

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie en secteur biomédical et vétérinaire



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Recherche des bacilles à Gram négatif
Résistants aux carbapénèmes isolés de milieux
hydriques*

Présenté par :

Ait meziane Sabiha & Mansouri Wifak

Soutenu le : 16 Juin 2016

Devant le jury composé de :

Melle. Yanat B.	MAA	Président
Mme. Tafoukt R.	MAA	Encadreur
Mme. Belhadi K.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Nous tenons 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.

Nous exprimons ensuite nos remerciements les plus sincères à notre promotrice Mme TAFOUKT R., pour son encadrement, ses conseils, son orientation et ses encouragements tout au long de ce travail.

Nous vifs remerciements vont également aux membres du jury qui ont acceptés d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements s'adressent également au Pr .Touati A et à toute son équipe.

Nous tenons à remercier vivement Mme RAHMANI D.

Ingénieure du laboratoire de Microbiologie pour sa compréhension et sa gentillesse.

Enfin, nous tenons également à remercier toute personne, ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail réalisé grâce à l'aide d'ALLAH tout puissant

A mes très chers parents, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui

A ma cher Grand mer IMA KOKO

A mes frères : Moukane, Moumene et Hafid

Qui ont été toujours à mes cotés

A mes sœurs : Rahima, Sabrina, Akila et Chahla

Et leurs époux : Hakim, Boualam et Moho

A ma belle-sœur: Jazia

A mes nièces et neveux : Ikram, Chayma, Lobna, Amina,

Lina, Rima, Yasmin, Khalil, Rayen et Yaser

A la pensée de : Mes Grand parent maternelle

A mes amies : Fatima, Ryma, Fatma, Samira, Saida

Et à tous mes proches sans exception

Sabiha

Dédicaces

Merci à Dieu, d'avoir guidé mes pas et de m'avoir donné la volonté pour
Accomplir ce travail.

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers et précieux parents, pour m'avoir encouragé et soutenu durant mes études
Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie.

À ma grand- mère
Que Dieu te garde et t'accorde longue vie

À mon unique tante BIZET et son mari Tonton LHACHEMI

À mon oncle OMAR et sa femme SORAYA ainsi que mes adorables cousines ANAIS, AYA
et LYNA.

À mes oncles, mes cousines et mon cousin Djelloul.

À mon fiancé ILYES.

À mes beaux parents.

À mes copines et amies : Zineb, Rahima, Sara, Saida, Kahina, Nawel et ma voisine Wahiba.

Wifak

Liste des abréviations

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique.

ATB : Antibiotique.

BLSE : β -Lactamase à spectre élargie.

BGN : Bacille à Gram Négatif.

BGN.F : Bacille à Gram Négatif Fermentaire.

BGN.NF : Bacille à Gram Négatif Non Fermentaire.

C3G : Céphalosporine de troisième génération.

CA-SFM : Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

CAZ: Céfotaxime.

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide.

CTX: Céfotaxime.

CTX-M : Céfotaximase-Munich.

CX : Céfoxitine.

DD-test : Double Disque test.

EDTA: Ethylene Diamine Tetra-Acétique.

ERT : Ertapénème.

EUCAST: European committee on antimicrobial susceptibility testing.

H₂S: Thiosulfate de sodium.

I : Intermediaire.

IMP : Imipénème.

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase.

MBL: Métallo- β -lactamase.

MEM : Méropénème.

MH: Mueller Hinton.

NDM-1: New Dehli métallo- β -lactamases.

NR: Nitrate réductase.

OXA : Oxacilline.

Liste des abréviations

PH: Potentiel d'hydrogène.

R : Résistant.

RM: Rouge de Méthyle.

S : Sensible.

TDA : Tryptophane désaminase.

VIM : Verone integron code metallo- β –lactamase.

VP: Voges-Proskauer.

UFC/ml: Unité Formant une colonie par millilitre.

μ g : Microgramme.

Figure 1 : Répartition des BGN et différentes espèces d'entérobactéries isolées	11
Figure 2 : Taux de résistance des entérobactéries isolées aux β -lactamines	12
Figure 3 : Résultats du test de Hodge.....	13
Figure 4 : Résultat d'un Carba-NP-test modifié positif.....	13

Tableau I : Nombre de prélèvement par type d'eau.....6

Tableau II : Liste des antibiotiques testés.....8

Tableau III : Résultats des profils de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés.....15

Liste des tableaux en annexe

Tableau I: Sites des prélèvements par type d'eauAnnexe I.

Tableau II: Galerie biochimique classique d'identification des souches.....Annexe II.

Tableau III: Diamètre des zones d'inhibition édité par CA-SFM/EUCAS, 2015...Annexe III.

Tableau IV : La résistance des souches à Gram négatif aux antibiotiques.....Annexe V.

Tableau V: Le Nombre de souches isolées par type d'eau.....Annexe VIII.

Tableau VI: Nombre de souches résistantes par type d'eau.....Annexe IX.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Sommaire

Introduction.....	1
Matériel et méthodes	
I-Prélèvements.....	6
II-Condition d'échantillonnage et de transport.....	6
III-Enrichissement et sélection.....	7
IV-Isolement et purification.....	7
V-Identification.....	7
VI-Etude de la sensibilité aux antibiotiques	8
VII-Recherche des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	8
VII-1 Recherche de production de β -lactamases à spectre étendu.....	8
VII-2 Recherche de production de carbapénémase	9
VII-2-1 Test de Hodge.....	9
VII-2-2 Carba-NP test modifié	9
VII-2-3 Test aux inhibiteurs.....	9
Résultats	
I-Souches bactérienne isolées.....	11
II-Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux β -lactamines.....	12
III-Phénotype de résistance aux β -lactamine probables	13
III- 1-Recherche des β -lactamase à specter étendu (BLSE).....	13
III-2-Recherche de la production de carbapénèmases.....	13
III-2-1- Test de Hodge modifié.....	13
III-2-2- Carba-NP test modifié.....	13
III-3-Test aux inhibiteurs	14
Discussion	
Discussion générale.....	16
Conclusion.....	19
Liste des références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

La découverte des antibiotiques ainsi que l'amélioration de leurs activités a permis de sauver des millions de vies humaines. C'est l'une des plus grandes avancées en science médicale (**Marti et al., 2014**). Les antibiotiques sont des substances chimiques synthétique, semi-synthétique ou élaborées naturellement par certains micro-organismes, et ont un effet bactéricide ou bactériostatique. Ces molécules sont utilisées pour traiter une grande gamme d'infections bactériennes (**Marti et al., 2014**). Au cours des cinquante dernières années, l'utilisation de ces antibiotiques a augmenté régulièrement. En plus de leurs utilisations en médecine humaine, ils sont utilisés également en médecine vétérinaire et en élevage comme compléments alimentaires. Certains antibiotiques utilisés dans le domaine vétérinaire sont similaires voir identiques à ceux employés en médecine humaine. Ils peuvent avoir un usage préventif dans l'élevage ou ils peuvent même être employés pour favoriser la croissance (**Servais et Passerat, 2009**). Depuis, l'émergence de bactéries résistantes directement liée à l'utilisation des antibiotiques a été mise en évidence dans de nombreuses études (**Martinez, 2009**).

L'utilisation massive des antibiotiques depuis les années 50, a généré et continue de générer une libération importante de ces molécules dans l'environnement (**Cabello et al., 2006**). La plupart des antibiotiques administrés à l'homme et aux animaux sont partiellement métabolisés ainsi, les résidus d'agents antimicrobiens sont excrétés sous forme de métabolites dans les urines et les fèces ensuite ils sont évacués par les eaux usées dans différents compartiments de l'environnement (**Tamtam et al., 2008**). Ainsi, les antibiotiques et les bactéries résistantes sont excrétés dans les eaux usées via les fèces où ils peuvent atteindre les stations d'épurations (STEP) avant d'être finalement rejetés dans l'environnement. Parce que les STEP peuvent supporter une croissance de forte densité cellulaire, et qu'elles combinent microorganismes résistants et antibiotiques, certains auteurs suggèrent qu'elles pourraient aussi être un endroit propice au transfert de gènes de résistance et à l'émergence de bactéries résistantes (**Geisenberger et al., 1999**). De par sa place stratégique à l'interface entre les activités humaines et l'environnement, la STEP est le dernier rempart avant le rejet de bactéries antibiorésistantes dans l'environnement.

La contamination de l'environnement par les antibiotiques peut survenir de deux manières, la première étant la contamination directe de l'environnement des élevages de bétails et de poissons dans lesquels les antibiotiques sont utilisés. Le deuxième mode de contamination se fait via les égouts. En effet, les antibiotiques utilisés en médecine humaine et leurs métabolites sont évacués dans les égouts et peuvent être retrouvés dans les boues et

les effluents des stations d'épuration, qui peuvent eux-mêmes être utilisés pour l'arrosage ou la fertilisation des terres agricoles. Ces antibiotiques sont ensuite retrouvés dans les eaux de surface ou les eaux souterraines, où ils peuvent favoriser l'émergence des souches bactériennes multi-résistantes (**Laurence et Jarlier, 2013**).

