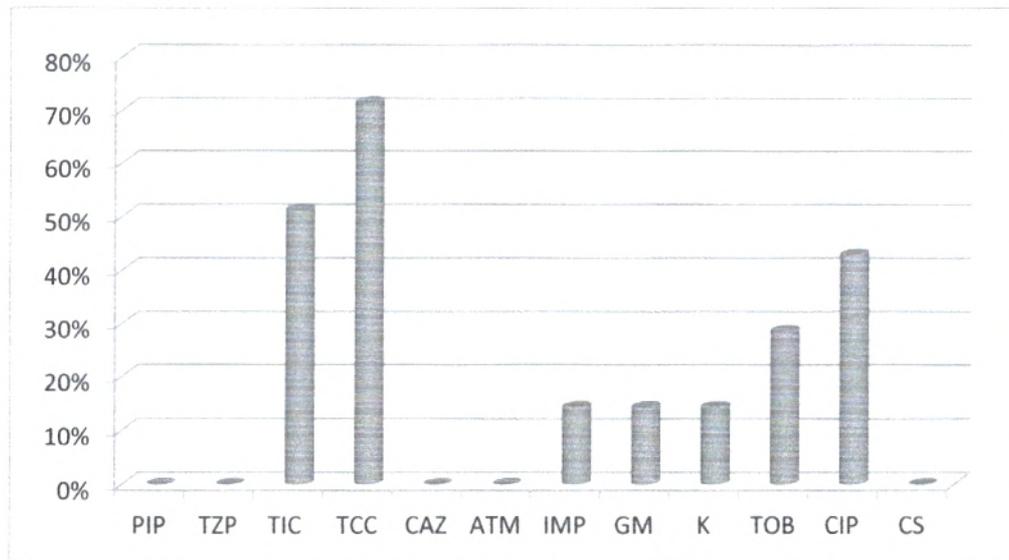


Figure 11. Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *P.aeruginosa*.

1.4. Phénotypes de résistance :

1.4.1. *Acinetobacter baumannii* :

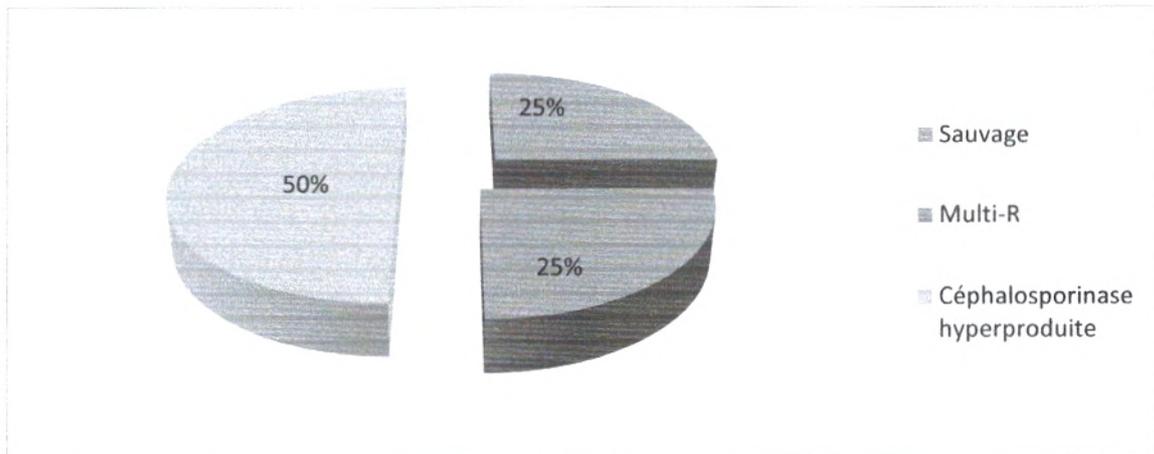
1.4.1.2. Détermination des niveaux de CMI :

Au cours de cette étude, 75% des souches sont productrices de céphalosporinase.

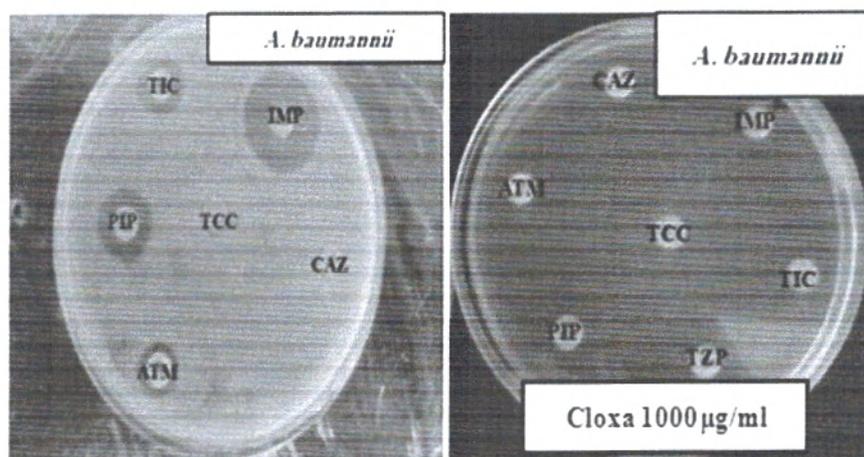
Tableau 7. Valeurs des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) vis-à-vis des antibiotiques testés.