Ainsi, l'environnement hydrique représente un grand réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être transférés aux germes pathogènes cliniques. Cependant, l'utilisation des antibiotiques par l'Homme n'est probablement pas la seule pression sélective pour la résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes naturelles. En effet, la plus part des antibiotiques sont produits par des champignons et des bactéries présentes naturellement dans l'environnement, y compris le sol. La plupart des souches productrices d'antibiotiques portent des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques qu'ils produisent (**Allen et al., 2010**). En effet, quelques études ont montré que les gènes codant pour la β -lactamase CTX-M identifiée chez les patients hospitalisés, est similaire à celle trouvée dans le génome de *Kluyvera spp* qui est une espèce typique de l'environnement aquatique (**Humeniuk et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2004**). Autre exemple, certains gènes de résistance aux quinolones portés par des plasmides (*qnrA, qnrS*) et retrouvés chez des souches pathogènes, ont été décrits dans des chromosomes de bactéries aquatiques appartenant respectivement aux espèces *Shewanella algae*, et *Vibrio splendidus*, soulignant les origines environnementales de ces gènes (**Poirel et al., 2005; Cattoir et al., 2007**). Récemment le gène codant pour la résistance à la colistine d'origine plasmidique *mcr-1* et une BLSE ont été décrit dans les eaux de rivière en Suisse (**Zurfuh et al., 2016**).

Parmi les bactéries isolées à partir des milieux aquatiques, on trouve quelques Gram positif comme les streptocoques et la plupart sont des Gram négatif (**Holder-Franklin et al., 1992**). Les *Enterobacteriaceae* sont connues par leurs transferts de gène que ce soit horizontal ou vertical. Ces transferts, qui s'effectuent par des éléments génétiques mobiles, peuvent aboutir à l'acquisition de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques. Il existe deux types d'éléments génétiques mobiles : ceux qui permettent le transfert de gènes entre différentes molécules d'ADN, comme les séquences d'insertion, les transposons ou les cassettes de gène et ceux qui permettent le transfert d'information génétique d'une cellule à une autre comme les plasmides. Ces éléments génétiques mobiles jouent donc un grand rôle dans l'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques en capturant des gènes et en les transférant d'une molécule d'ADN à une autre, et d'une bactérie à une autre (**Laurence et al., 2013**).

Les carbapénèmes, derniers antibiotique de la famille des β -lactamines, ont une grande stabilité vis-à-vis de la majorité des β -lactamases. Quatre molécules sont actuellement disponibles sur le marché : l'imipénème (Tiénam®) depuis 1986, le méropénème (Méronem®) depuis 1997, l'értapénème (invanz®) depuis 2002, et tout récemment le doripénème (Doribax®) (**Grall et al., 2011**). Les carbapénèmes sont limités à usage hospitalier et prescrits en grande majorité dans le cadre du traitement d'infections nosocomiales (**Nordman et Dortet, 2012**). Les carbapénèmes possèdent un large spectre d'activité *in vitro* contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobie et anaérobie (**Wolff et al., 2009**).

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif conduit à des impasses thérapeutiques. Cette résistance résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous les deux des β -lactamases. Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des protéines transmembranaires qui sont les porines et les systèmes d'efflux (**Martinez, 2008**). Le second mécanisme de résistance aux carbapénèmes est lié à l'expression de β -lactamase à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases (**Queenan et al., 2007 ; Poirel et al., 2007**). Ce dernier mécanisme est le plus inquiétant par le fait que les gènes codant pour ces enzymes sont habituellement situés sur des éléments génétiques mobiles permettant une dissémination rapide. Toutes les espèces d'entérobactéries sont susceptibles d'acquérir des gènes codant pour des carbapénémases, eux-mêmes étant très souvent associés à de nombreux autres gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, générant des souches multi-résistantes (**Grall et al., 2011**).

Les carbapénémases appartiennent aux trois classes connues de β -lactamases (classe A, B, et D de la classification d'Amblar) (**Queenan et al., 2007**).

Les β -lactamases de classe A ont été rapportées dans plusieurs souches d'entérobactéries isolées de l'environnement (*Serratia*, *Enterobacter*), produisant des β -lactamases dont l'activité est inhibée par l'acide clavulanique (**Poirel et al., 2007**). Il existe des carbapénémases de classe A chromosomiques (SME, NMC et IMI) et d'autre de support plasmidique (KPC, GES) (**Walther-Rasmussen et al., 2007**). Elles ont une activité qui est totalement ou partiellement inhibée *in vitro* par l'acide clavulanique, acide boronique et le tazobactam (**Nordmann et Carre, 2010**).

Les β -lactamases de classe B sont des métallo-enzymes (M β L) qui contiennent des ions de zinc dans leur site actif. Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztréonam. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chélate les ions de zinc présents au niveau du site actif (**Walsh et al., 2000**).

Les oxacillinasés sont des pénicillinasés dont le spectre s'est étendu dans certains cas aux C3G et dans d'autres cas aux carbapénèmes. Les bactéries productrices d'oxacillinasés, notamment OXA-48, ont très largement émergé dans tous les pays du pourtour méditerranéen et en Afrique (**Nordmann et al., 2011**).

Des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été largement retrouvées dans des milieux hydriques (**Baquero et al., 2008**). En 2011, le gène *bla*_{NDM-1} était retrouvé au niveau des eaux de surface à New Delhi (**Walsh et al., 2011**). Une autre étude effectuée par Isozumi et ses collaborateurs ont montré également la présence du gène *bla*_{NDM-1} chez *K.pneumoniae* dans la rivière Nguu Kim, au Vietnam (**Isozumi et al., 2012**).

En Algérie, la résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique. En effet ces dix dernières années, ils ont constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les bacilles à Gram négatif. L'isolement des souches d'entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* productrices de carbapénémases reste rare en Algérie. Quelques entérobactéries productrices d'OXA-48 et VIM-19 ont été rapportées, jusqu'à présent, VIM-2 a été identifié chez *P. aeruginosa* (**Baba Ahmed-Kazi et al., 2014**). Recemment un gène VIM-4 a été identifié chez *P. aeruginosa* à l'est de l'Algérie (**Meradji et al., 2016**). Cependant, la situation relative aux souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes aux carbapénèmes semble être plus inquiétante. La carbapénémase OXA-23 est la plus répandue et semble devenir endémique dans le nord du pays (**Baba Ahmed-Kazi et al., 2014**). La carbapénémase NDM-1 a également été isolée pour la première fois chez *A. baumannii* par Boulanger et al. 2012; et Bakour et al. en 2014. L'étude menée par Zenati et ses collaborateurs en 2016 sur l'environnement hospitalier a permis de caractériser des gènes NDM-1 et d'OXA-23 chez des souches d'*A. baumannii*. La description des carbapénémases (OXA-48 et NDM-5) a été rapportée par Yousfi et al. en 2016 chez une souche d'*E.coli* isolée des animaux de compagnie (**Yousfi et al., 2016**).

En Algérie, peu d'études ont été rapportées sur la contamination des milieux hydriques par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Allouache et ses collaborateurs en 2011, ont rapporté pour la première fois la résistance aux antibiotiques des souches isolées d'eaux de mer dans les plages d'Alger (**Allouache *et al.*, 2011**). Habi et Daba. en 2009 ont rapporté la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les souches d'entérobactéries isolées des cours d'eaux en Algérie (**Habi et Daba, 2009**). Mais, jusqu'à présent aucune étude n'a rapporté la résistance aux carbapénèmes dans les eaux de l'environnement en Algérie.

C'est dans ce contexte que nous proposons d'étudier la résistance aux carbapénèmes des souches de bacilles à Gram négatif isolées des différents milieux hydriques de la wilaya de Bejaia. Pour cela, nous avons opté pour la méthodologie suivante :

- Prélèvements des échantillons d'eau à partir des différents milieux hydriques.
- Isolement et purification des BGN.
- Identification des entérobactéries.
- Etude de la sensibilité des souches aux β -lactamines.
- Etude des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

*Matériel et
Méthodes*

I-Prélèvements

Notre étude s'est déroulée durant la période allant de Janvier à Mai 2016 au sein du laboratoire de Microbiologie de l'université A. Mira de Bejaia. 100 prélèvements de différents milieux hydriques ont été effectués dans différentes régions de la wilaya de Bejaia illustrés dans le Tableau ci-dessous :

Tableau I: Nombre de prélèvement par type d'eau

Type d'eau	Régions	Site de prélèvement
<i>Eaux de mer</i>	Bejaia	24
<i>Sources thermales</i>	Tamokra, Adekar, Sidi Aich	03
<i>Eaux de lacs</i>	Bejaia, Akfadou, Timezrith	04
<i>Eaux de barrages</i>	Kherrata, Bouhemza	02
<i>Eaux de puits</i>	Akbou, Bouhemza, Sidi Aich, Adekar, Amizour, El kseur, Tazemalt, Temezrith, Bouhemza, Beni Maouche,	31
<i>Eaux de sources</i>	Kherrata, Bejaia, Sidi Aich Adekar, Bouhemza, Akbou, Derguina, Boukhelifa, Seddouk, Tazemalt, El kseur, Temezrith, Beni maouche, Temezrith, El kseur, Tazemalt	31
<i>Eaux de oueds</i>	Melbou, Beni Maouche, Souk el tenine, Aokas	05
Total		100

II-Conditions d'échantillonnage et de transport

Les prélèvements ont été effectués d'une manière stérile, en introduisant le flacon en verre de 250 ml stérile dans l'eau. L'ouverture et la fermeture du flacon a été faite à l'intérieur pour éviter toute contamination. Les échantillons d'eau prélevés ont été transportés dans une enceinte réfrigérée au laboratoire de Microbiologie après étiquetage (lieu et date de prélèvement) pour analyse.

III- Enrichissement et sélection

Nous avonsensemencé 50 ml d'eau à analyser de chaque échantillon, dans 100 ml de bouillon nutritif auquel nous avons ajouté de l'ertapénème et de la vancomycine à des

concentrations finales de 0.5 µg /ml et de 16µg/ml respectivement. Les flacons ont été incubés pendant 24h à 48h à 37°C.

IV-Isolement et purification

À partir des bouillons d'enrichissement présentant un trouble, nous avons ensemencé la gélose Mac Conkey additionnée d'ertapénème avec une concentration finale de 0,5 µg /ml et de vancomycine avec une concentration finale de 16µg/ml. Puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18h à 24h.

Après 24 h d'incubation, les colonies ont fait l'objet de purification par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à obtention des souches pures.

V-Identification

Une fois la culture est pure, l'identification est faite sur la base :

- Des caractères cultureux (taille, aspect des colonies, couleur, forme).
- La coloration de Gram.
- Tests biochimiques : (Annexe II).
 - Utilisation des sucres sur gélose TSI ;
 - Etude du type fermentaire en utilisant le milieu Clark et Lubs ;
 - Recherche de l'uréase et la TDA en utilisant le milieu Urée indole ;
 - Mise en évidence de la présence de la nitrate réductase dans le bouillon nitraté ;
 - Utilisation du Citrate comme seule source de carbone en utilisant la gélose Citrate de Simmons ;
 - Sur gélose Mannitol mobilité on vérifie la mobilité de la souche et son utilisation du mannitol ;
 - Utilisation du milieu eau péptonée exempte d'indole pour vérifier la production d'indole, incubation à 37et à 44 °C.

VI-Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton selon les recommandations du comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM / EUCAST, 2015).

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu gélosé non sélectif, on prélève à l'aide d'une anse de platine 2 à 3 colonies bien isolées qu'on dissocie dans 5ml d'eau physiologique, bien homogénéiser la suspension bactérienne, sa charge doit être équivalente au standard Mc Farland (correspondant à environ 10^8 UFC/ml). Après une dilution à 10^{-1} de l'inoculum préparé, l'ensemencement est fait par la méthode d'écouvillonnage à la surface du milieu gélosé Muller Hinton.

Après incubation, nous avons mesuré les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) a été faite selon les critères définis par le CA-SFM/ EUCAST, 2015 et CA-SFM, 2013. (Annexe III).

Tableau III: Liste des antibiotiques testés

Antibiotiques	Symboles	Charges (μg)	Familles
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	30	Aminopenicillines
Céftazidime	CAZ	30	C3G
Céfotaxime	CTX	30	C3G
Céfoxitine	CX	30	C2G
Imipénème	IMP	10	Carbapénèmes
Méropénème	MEM	10	Carbapénèmes

VII- Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines

VII-1 Recherche de production de β -lactamases à spectre étendu

➤ DD-test (test de synergie) (Jarlier *et al.*, 1988)

La production d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) a été détectée par le test de synergie qui consiste à placer des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) céftazidime (CAZ) et céfotaxime (CTX) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin (AMC). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'AMC et les disques de CAZ, CTX indique la production d'une BLSE.

VII-2- Recherche de production de carbapénémases

VII-2-1 Test de Hodge (modifié) (Lee *et al.*, 2010)

Un disque de méropénème a été placé au centre d'une boîte de Mac Conkey additionnée de ZnSO₄ (0.75g/l) préalablementensemencée avec une souche d'*Escherichia coli* ATCC25922. Ensuite les souches à tester ont été ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque de méropénème jusqu'à la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif *Klebsiella pneumoniae* UAA2984 et d'un autre négatif *E.coli* ATCC25922.

VII-2-2 Carba NP test modifié (Bakour *et al.*, 2015).

C'est un test biochimique basé sur les propriétés d'acidification générées par l'hydrolyse enzymatique lorsque l'antibiotique (IMP) est clivé par une carbapénémase. Si l'une de ces enzymes est présente, le milieu s'acidifie et l'hydrolyse de l'imipénème est détectée par un changement de l'indicateur de pH (rouge au jaune /orange).

La couleur des tubes vire au rouge à l'orange ou au jaune pour les souches qui produisent des carbapénémases, alors que les tubes correspondants aux isolats bactériens qui ne produisent pas de carbapénémases restent rouge, quel que soit leur niveau de sensibilité aux carbapénèmes. La couleur passe du rouge au jaune après 2h d'incubation. (Protocole annexe IV).

VII-2-3 Test aux inhibiteurs (Birgy *et al.*,2012)

➤ Test à l'EDTA

La production d'une métallo-β-lactamase est vérifiée par l'ajout de l'inhibiteur EDTA. Sur une gélose MH préalablementensemencée avec la souche à tester, 10 µl de la solution EDTA (0,5M, pH8) ont été ajoutés à un disque de méropénème et à un disque vierge pour inhiber l'activité carbapénémase, et un disque de méropénème seul a été déposé au milieu de la boîte de Petri comme témoin pour les trois tests qui ont été effectués dans une même boîte de Petri. Un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque MEM-inhibiteur d'au moins 5mm par rapport au disque de MEM seul.

➤ Test à l'acide boronique

La production d'une KPC est détectée par l'ajout de l'inhibiteur acide boronique. Sur une gélose MH, 20 µl d'acide boronique, a une concentration de 20 mg/ml, ont été ajoutés à un disque de méropénème et à un disque vierge. La production probable d'une KPC se traduit par une différence de diamètre entre le disque de meropénème avec et sans inhibiteur de $\geq 5\text{mm}$.

➤ **Test à la cloxacilline**

La production probable d'une AmpC est vérifiée par l'ajout de l'inhibiteur cloxacilline. Sur une gélose MH préalablementensemencée avec la souche à tester un disque de meropénème et un disque vierge ont été imprégnés de 10 µl de cloxacilline a une concentration de 25 mg/ml. Un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque MEM-inhibiteur d'au moins 5mm comparé au disque de MEM seul.

Résultats

Un total de 100 prélèvements d'eaux ont été collectés, des différents milieux hydriques de la willaya de Bejaia durant la période allant de 23 Janvier au 23 Février 2016. Notre étude s'est déroulée au laboratoire de Microbiologie à l'université d'Abderrahmane MIRA de Bejaia.

I- Souches bactériennes isolées

L'identification des souches isolées sur la base des caractères culturaux, de la coloration de Gram et de la galerie biochimique classique a permis de caractériser 118 souches de BGN.

Une grande partie des souches ont été isolées d'eau des puits (36 souches) et d'eau de mer (30 souches). Suivi par l'eau des sources et l'eau des oueds avec 23 et 14 souches respectivement. C'est à partir des eaux des barrages, lacs et l'eau des sources thermales que nous avons isolé le moins de souches de BGN (01, 05 et 09 souches, respectivement). La répartition de ces souches selon le type d'eau est présentée dans le tableau V annexe VIII.