Souches	IMP $\leq 2 > 8$	CAZ $\leq 4 > 8$	CIP $\leq 1 > 1$	AK $\leq 8 > 16$	Phénotype
A.b 1	2	8	0,25	8	Céphalosporinase hyperproduite
A.b 2	64	256	128	256	Multirésistante (IMP-R)
A.b 3	1	0,25	<0,125	2	Sauvage

L'analyse du comportement de ces trois souches vis-à-vis des antibiotiques testés a permis de distinguer 3 phénotypes de résistance : phénotype sensible (25%), phénotype multirésistant (Imipénème résistant) (25%) et phénotype céphalosporinase hyperproduite (50%) (Figure. 12, 13. Annexe. 5).



**Figure 12.** Répartition des phénotypes de résistance des souches d'*A. baumannii*.



**Figure 13.** Résultat du test à la cloxacilline.

La production de céphalosporinase a été observée chez deux souches d'*A. baumannii* testées, ce phénotype étant confirmé par la restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération en présence de concentration définie de cloxacilline.

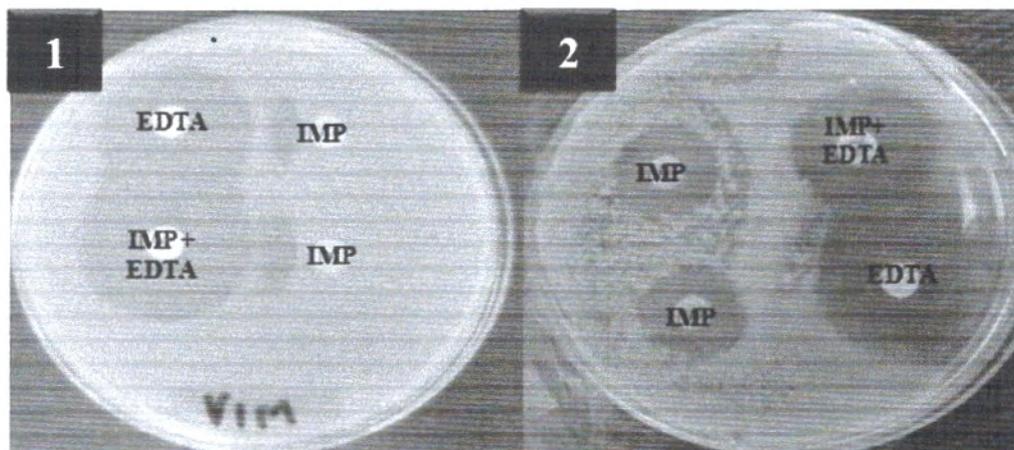
Le test de Hodge a permis de mettre en évidence la présence d'enzyme à activité carbapénémase chez la souche testée (**Figure. 14**).



**Figure 14.** Résultat du test de Hodge.

La recherche de la métallo- $\beta$ -lactamase (MBL) a été effectuée sur la souche résistante à l'imipénème en mettant à profit la faculté de l'éthylène-diamin-tetra-acetic-acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'IMP en chélatant les ions  $ZN^{2+}$  indispensables à l'activité de la MBL en la rendant inactive.

L'activité des  $\beta$ -lactamases n'est pas inhibée par l'action de l'EDTA, donc la souche considérée ne possède pas de métallo-  $\beta$ -lactamase permettant leur résistance à l'imipénème (**Figure. 15**).



**Figure 15.** Résultat du test à l'EDTA.

- (1) Souche de référence productrice d'une métallo-  $\beta$ -lactamase (VIM-1).
- (2) Souche d'*A. baumannii* testée.

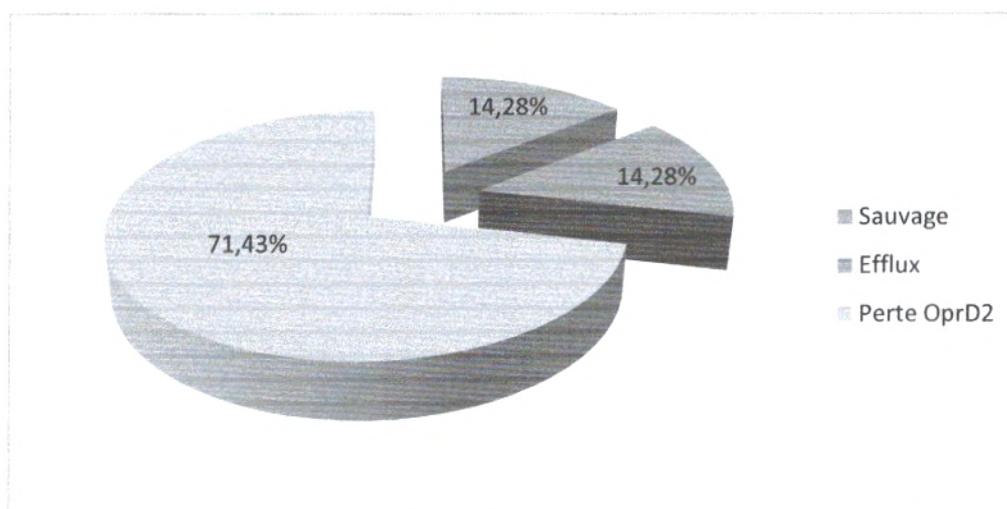
### 1.4.2. *Pseudomonas aeruginosa* :