L'identification des souches isolées a permis de caractériser 118 souches dont 85,59% (101) souches sont des Gram négatif non fermentaires et 14,40% (17) souches sont des bacilles à Gram négatif fermentaires (Figure 1). Sur les 17 souches fermentaires qui ont été isolées, 12 souches parviennent d'eau de mer, 01 souche de source thermale, 02 souches d'eau de source, 01 souche d'eau de puits et 01 souche d'eau des oueds sachant qu'aucune souche fermentaire n'a été isolées d'eau des barrages ni d'eau d

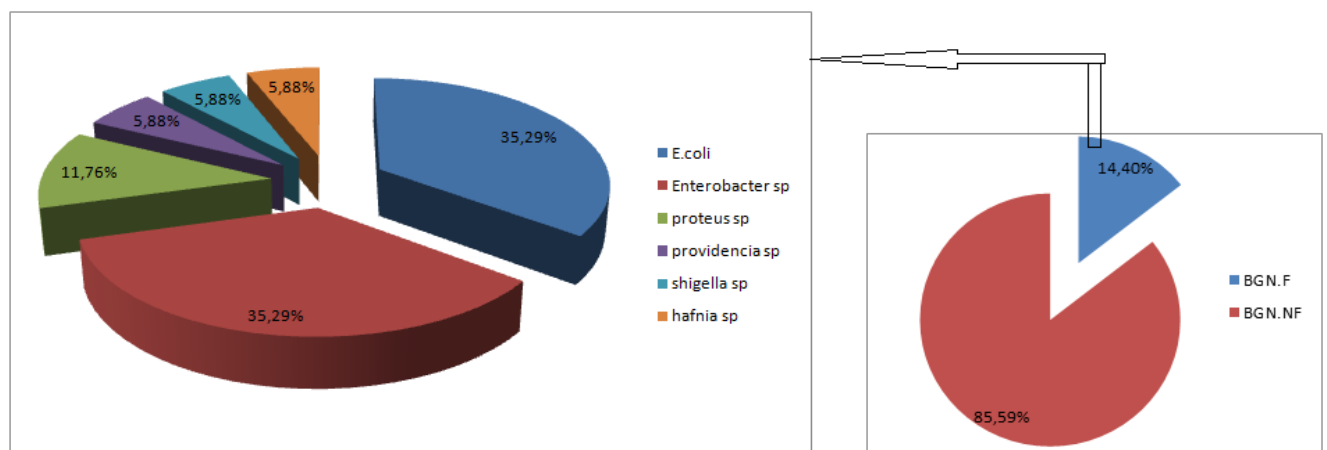


Figure N°1 : Répartition des BGN et des différentes espèces d'entérobactéries isolées.

La figure N°2 ci-dessus montre que parmi la totalité des souches fermentaires identifiées (17), les espèces les plus isolées sont *Enterobacter sp* et *E.coli* avec un taux de 35,29% qui correspond à un nombre de 06/17 souches. Suivi de *Proteus sp* qui a été isolée avec un taux de 11,76% (02/17). Une seule souche de *H.alvei*, *Shigella sp* et *Providencia sp* ont été isolées.

Pour le reste de notre étude, nous nous sommes intéressés uniquement aux souches d'entérobactéries isolées (17souches).

II- Sensibilité des souches d'entérobactéries isolées aux β -lactamines

Les 17 souches d'entérobactéries isolées ont été testées vis-à-vis 6 ATB de la famille des β -lactamines à savoir : IMP, MER, CX, CTX, CAZ, AMC.

La figure N° 2 illustre les taux de résistance des souches étudiées à chacun des six antibiotiques testés de la famille des β -lactamines. La quasi-totalité des souches sont résistantes au CTX avec un taux de 94,11% (16/17), les taux de résistance enregistrées vis-à-vis de l'AMC, IMP, MEM, CX, et CAZ sont de 76,47% (13/17), 52,94% (09/17), 47,05% (08/17), 35,29% (06/17), 23,52% (04/17), respectivement. 12/17 des souches résistantes aux antibiotiques ont été isolées d'eau de mer (Tableau VI Annexe IX).

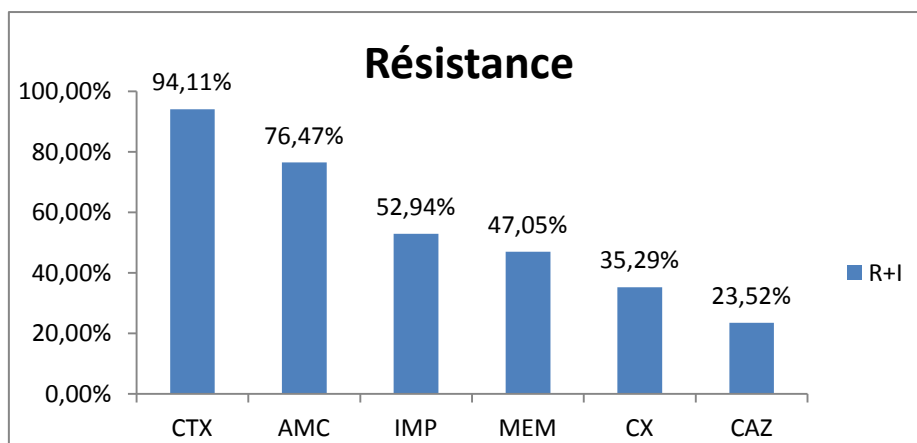


Figure N° 2 : Taux de résistance des Entérobactéries isolées aux β -lactamines.

III- Phénotypes de résistance aux β -lactamines probables

III-1- Recherche des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Aucune image de synergie n'a été observée sur toutes les souches d'entérobactéries, indiquant que la résistance aux C3G des souches isolées n'est probablement pas due à une production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE).

III-2- Recherche de la production de carbapénèmases

III-2-1- Test de Hodge modifié

Le test de Hodge est positif (image de trèfle) pour 03 souches seulement (Figure N°3) indiquant la production probable de carbapénèmases (Tableau III).

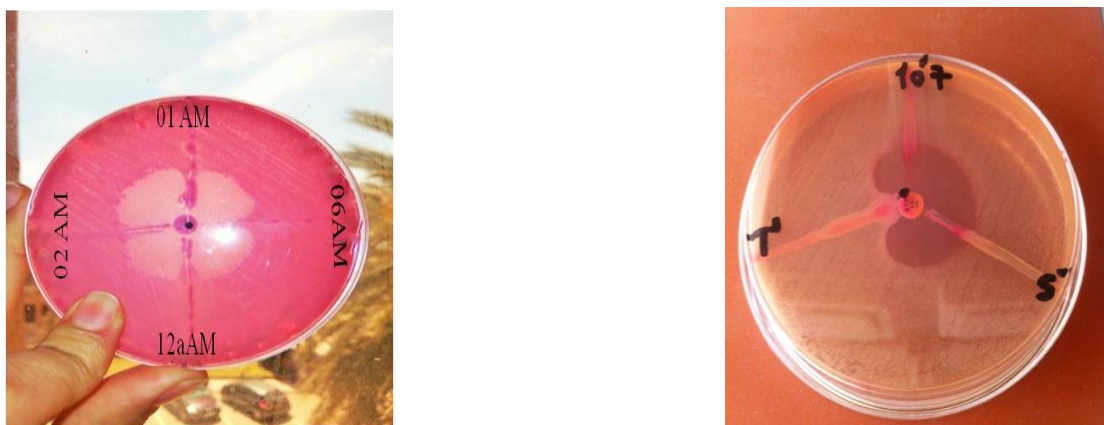


Figure N°3: Résultats du test de Hodge

III.2.1. Carba-NP test modifié

Les résultats du carba-NP test réalisé sur les souches d'entérobactéries, ont révélé la production de carbapénémases chez 07 souches (carba-NP test positif) (figure N°4). Il est négatif chez une souche et non interprétable chez une autre souche (Tableau III).



Figure N°4: Résultat d'un Carba-NP-Test modifié positif

III.2.3. Test des inhibiteurs

Les résultats des tests des inhibiteurs à l'acide boronique et à la cloxacilline sont négatifs (des diamètres inférieurs à 05 mm entre le disque d'antibiotique seuls et les disques d'ATB avec les inhibiteurs ont été observés), donc les souches ne sont pas productrices de β -lactamases de type KPC et AmpC. Le test à l'EDTA est positif pour 01 souche, elle est donc probablement productrice de carbapénémase de type MBL.

Les tests des inhibiteurs sont négatifs pour 07souches résistantes à l'un ou aux deux carbapénèmes testés. Dans ce cas, la résistance aux ces antibiotiques est probablement due à la production de carbapénémases de types oxacillinases (Tableau III).

Tableau III : Résultats des profils de résistance vis-à-vis les antibiotiques testés.