### 1.4.3. Détermination des niveaux de CMI :

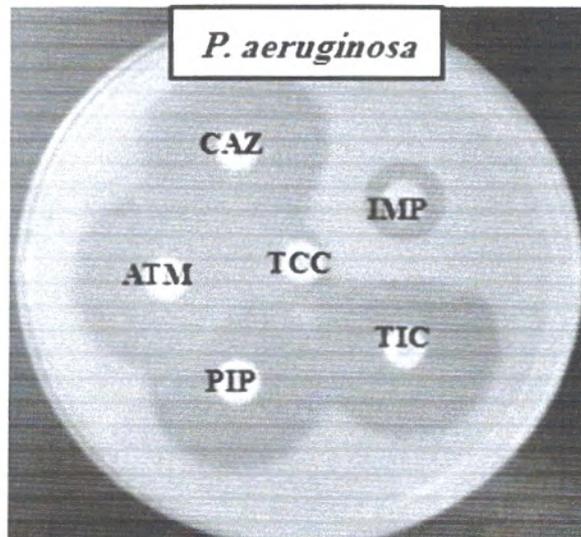
**Tableau 6.** Valeurs des CMI des antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Souches	IMP $\leq 4 > 8$	CAZ $\leq 8 > 8$	CIP $\leq 0,5 > 1$	AK $\leq 8 > 16$	Mécanismes suspectés
P.a 18	16	8	1	8	Perte OprD
P.a 19	2	1	0,25	4	Sauvage

La répartition des phénotypes de résistance des bacilles pyocyaniques a révélé la présence unique de mécanismes de résistance non enzymatiques (28,57%), dont 14,28% d'efflux lié à la résistance à la ticarcilline et 14,28% du perte de la porine OprD2 (**Figure. 17**) liée à la résistance isolée à l'imipénème, alors que les autres  $\beta$ -lactamines restent actives. Le reste des souches était représenté par le phénotype sauvage (71,43%) (**Figure. 16**)



**Figure 16.** Répartition des phénotypes de résistance des souches de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines.



**Figure 17.** Résultat d'antibiogramme de *P. aeruginosa* présente le phénotype perte OprD2.

### 1.5. Détection des gènes responsables par technique du PCR :

Pour la mise en évidence de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, nous avons procédé à un screening des gènes responsables de ces résistances par PCR, chez deux souches d'*A. baumannii*, une multirésistante et l'autre productrice de céphalosporinase, et chez deux souches de *P. aeruginosa* caractérisées par la perte de la porine OprD2.

Sur gel d'agarose nous avons pu observer la migration des ADN des souches concernées. Les souches d'*A. baumannii* ont été négatives quant à la recherche du gène NDM1, responsable de la résistance aux céphalosporines de troisième génération (**Figure. 18**).

Pour les gènes de résistance à l'imipénème, les souches de *P. aeruginosa* ont montré une PCR positive pour le gène OprD2 (**Figure. 19**).

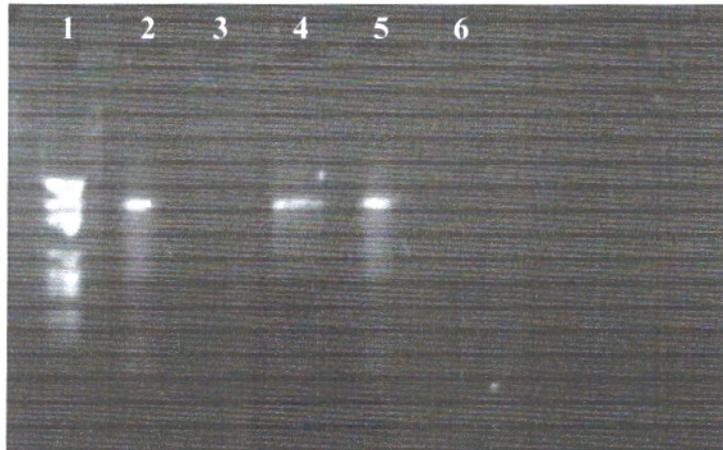


**Figure 18.** Visualisation des gènes NDM1 des *A. baumannii* sur gel d'agarose.

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

**1** : Marqueur de taille. **2** : Contrôle positif (*Klebsiella pneumoniae*). **3** : Témoin négatif.  
**18** : *A. baumannii* (**A.b** **4** : Multirésistante avec IMP résistant). **19** : *A. baumannii* (**A.b** **2** :  
céphalosporinase hyperproduite). **20** : Témoin négatif.



**Figure 19.** Visualisation des gènes OprD des *P. aeruginosa* sur gel d'agarose.

**1** : Marqueur de taille. **2** : Contrôle positif (: *P.aeruginosa*). **3** : Témoin négatif.

**4** : (**P.a** **6** *P.aeruginosa*). **5** : *P. aeruginosa*. **6** : Témoin négatif.

### 2. Discussion :

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des agents pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales.