Type d'eau	Région	Lieu de prélèvement	Code de la souche	Espèce	Profil de la résistance	Test de Hodge	Carba-NP test	Test des inhibiteurs			Phénotype probable
								EDTA	AB	CLOX	
Eau de mer	Bejaia	Melbou	01 AM	<i>E.gergoviae</i>	AMC, CTX, IMP, MEM	+	+	-	-	-	Oxacilinase + autre
		Lota2	02 AM	<i>E.gergoviae</i>	AMC, CTX, IMP, MEM	-	+	-	-	-	Oxacilinase+ autre
		Bakarro	06 AM	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, CTX, IMP, MEM	+	+	-	-	-	Oxacilinase+ autre
		Plage de stade	07 AM	<i>Providencia sp</i>	CTX	/	/	/	/	/	/
		Plage Hammadite	08 AM	<i>Proteus sp</i>	CTX	/	/	/	/	/	/
		Acherchour	10 AM	<i>Shigella sp</i>	CTX	/	/	/	/	/	/
		Club hippique	12a AM	<i>E.coli</i>	AMC, CTX, IMP, MEM	+	+	-	-	-	Oxacilinase + autre
			12b AM	<i>E.coli</i>	CTX	/	/	/	/	/	/
		Plage sahel	15 AM	<i>Hafnia alvei</i>	AMC, CTX	/	/	/	/	/	/
		Sidi Ali Iebhar	24A1 AM	<i>E. coli</i>	AMC ; CTX, CAZ, IMP, MEM, CX	-	+	-	-	-	Oxacilinase +autre
			24A2 AM	<i>E. coli</i>	AMC, CTX, CAZ, IMP, MEM, CX	-	+	+	-	-	MBL
24B1 AM	<i>E. coli</i>		AMC, CTX, IMP, MEM	-	+	-	-	-	Oxacilinase + autre		
Eaux des sources	Bejaia	Taouint nsida	04 AM	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, CTX, IMP, CX	-	NI	-	-	-	NI
		Boukhalfa	Tala ainser	15 AM	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, CTX, CAZ, CX	/	/	/	/	/
Eaux des puits	Temzrith	El Mardj	22a AM	<i>E. coli</i>	AMC	/	/	/	/	/	/
Sources thermales	Adekar	Assif el hammam	02 b AM	<i>Enterobacter sp</i>	AMC, CTX, CX	/	/	/	/	/	/
Eaux des oueds	Melbou	Agrioune	04a.AM	<i>Proteus sp</i>	AMC, CTX, CAZ, IMP, MEM, CX	-	-	-	-	-	autre mécanisme

NI : Non Interprétable

Discussion

Durant cette étude nous nous sommes intéressés à la contamination des différents milieux hydriques par des bactéries résistantes aux carbapénèmes, dans différentes régions de la wilaya de Bejaia.

Un total de 118 souches de Bacilles à Gram négatif a été isolé de ces milieux hydriques, dont 85,59% (101 /118) des souches font partie des bacilles à Gram négatif non fermentaires et 14,40% (17/118) des souches appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* et *Enterobacter sp* sont les espèces les plus isolées avec un taux de 35,29% (06/17), suivi par *Proteus sp* avec un taux de 11,76% (02/17). *Providencia sp*, *Shigella sp*, *Hafnia alvei* ont été isolées avec un taux de 5,88% (01/17). Zhang et ses collaborateurs ont rapporté la résistance à plusieurs famille d'antibiotiques des souches BGN isolées des eaux de l'environnement (**Zhang et al., 2009**).

L'étude menée par Falcone-Dias et ses collaborateurs en 2012, a montré que l'eau minérale naturelle contient des bactéries et que ces bactéries sont plus souvent des hétérotrophes aérobies (**Falcone-Dias et al., 2012**). L'étude réalisée par Machado et ses collaborateurs en 2014 sur les eaux des puits de Guinée- Bissau a montré que parmi la totalité des germes isolés, 92% sont des BGN (**Machado et al., 2014**). Coleman et ses collaborateurs ont rapporté la contamination des eaux de source potables Canadienne par des *E. coli* résistants aux antibiotiques (**Coleman et al., 2013**).

La résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées vis-à-vis des β -lactamines testées a révélé que : 94,11% (16/17) des souches sont résistantes au CTX, 76,47% (13/17) à l'AMC, 52,94% (09/17) à l'IMP, 47,05% (08/17) au MEM, 35,29% (06/17) au CX et 23,52% (04/17) à la CAZ. La résistance de ces souches aux antibiotiques a révélé que (12/17) des souches ont été isolé d'eau de mer. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Allouache et ses collaborateurs en 2011, ils ont montré que les souches isolées des 4 plages d'Alger présentaient des taux de résistance élevés vis-à-vis des Aminopenicillines, (C3G) et les carbapénèmes soit des taux de 76 ,4%, 94,1%, 52% ,94% respectivement. Par contre les taux ont été élevés à 97%, 50% pour les cephamycines (CX) et la CAZ respectivement (**Allouache et al., 2011**).

Les taux obtenus dans notre étude sont élevés comparé à ceux rapportés par Servais et Passerat en 2009, lors d'une étude sur la résistance aux antibiotiques des bactéries fécales

dans la rivière de la seine, ils ont obtenu des taux de résistance de 16% pour l'AMC et $\leq 2\%$ pour la CAZ et CTX (Servais et Passert, 2009).

Amaya et ses collaborateurs en 2012, ont identifié une souche d'*E.coli* multi-résistante isolée des différents environnements aquatique dans León, Nicaragua (Amaya *et al.*, 2012). L'étude de Kummerer en 2004, a rapporté la présence d'*E.coli* résistants aux β -lactamines dans les eaux souterraines en milieu rural (Kummerer, 2004).

Dans notre étude, sur les 17 souches d'entérobactéries isolées des eaux de l'environnement de Bejaia, 09/17 présentaient une sensibilité diminuée et/ou résistance à l'IMP et au MEM. Parmi les souches résistantes aux carbapénèmes nous avons identifié 04 souches d'*Enterobacter sp*, 04 souches d'*E.coli*, 01 souche de *Proteus sp*, tandis que les 08 autres souches restantes sont sensibles à ses antibiotiques.

Dans cette étude aucune image de synergie n'a été observée chez toutes les souches isolées, elles sont donc probablement non productrices d'une BLSE. Leur résistance aux β -lactamines testés est probablement due à la production d'une AmpC. En effet, la résistance des *Enterobacter* aux C3G est le plus souvent causé par une hyperproduction de β -lactamase de type AmpC (David et Paterson, 2006). Les souches d'*E. coli* sont naturellement sensibles à toutes les β -lactamines, bien qu'ils ont une céphalosporine chromosomique de classe C qui est exprimée de manière constitutive à très bas niveau (Lavigne *et al.*, 2002).

L'étude réalisée par Allouache et ses collaborateurs en 2011, s'est portée sur la description de la résistance aux antibiotiques des souches isolées d'eaux de mer de 4 plages d'Algérie. Ils ont rapporté la présence des gènes codant pour les β -lactamases à spectre étendu de type CTX-M-15 chez *E.coli* (Allouache *et al.*, 2011).

Le carba-NP test modifié était positif pour 07 souches indiquant la production probable de carbapénémases, le test de Hodge modifié était positif chez 03 souches uniquement. L'interprétation des résultats de ce test peuvent être difficile à cause des faux positifs qui peuvent être observés avec les souches productrices de BLSE ou AmpC plus une imperméabilité (Carvalhaes *et al.*, 2010).

Le test aux inhibiteurs a révélé qu'une souche, (EDTA +), est probablement productrice d'une MBL (fort probablement une NDM-1) et 07 autres souches sont probablement productrices d'oxacillinases (OXA-48). Les carbapénémases de type OXA-48 ont été

rapportées essentiellement dans le pourtour de la Méditerranée et au sud de l'Europe (Nordmann, 2013). En Algérie, deux études rapportent la description d'OXA-48 chez *K. pneumoniae* isolée d'un patient hospitalisé dans le service de pédiatrie de l'hôpital militaire d'Alger (**Aggoune et al., 2014**) et une autre souche de *E. coli* isolée d'un patient au niveau de l'hôpital militaire à Constantine (**Agabou et al., 2014**).

Isozumi et ses collaborateurs en 2012 ont montré la présence du gène *bla*_{NDM-1} chez une souche de *K. pneumoniae* dans la rivière Nguu Kim, au Vietnam, les autres isolats présentent des gènes de types *bla*_{TEM-1} et *bla*_{CTX-3} (**Isozumi et al., 2012**). Une autre étude menée par Aubron et ses collaborateurs en 2005 sur plusieurs rivières Américaines aux USA a permis d'identifier un gène *bla*_{IMI-2} chez une souche d'*Enterobacter* (**Aubron et al., 2005**). En Suisse l'étude réalisée par Zurfluh et ses collaborateurs en 2013, sur des lacs et des rivières a permis d'isoler une souche de *K. pneumoniae* qui contient un gène *bla*_{VIM}, les autres isolats présentent les gènes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} et *bla*_{CTX-M} (**Zurfluh et al., 2013**). Une étude réalisée par Potron et ses collaborateurs en 2011, sur la présence des entérobactéries productrices de carbapénèmes de type OXA-48 dans l'environnement au Maroc a montré une première identification de gène *bla*_{OXA-48} chez une souche de *S. marsecens* (**Potron et al., 2011**). Tacao et ses collaborateurs en 2013 ont montré que l'origine de gène OXA-48 était une souche de l'environnement aquatique de genre *Shewanella* (**Tacao et al., 2013**).

En Algérie, la description de ces enzymes en-dehors des institutions cliniques est rapportée par Yousfi et ses collaborateurs en 2016, ils ont isolés une souche d'*E. coli* productrice d'une association de carbapénèmes de type OXA-48 et NDM-5 chez des animaux de compagnie (**Yousfi et al., 2016**).

Conclusion

Au cours de cette étude, qui s'est déroulée au laboratoire de Microbiologie à l'Université A. Mira de Bejaia. Nous avons étudié la contamination des milieux hydriques par des bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes.

Un total de 118 souches de BGN ont été isolées, parmi lesquelles 17 ont été identifiées comme étant des Entérobactéries réparties comme suit : 06 souches d'*E.coli*, 06 souches *Enterobacter sp.* 02 souches de *Proteus sp.* Une souche de *Providencia sp.*, de *Hafnia alvie* et une autre de *Shigella sp.*

Le profil de résistance des souches d'entérobactéries vis-à-vis la classe des β -lactamines testées, a révélé des taux de résistances élevés aux aminopenicillines, aux céphamycine et aux C3G, et pour la première fois en Algérie, la résistance aux carbapénèmes a été détecté dans l'eau de l'environnement.

Le test de Hodge était positif pour 03 souches (observation d'une image de trèfle) indiquant la production probable de carbapénémases. Le Carba-NP test était positif chez 07 souches signifiant la production de carbapénémases. En effet (07/17) des souches sont probablement productrices de carbapénémases.

L'analyse phénotypique des 09 souches résistantes aux carbapénèmes a montré qu'une souche de *Proteus sp.*, 03 *Enterobacter sp.* et 03 *E. coli* sont producteurs de carbapénémases de classe D (probablement des OXA-48) et une souche de *E. coli* est productrice de carbapénémase de classe B (probablement une M β L) qui est confirmé par le test aux inhibiteurs.

Les résultats de cette étude montrent un degré de contamination des milieux hydrique au niveau de la wilaya de Bejaia par des bactéries résistantes aux antibiotiques notamment des entérobactéries. Cet environnement peut servir de réservoir des bactéries multi-résistantes dans la nature. Cela peut donc constituer une menace pour l'environnement mais aussi pour la santé humaine. Donc la surveillance de l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans le temps et dans l'espace nous permettra d'éviter plusieurs impasses thérapeutiques.

Cette étude rapporte pour la première fois en Algérie la résistance aux carbapénèmes dans l'eau de l'environnement.

Les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploiter et compléter par :

- L'étude d'un grand nombre d'échantillons pour une meilleure détection de contamination de ces environnements.
- Elargissement de l'étude pour toucher toute la flore environnementale, les Gram positif et les bacilles à Gram négatif non fermentaire.
- L'utilisation de la biologie moléculaire pour identifier les gènes qui codent pour les carbapénèmases.

Références bibliographiques

A

1. **Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z, Lezzar N, Khemissi S, Satta D, Sotto A et Lavigne JP.(2014).** First description of OXA-48 producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalized at a military hospital in Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **33**:1641-1646.
2. **Aggoune N, Tali-Maamar H, Assaous F, Benamrouche N, Naim M et Rahal K. (2014).** Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **2**:327-329.
3. **Allen HK, Donato J, Huimi Wang H, Karen A, Cloud-Hansen KA, Davies J et Handelsman J.(2010).** Call of wild : antibiotic resistance genes in natural environments. *Microbiol*. **8**:251-259.
4. **Allouache S, Kada M, Messi Y, Estepa V, Torres C, et Bakour R. (2011).**Antibiotic Resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from sea water of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Envir*. **27**:80-86.
5. **Amaya E, Reyes D, Paniagua M, Calderon S, Rachid MU, Cloque P, Kühn I, Möllby R, Weintraub A and Nord CE.(2012).** Antibiotique resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from aquatic environment sources in León, Nicaragua. *Clinical Microbiology and Infections*.**18**:E347-E354.
6. **Aubron C, Poirel L, Ash JR, Nordmann P. (2005).** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae U.S rivers. *Emerg Infect Dis*. **11** (2):260-264.

B

7. **Baba Ahmed K, Tani Z, Arlet G. (2014).** News of antibiotic resistance among Gram – negative bacilli in Algeria. *Patho Biol*. **62**:169-178.
8. **Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel JM, Gharout-Sait A, Touati A, and Rolain JM.(2015).** Rapid identification of carbapenema-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbs and New Infections*. **7**:89-93.

9. **Baquero F, Martínez JL, et Canton R. (2008).** Antibiotics and resistance in water environments. *Current Opinion in Biotech.* **19**:260-265.
10. **Birgy A, Bidet P, Genel L, Doit C, Decré D, Arlet G, and Bingen E.(2012).** Phenotyping screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology.***10**:1295-1302.
11. **Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S et Nordmann P. (2012).** NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **56**: 2214-2215.

C

12. **Cabello FC.(2006).** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture : a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology.* **8**:1137-1144.
13. **Carvalhas CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE et Gales AC. (2010).** Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**: 249-251.
14. **Cattoir V, Poirel L, Mazel D, Soussy CJ, et Nordmann P. (2007).** *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2650–2651.
15. **Coleman BL, Louie M, Salvadori MI, McEwen S A, Neuman N, Sibley K, Irwin RJ, Jamieson FB, Daignault D, Majury A, Braithwaite S, Crago B, McGeer AJ.(2013).** Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water rech.***47**:3026-3036.
16. **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Communiqué 2015 et 2013.

D

17. **David L, and Paterson MD. (2006).** Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Infection Control* .**34**:20-28.

F

18. **Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, and Manaia CM. (2012).** Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria . *Water research*. **46**:612-3622.

G

19. **Geisenberger O, Ammendola A, Christensen BB, Molin S, Schleifer KH, Eberl L.(1999).** Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. *FEMS Microbiology Letter*. **174**:9-17.

20. **Grall N, Andremont A et Armand-Lefèvre L. (2011).**Resistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?.*Journal des Anti-infectieux*.**16** :16.

H

21. **Habi S, Daba H. (2009).**Plasmid incidence, antibiotic and metal resistance among enterobacteriaceae isolated from Algerian streams .*Pakistan journal of biology science*.**12**:1476-1482.

22. **Holder –Franklin M A, Thrope A et Wuest L. (1992).**Evaluation of tests employed in the numerical taxonomy of river bacteria. *Journal of Microbiology Methods*.**15**:263-277.

23. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A.(2002).** Beta-lactamase of *Kluyvera ascorbata* probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobs Agents Chemother*. **46**(9):3045-3049.

I

24. **Isozumi R, Yoshimatsu K, Yamachiro T, Hasebe F, Nguyen BM, Cuong Ngo T, Yasuda SP, Koma T, Shimizu K, and Arikawa J.(2012).**blaNDM-1 positive *Klebsiella pneumoniae* from Environment , Vietnam .*Emerging infectious Diseases*.**18**:1383-1384.

J

25. **Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, and Philippon A. (1988).** Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.***10**:867-878.

K

26. **Kümmerer K. (2004).** Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.***54**:311-320.

L

27. **Laurence DR et Jarlier V. (2013).**Bacteries multiresistantes dans l'eau : modèles des enterobacteries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu. *Revue francophone des laboratoires* N°460.

28. **Lavigne JP, Sotto A, Merle C, Jourdan J, Soussy CJ et Sirot D. (2002).** Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêta-lactamines et prévalence en clinique. *Pathologie Biologie.***50** :388-393.

29. **Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH, Yum JH, SEO YH, Docquier JD et Chong Y.(2010).**Improved performance of the modified Hodge test with Mac Conkey agar for screening carbapenemases producing Gram negative bacilli .*Journal of Microbiological Methods* .**83**:149-152.

M

30. **Machado A, Bordalo AA. (2014).** Prevalence of antibiotic resistance in bacteria isolated from drinking well water available in Guinea-Bissau (West Africa).*Jrnl of Envir Mangem.***12**:1016-1022.

31. **Martinez JL.(2009).** The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B.* **276**:2521-2530.

32. **Martinez-Martinez L. (2008).** Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection.* **14**: 82-9.

33. **Marti E, Variatza E et Balcazar JL. (2014).**The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* **22**:36-41.
34. **Meradji S, Barquiqua A, Bentaktouk MC, Nayme K, Zerouali K, Mazouz D, Chettibi H, Timinouni M. (2016).** Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. *Burns.* **42**: 4.