Notre étude a été effectuée sur un collectif de 12 souches de BGNnF isolées au niveau du service de la neurochirurgie du CHU de Tlemcen. Le profil bactériologique des isolats est marqué par une légère prédominance d'*A. baumannii* (33,33%) par rapport à *P. aeruginosa* (58,37%) dont la fréquence est probablement liée au caractère nosocomial des infections dans lesquelles elles sont impliquées.

Les problèmes infectieux après neurochirurgie ne sont pas fréquents mais posent des problèmes en termes de diagnostic et de traitement. Ils allongent la durée d'hospitalisation, sont responsables d'une morbidité importante, et imposent une antibiothérapie prolongée (en dehors du cas particulier des méningites) avec ses conséquences inhérentes (**Leblanc., 2010**).

Au sein de notre étude, la fréquence d'isolement d'*A.baumannii* est la même que celle retrouvée dans une étude réalisée au niveau du même laboratoire qui représente 33% de l'ensemble des BGNnF (**Sefraoui., 2011**).

En raison de la frontière mal définie entre colonisation et infection, la véritable prévalence d'*A. baumannii* est difficile à préciser. La pression de sélection exercée par l'usage abusif des antibiotiques à large spectre serait à l'origine de l'émergence préoccupante de cette bactérie au sein de notre étude (**Elouennass et al., 2003**).

*A.baumannii* est un agent responsable d'infections nosocomiales, principalement des pneumopathies liées à la ventilation mécanique, d'infections de la peau et des tissus mous, d'infections urinaires, de bactériémies et de méningites postopératoires (**Eveillard., 2012**). La situation épidémiologique notée durant notre étude au niveau du service de la neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen concernant cette souche est moins tolérante que celle de la réanimation.

*A. baumannii* est une espèce qui dispose d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action antibiotique. Cette espèce possède des mécanismes de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines, correspondant principalement à la production d'une céphalosporinase chromosomique ( $\beta$ -lactamase de type AmpC) (**Mansour., 2005**).

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

Dans notre étude, le phénotype céphalosporinase hyperproduite est prédominant (75%). Ce taux est supérieur à celui obtenu dans une étude marocaine (30%) (**Elouennass., 2003**).

La capacité de cette espèce à persister et à résister au niveau de l'environnement hospitalier et sa capacité à cumuler des facteurs de résistance, aboutissent rapidement à une impasse thérapeutique, expliquant les taux de résistances constatés.

*P. aeruginosa* est généralement retrouvé dans les environnements humides. C'est une bactérie pathogène opportuniste car bien que pouvant être isolée d'infections communautaires, elle est le plus souvent responsable d'infections nosocomiales souvent graves (**Ben Abdallah et al., 2008**).

58,37% des souches de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir du même service (Neurochirurgie), qui a connu précédemment un épisode grave d'infections nosocomiales. Les prélèvements concernés proviennent surtout des plaies chirurgicales, des sondes urinaires et des lavabos, qui sont les mêmes sites d'isolement que dans l'étude effectuée au niveau du même laboratoire par **Sefraoui (2011)** et d'une étude tunisienne décrivant aussi l'importance de cette espèce surtout en unité de soins intensifs (**Ben Abdallah et al., 2008**).

*P. aeruginosa* présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, restreignant les possibilités thérapeutiques à un nombre limité d'agents antimicrobiens (**Mérens et al., 2012**).

Le taux des souches résistantes ou intermédiaires à la ticarcilline au sein de notre étude est de 42,85%, ce qui est supérieur à celui retrouvé dans une étude effectuée au niveau de notre laboratoire, où le pourcentage est de 33,5%. Parmi les souches sensibles à la ticarcilline, 71,43% sont représentées par le phénotype sauvage et le reste, 14,28%, par une résistance isolée à l'imipénème caractéristique d'un mécanisme d'imperméabilité lié probablement à la perte de la porine OprD2, qui est confirmé par la technique de PCR, mais dans l'autre étude le taux est plus faible (55,7%) (**Drissi et al., 2011**).

Concernant le taux de surproduction du système d'efflux actif, il est de 14,28% qui est inférieur au taux d'une autre étude faite aussi au niveau de notre laboratoire (55,7%) par **Drissi (2008)**.

La résistance aux  $\beta$ -lactamines était très rarement associée à des résistances non enzymatiques, et à aucune résistance enzymatique, contrairement à l'étude qui confirme la

production des  $\beta$ -lactamases et la surproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC (12%) (**Drissi et al., 2008**).

Dans notre étude, la résistance aux aminosides pour les *A. baumannii* est représentée par un taux de 25%. Par ailleurs, au Maroc la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones a connu depuis 1989 une évolution très fréquente, de 68% à 72%. Les fluoroquinolones sont des molécules couramment prescrites aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu extra hospitalier générant la sélection des souches résistantes avec le risque de transmission des gènes de résistance (**Elouennass et al., 2003**).

Pour la résistance des *P.aeruginosa* aux aminosides dans notre étude, la résistance à la tobramycine (14,28%) est similaire à celle retrouvée dans l'étude algérienne mais plus faible par rapport à celle retrouvée dans l'étude tunisienne (20 à 30%), et pour la résistance à la gentamycine (14,28%), elle est plus faible comparée à celles obtenues dans les études algériennes (67,4%) et tunisiennes (30 à 50%) (**Drissi et al., 2011, Ben Abdallah et al., 2008**). Quant à la résistance à la ciprofloxacine et la norfloxacine, les chiffres de notre étude sont plus élevés (28,57%) que les études précédentes effectuées à Tlemcen au niveau de notre laboratoire par **Drissi (2008, 2011)**.

# ***CONCLUSION***

### **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 à l'échelle mondiale.

La gravité et l'évolution souvent fatale des infections causées par ces bactéries sont dues à la conjonction d'un terrain immunodéprimé et à des bactéries ayant une capacité d'acquérir et d'accumuler les facteurs de résistance à de nombreux antibiotiques. Cela s'ajoute à un fort potentiel épidémique intrahospitalier. Ces caractéristiques en font un agent d'infections nosocomiales de prédilection particulièrement chez les sujets fragilisés hospitalisés en soins intensifs ou en chirurgie.

L'étude de l'antibiorésistance des BGNnF au niveau du service de la neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen a permis d'apprécier l'efficacité des antibiotiques utilisés. Toutefois, aucune souche résistante 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* serait à l'origine de l'apparition de résistances.

Exerçant une pression sur les micro-organismes, l'usage abusif des antibiotiques est le principal facteur épidémiologique responsable de l'émergence de la résistance.

L'usage optimal des antibiotiques constitue la pierre angulaire de la réduction de l'antibiorésistance.

Une collaboration multidisciplinaire et la mise sur pied d'un programme de surveillance efficace de l'usage des antimicrobiens devraient être intégrées dans les objectifs d'amélioration de la qualité des soins dans tous les établissements de santé.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

### Références bibliographiques

1. **Avril J.-L., Dabernat H., Denis F, Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique. Ellipses. (2<sup>e</sup> édition, P: 318,319).
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: 233-37.
3. **Baudry C., Brézellec H. (2006).** Microbiologie-immunologie : Cahiers de préparateur en pharmacie. (2<sup>e</sup> édition, P: 55).
4. **Ben Abdallah H., Noomen S., Khélifa A., Ben Elhadj., Sahnoun O., Elargoubi A., Mastouri M. (2008).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 38 : 554–556.
5. **Borde I. (2006).** LA PCR *Polymerase chain reaction*, ou réaction de polymérisation en chaîne. Biologie et multimédia – université Marie Curie – USR de biologie.
6. **Boukerzaza S. (2006).** Etude génétique et moléculaire du phénotype de résistance des *Salmonella enterica* sérotype Senftenberg. Mémoire de magister en génétique moléculaire.
7. **Bryskier A., Acar J., Glauser M., Moreillon Ph. (1999).** Antibiotiques, agents antimicrobiens et antifongiques. (P: 901).
8. **Cangoue Pieboji J. (2007).** Inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat des sciences en biochimie de 3<sup>e</sup> cycle sous la direction de Jean-Marie FRERE.
9. **Cattoir V. (2012).** Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. Revue francophone des laboratoires. N° 445 // 79.
10. **Cavallo J.-D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004).** Bêta-lactamines. EMC-Maladies Infectieuses 1 : 129–202.
11. **Cavallo J.-D., Fabre R. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* : antibiogramme aux bêta-lactamines. Service de biologie, HIA Bégin, 69, avenue de Paris, 94163 Saint-Mandé France. Elsevier SAS.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

12. CA SFM., 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
13. Decré D. (2012). *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. Revue francophone des laboratoires. N° 441 // 43.
14. Drissi M., Baba Ahmed Z., Dehecq B., Bakour R., Plésiat P., Hocquet D.. (2008). Sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* : première étude en Algérie. Médecine et maladies infectieuses 38 : 187–191.
15. Drissi M., Baba Ahmed Z., Bakour R. (2011). Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques au niveau du service de neurochirurgie du C.H.U. de Tlemcen Algérie. Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines. Médecine du Maghreb. N° 184.
16. Elouennass M., Bajou T., Lemnouer H., Foissaud Hervé., Baaj J. (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.
17. Euzéby J.P. (2005). *Stenotrophomonas, stenotrophomonas maltophilia*. Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire.
18. Eveillard M., Joly-Guillou M.-L. (2012). Infections émergentes à *Acinetobacter baumannii* et circonstances favorisant leur survenue. Article de revue. 60 : 314-319.
19. Freschi C R., Carvalho L F., José B C. (2005). Comparison of DNA-extraction methods and Selective Enrichment broths on the detection of *Salmonella Typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). Brazilian Journal of Microbiology. ISSN 1517-8382.
19. Goubau P., Pellegrims E. (2000). Wegwijzer in Microbiologie. (P: 133).
20. Hafiane A., Ravaoarino M. (2008). Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. Revue générale. 38 : 238–247.
21. Hidri N. (2012). Identification d'*Acinetobacter spp.* au laboratoire. Revue francophone des laboratoires. N° 441 // 37.
22. Kastalli S., El Aidli. (2009). Pharmacologie des Bêta-Lactamines. Centre National de Pharmacovigilance.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