N

35. **Nordmann P. (2013).** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of major public health challenge. *Medecine et maladies infectieuses.* **44**:51-56.
36. **Nordmann P et Carrër A. (2010).** Les Carbapénémases des enterobacteries. *Archives de Pédiatrie.* **17** :154-162.
37. **Nordmann P, Dortet L et poirel L. (2012).** Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae here is the storm! *Trends in Molecular Medicine.* **18**: 263–272.
38. **Nordmann P, Naas T et Poirel L. (2011).** Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases.* **17**(10) :1791-1798.

P

39. **Poirel, L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A., et Nordmann P. (2005).** Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3523–3525.
40. **Poirel L, Pitout JD, Nordmann P.(2007).** Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology.* **2**:501-512.
41. **Potron A, Kalpoe J et Nordmann P. (2011).** European dissemination of a single OXA-48 producing *K.pneumoniae* clone. *Clinical Microbiology and Infection.* **17**:24-26.

Q

42. **Queenan AM, Bush K.(2007).** Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical*

Microbiology Rev. **20**(3):440-458.

R

- 43. Rodriguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G.(2004).** Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata* : a possible origin of plasmid-Borne CTX-M-1-Derived cefotaxime.**48**(12):4895-4897.

S

- 44. Servais P, Passerat J.(2009).**Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the seine watershed(France).Science of the Total environment.**408**:365-372.

T

- 45. Tacão M, Correia A, Henriques I.(2013).** Environmental *Shewanella xiamensis* strains that carry bla_{oxa}-48 or bla_{oxa}-204 Genes: Additional proof for bla_{oxa}-48-like Gene origin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**57** :6399-6400.

- 46. Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Tuc Dinh Q, Clément M et Chevreuil M.(2008).** Occurrence and fate antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions.Science of the Total Environnement.**393**:84-95.

W

- 47. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L et Nordmann P. (2005).**Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clinical Microbiology Reviews.**18**:306-325.

- 48. Walther-Rasmussen J et Hoiby N. (2007).**Class A carbapenemases.journal of antimicrobial chemotherapy.**60**:82-462.

- 49. Wolff M, Joly-Guillou ML, et Pajot O. (2009).** Les Carbapénèmes Réanimation.**18** :199-208.

Y

- 50. Yousfi M, Touati A, Mairi A, Brasme L, Gharout-Sait A, Guillar T, De Champs C.(2016).**Emergence of carbapenemases –producing *Escherichia coli* isolated from companion animals in Algeria. Microbiology Drug Resistant.

Z

Références bibliographiques

51. **Zenati K, Touati A, Bakour S, Sahlic F, Rolaina J.M.(2016)**. Characterization of NDM-1 and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. *Multi-drug resistant Gram negative bacteria*.**92**:19-26.
52. **Zhang XX, Zhang T, Fang HHP. (2009)**. Antibiotic resistant genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol*.**82**:397-414.
53. **Zurfluh K, Hächler H, Nüesch-Inderbiden M, Stephan R. (2013)**. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolated from rivers and lakes in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*.**79**:3021-3026.

Annexes

Tableau I: sites des prélèvements par type d'eau

Type d'eau	Régions	Site de prélèvement	Type d'eau	Régions	Site de prélèvement
Eaux de mer	Bejaia	1-Melbou	Eaux des sources	Kherrata	1-Tala ntbabourt
		2-Lota2		Bejaia	2-Dar saquia
		3-Lota1			3-Ain Harrar
		4-Aokas			4-Taouint nsida
		5-Tala Khaled			5-Ain boukhilil
		6-Bakarro			Sidi Aich
		7-Plage de stade		7-Tibane	
		8-Plage Hammadite		Adekar	8-Taourirt
		9-Capritour		Derguina	9-Tadjnante
		10-Acherchour			10-Djrida
		11-El Maghra		Akbou	11-source A
		12-Club hippique			12-Source B
		13-Brise de mer		Bouhemza	13-Tala Ouadda
		14-Boulimat piste1			14-Bardouz
		15-Plage sahel		Boukhelifa	15-Tala ainser
		16-Tazebought			16-Timanachine
		17-Port Tala ilef			17-Tizi ikhlef
		18-Tighremt			18-Ighil ahcen
		19-Saket		Seddouk	19-Tibouamouchine
		20-Oued_dess		Tazemalt	20-Tazemalt
		21-Ache el bazz		El kseur	21-Fenaia A
		22-Boulimat piste2			22-Fenaia B
		23-Les aguades		Temezrith	23-Tala khitebe
		24- Sidi Ali lebhar			24-Ighil amar
Sources thermales	Tamokra	1-Sidi yahia	Beni maouche	25-Ighil outoif	
	Adekar	2-Assif el hammam		26-lachouren	
	Sidi Aich	3-Sillal		27-source	
Eaux des lacs	Bejaia	1-Mezzaia	Tachouaft	28-source	
		2-Tamelaht		29-source	
	Akfadou	3-Lac noir	Tizkht	30-source A	
	Timezrith	4-petit lac		31-source B	

<i>Eaux des barrages</i>	Kherrata	1-Ighil emda	<i>Eaux des puits</i>	Bendjaad	31-Puit
	Bouhemza	2-Tichy haft	<i>Eaux des oueds</i>	Aokas	1-Tala khaled
<i>Eaux des puits</i>	Akbou	1-puit A			2- Tabelout
		2-Puit B		Souk el tenine	3-Boulzazen
	Bouhemza	3-Thiliwa		Melbou	4-Agrioune
	Sidi Aich	4-Tifra		Beni Maouche	5-oued Bousselam
		5-Mezgouge			
	Adekar	6-Taourirt			
	Amizour	7-Amizour			
	El kseur	8-Bouzoulem A			
		9-Bouzoulem B			
		10-Bouzoulem C			
		11-Bouzoulem D			
		12-Bouzoulem E			
		13-Bouzoulem F			
		14-Bouzoulem G			
		15-Fenaia A			
		16-Fenaia B			
	Tazemalt	17-Tazemalt A			
		18-Tazemalt B			
	Temezrith	19-Boussoumer			
		20-Tala khiteb			
		21-Bouzeguén			
		22-El Mardj			
	Tachouaft	23-Puit A			
		24-Puit B			
		25- puit c			
	Djabia	26-Puit A			
		27-Puit B			
	Beni Maouche	28-Puit A			
		29-Puit B			
	Aguemoune	30-Puit			

Tableau I :

Tableau II: Galerie biochimique classique d'identification des souches.

Milieu	Mode d'ensemencement	Caractère recherchés	Résultats
Bouillon nitraté	Ensemencement du milieu avec une suspension bactérienne, et l'incubation est réalisé à 37°C/24h.	-Réduction de Nitrate en Nitrite.	Nitrate réductase + : Virage du milieu au rouge après l'ajout des deux réactifs NR I et NR II. Nitrate réductase - : Virage du milieu au jaune.
TSI	Ensemencement de la pente de la gélose par des stries serrées puis le culot par piqûre centrale et l'incubation est réalisée à 37°C /24h. Le bouchon de tube ne doit pas être trop vissé.	-Lactose. -Glucose. -Saccharose. Gaz. Production d'H ₂ S.	Lactose + : Virage de la couleur de la pente au jaune. Saccharose + : Virage au jaune au milieu de tube. Glucose+ : Virage de culot au jaune. Gaz + : Bulles ou des poches gazeuses qui décalent la gélose de fond de tube. Production d'H₂S : Noircissement du milieu.
Urée-Indole	On prélève quelque colonies à partir d'une culture sur la gélose de ré isolement et on les met dans 1ml du milieu, l'incubation est effectuée à 37 °C /24h.	-Uréase. -Indole. -TDA.	Uréase + : Virage du milieu au rouge/rose. Indole+ : Apparition d'un anneau rouge en surface après l'ajout de quelques gouttes de réactif de Kovacs. TDA+ : Coloration marron du milieu après l'ajout de quelques gouttes de réactif TDA.
Clark et Lubs	Ensemencement du milieu par l'ajout de quelques de la suspension bactérienne au milieu, ne pas vissé le	-type fermentaire.	Test VP+ : Virage au rouge après l'ajout de réactif VP I et VP II. Test RM+ : Coloration rouge après

	bouchon à fond, puis incuber à 37°C /24h.		l'ajout de réactif RM.
Mannitol-mobilité	Ensemencement par piqûre centrale à partir de la suspension bactérienne, l'incubation est réalisée à 37°C/24h.	-fermentation du mannitol. -la mobilité.	Mannitol+ : Coloration jaune de milieu. Mobilité+ : Apparition de la diffusion des bactéries dans la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale.
Citrate de Simmons	Ensemencement de la pente de la gélose par des stries longitudinales, l'incubation est réalisée à 37°C/24h.	-utilisation de citrate.	Citrate + : Virage de milieu au bleu et une culture de colonie sur la pente.