23. **Khakhkhar Vipul M., Thangjam Rubee C., Bhuva J P., Ballal M. (2012).** Détection des métallo-bêta-lactamase enzymes produisant *Pseudomonas aeruginosa* isolées de divers échantillons cliniques. Article de recherche originale. 3 : 4-9.
24. **Klaramsr. (2011).** *Burkholderia Cepacia*, mécanismes de résistance. ESAP Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan.
25. **Lambert T. (1997).** Etat actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides. Les associations antibiotiques en réanimation en 1997. Article de recherche originale. 6 : 9s-16s.
26. **Laurent F. (2009).** Principales  $\beta$ -lactamines Laboratoire de Microbiologie. Groupement Hospitalier Nord Lyon.
27. **Lavigne J.-P., Gaillard J.-B., Bourg G., Tichit C., Lecaillon E., Sotto A. (2008).** Etude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE : Détection de CTX-M et étude de la virulence. Pathologie Biologie 56 : 447–453.
28. **Leblanc Pierre-Etienne, Cheisson Gaëlle, Martin Laurent, Vigué Bernard. (2010).** Infections postopératoires en neurochirurgie.
29. **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- $\beta$ -Lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp.
30. **Le minor L., Véron M. (1989).** Bactériologie médicale. (2<sup>e</sup> édition, P: 338,339).
31. **Lozeniewski A., Rabaud C., Nancy. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, infections associées aux soins, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins. CCLIN Sud-Est.
32. **Mammeri H. (2007).** Mécanismes de résistance aux antibiotiques (DCEM1). Cours préparé par le Docteur Hedi Mammeri, MCU-PH, Service de Bactériologie-Hygiène, CHU Amiens.
33. **Mansour W., Bouallegue O., Dahmen S., Boujaafar N. (2008).** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux b-lactamines chez des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). 56 : 116–120.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

34. **Mathieu M.-J., Fonteneau J.-M. (2008).** Le manuel porphyre de préparateur en pharmacie. (P: 529).
35. **Mérens A., Delacour H., Plésiat P., Cavallo J.-D., Jeannot K. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. Revue francophone des laboratoires. N°435 // 49.
36. **Mérens A., Janvier F., Vu-Thien H., Cavallo J.-D., Jeannot K. (2012).** Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. Revue francophone des laboratoires. N° 445 // 59.
37. **Mérens A., Servonnet A. (2010).** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. Revue francophone des laboratoires. N°422 // 33.
38. **Monteil H. (2006).** Bacilles à Gram négatif non fermentants. Biologie Médicale. Elsevier Masson SAS. 90-05-0020.
39. **Naas (2003).** Phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche d'*Acinetobacter baumannii* productrice de la  $\beta$ -lactamase VEB-1. Journal de microbiologie clinique, N° 41:3542-7.
40. **Namy O. (2003).** Plusieurs morts dans les hôpitaux français dus à une bactérie... Futura-sciences.
41. **OMS. (2003).** Fiches modèles OMS d'information à l'usage des prescripteurs : Médicaments utilisés dans les infections bactériennes. (P: 134).
42. **Peltier C. (2011).** La résistance aux antibiotiques se répand rapidement. Futura-sciences.
43. **Perronne C. (1999).** Maladies infectieuses 1. Collection dirigée par Olivier Bletry. (P: 103-104).
44. **Pourriat J.-L., Martin C. (2005).** Principes de réanimation chirurgicale. (2<sup>e</sup> édition, P: 293).
45. **Ribadeau Dumas F. (2007).** Aminocyclitolés, sulfamides, imidazolés. DIU stratégies thérapeutiques. Service de maladies infectieuses et tropicales, Hôpital Necker enfants malades.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 46. Sefraoui I. (2011).** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentaires non hétérofermentaires au niveau du CHU de SIDI Bel Abbes. Mémoire de Magister.
- 47. Segonds C., Chabanon G. (2001).** *Burkholderia cepacia* : les dangers d'un micro-organisme phytopathogène pour les patients atteints de mucoviscidose. Revue générale 3 : 259-69.
- 48. Segonds C., Monteil H., Chabanon G. (2006).** Espèces du complexe *Burkholderia cepacia* : épidémiologie, pathogénicité et résistance aux antibiotiques. Article de recherche originale. 8 : 43-50.
- 49. Sotto A., Lavigne J.-P. (2007).** Polymyxines. Maladies infectieuses : 1-7 Article 8-004-J-10.
- 50. Sougakoff W., Trystram D. (2003).** Résistances aux  $\beta$ -lactamines. Service de bactériologie -Hygiène Pitié-Salpêtrière. Université Pierre et Marie Curie.
- 51. Toumi A. (2008).** Les aminosides. Service des maladies infectieuses CHU Fattouma Bourguiba – Monastir.
- 52. Vedel G, 2005.** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. Journal of antimicrobial chemotherapy. 56(4): 657-664.
- 53. Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91.

# ***ANNEXES***

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

TESTS	SUBTRACTS	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-nitrophénil-βD-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 (catalogue analytique) API 20NE.

API 20 NE

670151 - K2 - 2004

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTABELLE /  
 TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /  
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIEERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /  
 TABELA IDENTYFIKACJI

% de reacciones positivas después 24-48 hrs a 29°C ± 2°C / % of positive reactions after 24-48 hrs. at 29°C ± 2°C /  
 % der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 24-48 H a 29°C ± 2°C /  
 % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 29°C ± 2°C / % de reacções positivas após 24-48 H a 29°C ± 2°C /  
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 24-48 ώρες στους 29°C ± 2°C / % av positiva reaktioner efter 24-48 timmar vid 29°C ± 2°C /  
 % of positive reactions after 24-48 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 24-48 godzinach w 29°C ± 2°C

API 20 NE	V6.0	NC	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUA	ARAJ	IMVE	MAN3	NAG5	MAL6	GNT6	CAP6	ADA	MLT6	DTA	PACA	OX	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	37	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99	
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100	
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	99	
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100	
<i>Brevibacterium dermatitis</i> / <i>Oblique ulnaris</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100	
<i>Brevibacterium vesiculans</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98	
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	98	
<i>Comamonas heterotermans</i> / <i>Paracaryonax</i>		74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	42	55	34	87	32	3	98	
<i>Chryseobacterium lituola</i>		18	0	13	71	1	1	100	30	99	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Flavobacterium oryzihabitans</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1	
<i>Methylobacterium mesophilum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99	
<i>Ralstonia solanacei</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99	
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	0	5	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	100	
<i>Sphingomonas paucimobis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73	
<i>Sphingomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7	
<i>Acinetobacter baumannii</i> / <i>alkalocalcicus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0	
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	0	
<i>Acinetobacter junii</i> / <i>Johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95	70	0	0	0	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	70	20	46	1	36	0	0	
<i>Acinetobacter radioresistans</i>		2	2	0	2	0	0	0	19	2	0	0	0	0	0	97	100	2	2	87	0	0	
<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>catenae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99	
<i>Aer. salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	80	2	21	2	0	0	2	0	0	100	
<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100	
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100	
<i>Aprotectum radiobacter</i>		98	0	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alicyclobaculum acidiphilum</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100	
<i>Alicyclobaculum faecalis</i> 1		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98	
<i>Alicyclobaculum faecalis</i> 2		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100	
<i>Alicyclobaculum fytodiatens</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100	
<i>Bemisia zoocleum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	100	
<i>CDC group O2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	1	0	1	0	89	89	86	99	96	14	98	
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97	
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	93	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99	
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99	
<i>Myxides spp.</i>		0	0	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100	
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	1	99	
<i>Moraxella spp.</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	17	1	0	0	1	1	98	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99	
<i>Opella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96	
<i>Psychrobacter phenylbutylus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100	
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99	
<i>Sphingobacterium spiritivum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99	
<i>Werscheia wosa</i> / <i>Erreobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	0	3	1	0	0	98	
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77	
<i>Pasteurella hemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85	
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	2	1	0	1	0	1	0	0	96	
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	0	0	0	1	6	0	1	6	0	0	84	
<i>Pasteurella sp.</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	0	0	1	13	1	0	87	
<i>Photobacterium damisela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100	
<i>Resistomonas shigeloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99	
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99	
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100	
<i>Vibrio fischeri</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100	
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	0	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99	
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	1	1	95	99	99	0	0	10	9	1	6	28	0	0	98	91	0	100	

\* *Brevibacterium* spp possible / möglich / possible / possibile / möglich / möglich / möglich / Möglichkeit  
 Verifier la mobilité / Check the mobility / Beweglichkeit überprüfen / Verificar la movilidad / verificare la mobilità /  
 Verificar a mobilidade / Ελέγξτε την κινητικότητα / Kontrollera mobiliteten / Sprawdzic zdolnosc do ruchu  
*Brevibacterium dentrificans* / *Brevibacterium vesiculans* / *Moraxella spp.*  
 Mobilität / Mobilität / Beweglichkeit / Movilidad / Mobilitate / Mobilitate / Mobilitate /  
 Mobilite / Ruch

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.c lavulanique	TCC	75/10µg/ml	≤ 16/2	>16/2	≥22	<22
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤16	>16	≥18	<18
	Pipéracilline+tazobactam	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 7. Résultats d'antibiogramme obtenus pour les souches d'*A. baumannii*.1.  $\beta$ -lactamines

Souches	TIC $\geq 22 < 22$	TCC $\geq 22 < 22$	PIP $\geq 18 < 18$	TZP $\geq 19 < 19$	CAZ $\geq 19 < 19$	ATM $\geq 27 < 19$	IMP $\geq 22 < 17$	Mécanisme suspecté
A.b 1	S	R	S	S	S	S	S	Sauvage
A.b 2	R	R	S		R	S	S	céphalosporinase
A.b 3	S	S	S	S	S	S	S	Sauvage
A.b 4	R	R	R	R	R	R	R	Multirésistante (IMP-R)

## 2. Aminosides et fluoroquinolones

Souches	Aminosides			Fluoroquinolones	Autres
	Tobramycine $\geq 16 < 16$	Gentamicine $\geq 16 < 16$	Amikacine $\geq 17 < 15$	Ciprofloxacine $\geq 25 < 22$	Colistine
A.b 1	S	S	S	S	S
A.b 2	S	S	S	S	S
A.b 3	S	S	S	S	S
A.b 4	R	R	R	R	S

العصيات السالبة الغرام عديمة التخمر (BGNNF) هي جراثيم ممرضة إنتهازية مسؤولة أساسا عن عدوى المستشفيات شدة الإصابات التي هي مسؤولة عنها تعكس صعوبات الدعم و أخرى صعوبات التعرف على البكتيريا و مقاومتها للمضادات حيوية مجموع 12 بكتيريا من العصيات عديمة التخمر (BGNNF) (1) *Aeromonas hydrophila* 4 *Acinetobacter baumannii* 7 *Pseudomonas aeruginosa* تم عزلها ما بين يناير و ماي 2013 في قسم جراحة الأعصاب في المستشفى الجامعي للتمسان. دراسة حساسية هذه البكتيريا ل13 مضاد حيوي منها 6  $\beta$ -لاكتامين ، 4 أمينوزيد ، 3 فليوروكينولون و 1 كلستين تبين بتطبيق تقنية الأقراس وفقا لمعايير CA-SFM, كشفت ظهور بكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية. مراقبة طبع المقاومات ل  $\beta$ -لاكتامين للبكتيريا من نوع *P. aeruginosa* أظهرت أن الطبع الغالب هو الطبع الحساس (71%) يتبعه طبع المقاومات الغير الأنزيمية (28,56%). اختبارات (cloxacilline) مؤكدة المقاومة لسلاسلات *A. baumannii* ذات النمط الظاهري سيفالوسبوغيناز. في الأخير حدد التحليل الجيني ب(PCR) أن الجين (NDM1) هو المسؤول عن إنتاج الأنزيم سيفالوسبوغيناز للسلاسلات *A. baumannii* و الجين (OprD2) هو المسؤول عن فقدان القناة OprD2 لسلاسلات (*P. aeruginosa*). الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas aeruginosa* *Acinetobacter baumannii* , مقاومة المضادات الحيوية, طبع المقاومات ل  $\beta$ -لاكتامين.

## RESUME :

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNNF) sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables essentiellement d'infections nosocomiales. La gravité des infections dont elles sont responsables, traduisent des difficultés de prise en charge liées entre autres à des difficultés d'identification et à leur résistance aux antibiotiques. Un ensemble de 12 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants (7 *Pseudomonas aeruginosa* et 4 *Acinetobacter baumannii* et une *Aeromonas hydrophila*) ont été isolées, entre Janvier et Mai 2013, au niveau du service de la neurochirurgie du C.H.U de Tlemcen. L'étude de la sensibilité in vitro de ces germes vis-à-vis de 13 antibiotiques dont 6  $\beta$ -lactamines, 5 aminosides, 3 fluoroquinolones et la colistine, par la méthode des disques selon les normes du CA-SFM, a révélé l'émergence des souches résistantes (*P. aeruginosa* et *A. baumannii*) aux antibiotiques. L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des bacilles pyocyaniques a révélé la prédominance du phénotype sauvage (71,43%) suivi du phénotype de résistance non enzymatique (28,56%). Des tests de cloxacilline ont permis de confirmer le phénotype céphalosporinase des souches d'*A. baumannii*. Enfin, une analyse génotypique a permis d'identifier des gènes (NDM) codant pour la production de céphalosporinase pour les souches d' *A. baumannii* et la perte de porine OprD2 pour les souches de *P.aeruginosa*.

## MOTS CLES :

*Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; résistance aux antibiotiques; phénotype de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

## SUMMARY :

The Gram-negative non-fermenting bacteria (BGNNF) are opportunistic pathogens primarily responsible for nosocomial infections. Severity of infections for which they are responsible, reflect the difficulties of management and others related to identification difficulties and resistance to antibiotics. A set of 12 strains of Gram-negative non-fermenting bacteria (7 *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* 4 and one *Aeromonas hydrophila*) were isolated between January and May 2013 at the neurosurgery department of the University Hospital of Tlemcen. The study of in vitro susceptibility of these organisms vis-à-vis 13 antibiotics including six  $\beta$ -lactams, 5 aminosides, 3 fluoroquinolones and the colistin using the disc method according to the standards of the CA-SFM in 2010, revealed the emergence of resistant strains to (*P. aeruginosa* and *A.baumannii*) antibiotics. Analysis of the phenotypes of resistance to  $\beta$ -lactam bacilli aeruginosa revealed the predominance of wild-type (71.43%) followed by non-enzymatic resistance phenotypes (28.56%). Cloxacillin tests, confirming the cephalosporinase phenotype strains of *A. Baumannii*. Then genotyped identified genes (NDM) coding for the production of cephalosporinase for stem *A.baumannii* 's and (OprD) encoding for the loss of porin OprD for strains of *P. aeruginosa*.

## KEY WORDS:

*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, antibiotics resistance, phenotypes to  $\beta$ -lactams; multiresistance.