Tableau III: Diamètre des zones d'inhibition édité par le CA-SFM /EUCAS, 2015.

Antibiotiques	Abréviation	Charge (μg)	\varnothing critique (mm)		Concentration critique $\mu\text{g/ml}$	
			S \geq	R <	S \leq	R >
Amoxicilline-Acide clavulanique	AMC	30	19	19	8	8
Cefotaxime	CTX	30	20	17	1	2
Ceftazidime	CAZ	30	22	19	1	4
Imipénème	IMP	10	24	17	2	8
Méropénème	MEM	10	22	15	2	8
Céfoxitine	CX	30	15	19	8	16

Protocole de Carba NP Test Modifié

Les réactifs utilisés sont :

- Imipénème (poudre pour solution injectable IV) ;
- Tampon de lyse :Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) ;
- Rouge de phénol en poudre ;
- ZnSo₄ en poudre.

La solution A (solution contenant l'indicateur de PH) est préparée comme suite :

1. Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0,5% poids/volume.
2. Mélanger 2ml de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16 ,6ml d'eau distillée.
3. Ajouter au mélange 180µl d'une solution de ZnSo₄ 10mM.
4. Ajuster le PH à 7 avec une solution NaOH.

Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suite :

1. Dans un tube eppendorf, mettre 200µl de tampon de lyse (CTAB 0,02%) ;
2. Suspendre une öse calibrée (10µl) des colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer 1à2 minutes ;
3. Transférer la suspension bactérienne dans deux tubes eppendorf (A) et (B) (100µl dans chaque tube) ;
4. Ajouter 100µl de la solution A dans le tube eppendorf (A) ;
5. Ajouter 100µl de la solution A+Imipénème 6mg/ml dans le tube eppendorf (B) ;
6. Vortexer 5sec, puis incubé à 37°C pendant un maximum de 2h (**Bakour et al.,2015**).

Ce test est réalisé en présence d'un témoin positif et négatif pour sa validation.

La lecture visuelle est effectuée dans chaque tube eppendorf et les résultats sont interprétés selon le tableau ci-dessous.

Interprétation des résultats du Craba NP test Modifié.

Tube A	Tube B	Interprétation
Rouge	Rouge	pas de production de carbapénémases
Rouge	Orange/jaune	Production de carbapénémases
Jaune	Jaune	Non interprétable

Tableau IV : la résistance des souches à Gram négatif aux antibiotiques.

Code de la souche	Espèce	Les antibiotiques utilisés											
		AMC		CAZ		CTX		IMP		MEM		CX	
01AM	<i>E. gergoviae</i>	0	R	25	S	25	R	17	R	18	R	20	S
02AM	<i>E. gergoviae</i>	0	R	24	S	24	R	17	R	20	R	20	S
Source 04. AM	<i>Enterobacter sp</i>	15	R	28	S	22	R	0	R	22	S	0	R
06AM	<i>Enterobacter sp</i>	0	R	22	S	23	R	16	R	15	R	21	S
07AM	<i>Providencia sp</i>	19	S	25	S	25	R	28	S	27	S	27	S
8AM	<i>Proteus sp</i>	23	S	21	S	23	R	25	S	22	S	26	S
10AM	<i>Shigella sp</i>	25	S	23	S	23	R	25	S	27	S	30	S
12AMa	<i>E. coli</i>	0	R	21	S	24	R	16	R	19	R	19	S
12AMb	<i>E. coli</i>	27	S	23	S	23	R	25	S	25	S	26	S
15 AM	<i>Hafnia alvei</i>	07	R	22	S	20	R	25	S	22	S	27	S
Source 15.AM	<i>Enterobacter sp</i>	9	R	20	R	18	R	26	S	23	S	0	R
24A.AM1	<i>E. coli</i>	0	R	20	R	19	R	19	R	21	R	11	R
24A.AM2	<i>E. coli</i>	0	R	20	R	20	R	16	R	20	R	12	R
24B.AM1	<i>E. coli</i>	0	R	25	S	21	R	18	R	19	R	19	S
Puit 22a.AM	<i>E. coli</i>	8	R	30	S	30	S	22	S	23	S	30	S
Oued 04a.AM	<i>Proteus sp</i>	0	R	20	R	21	R	14	R	15	R	16	R
ST.AM2b	<i>Enterobacter sp</i>	12	R	23	S	25	R	23	S	27	S	0	R

Composition des milieux de cultures (g/L d'eau distillée).

Gélose nutritive	
Peptone de viande	10
Extrait de viande	03
Extrait de levure	03
Chlorure de sodium	05
Agar	18
PH	7,3±0,2

Gélose Mac Conkey	
Peptone de caséine	17
Peptone de viande	03
Sels biliaries	1,5
Cristal violet	0,001
Lactose	10
Rouge neutre	0,03
Chlorure de sodium	05
Agar	13,5
ZnSo ₄	0,07
PH	7,1±0,2

Milieu Urée-Indole	
Tryptophane	03
Phosphate mono potassique	01
Phosphate bi potassique	01
Chlorure de sodium	05
Urée	20
Alcool à 95	10ml
Rouge de phénol	0,025
PH	07

Gélose Mueller Hinton	
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Infusion de viande	02
Amidon	1,5
Agar	17
PH	7,4±0,2

Gélose TSI (Tryptone sugar and Ion)	
Tryptone	14
Extrait de levure	03
Extrait de viande	03
Glucose	01
Lactose	10
Saccharose	10
Chlorure de sodium	05
Thiosulfate de sodium	0,3
Citrate ferrique ammoniacal	0,3
Rouge de phenol	0,024
Agar	13,5
PH	7,4±0,2

Citrate de Simmons	
Ammonium dihydrogénophosphate	01
Phosphate dipotassique	01
Chlorure de sodium	05
Citrate de sodium	02
Sulfate de magnesium	0,2
Bleu de bromothymol	0,08
Agar	20
PH	6,6±0,1

Clark et lubs	
Peptone	05
Glucose	05
Phosphate bipotassique	05
PH	07

Eau peptonée exempte d'indole	
Peptone exempte d'indole	10
Chlorure de sodium	5

Bouillon nitraté	
Infusion cerveau-coeur	25
Nitrate de potassium	10
PH	7,2±0,2

Mannitol-Mobilité	
Peptone trypsique de viande	10
Nitrate de potassium	01
Mannitol	7,5
Rouge de phenol	0,04
Agar	04
PH	7,6

Réactifs utilisés

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isomylique.....	150 ml
P. diméthylaminobenzaldehyde	10 g
Acide chlorhydrique concentré.....	50 ml

Réactif de TDA (tryptophane désaminase)

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$	10 ml
Eau distillée.....	20ml

Réactif de Voges-Proskauer I (VP I)

α Naphtol.....	6 g
Alcool éthylique à 90%	100 ml

Réactif de Voges-Proskauer II (VP II)

NaOH4N

Rouge de méthyle (RM)

Rouge de méthyle	0,5 g
Alcool éthylique à 60%.....	100 ml

Réactif de Griess I (NR I)

Acide parasulfanilique.....	8 g
Acide acétique 5N	1L

Réactif de Griess II (NR II)

α Naphtylamine.....	6 g
Acide acétique 5N	1L

Tableau VI : nombre de souches résistantes par type d'eau

	AMC	CTX	CAZ	CX	IMP	MEM
Eau de mer	08	12	02	02	07	07
Eau des puits	01	00	00	00	00	00
Eau de source	02	02	01	02	01	00
Source thermale	01	01	00	01	00	00
Eau des lacs	00	00	00	00	00	00
Eau des barrages	00	00	00	00	00	00
Eau des oueds	01	01	01	01	01	01

Tableau V: Le nombre de souches isolées par type d'eau.

Type d'eau	Région	Nombre de souche
Eaux de mer	Melbou, Lota1,Lota2, Aokas ,Tala khaled, Bakarro , Plage de stade ,plage hammadite ,Acherchour ,El maghra, Club hippique, Brise de mer, Plage Sahel, Port tala Ilef, Oued-dess, Ache el Bazz , Sidi Ali lebhar, Aiguades.	30 Souches
Eaux des barrages	Kherrata	01 Souche
Eaux des lacs	Tamelaht, Lac noir	05 Souches
Sources thermales	Sidi yahia, Assif el hammam, sillal	09 Souches
Eaux des sources	Tdjnanate, Tibane, Fenaia, Ighil Ahcen, Ait Bimoune, Beni Maouche, Tachouaft, Bouhemza, Akbou, Taourirth, Tazemalt, Boukhelifa	23 Souches
Eaux des puits	Bouzoulem, Tachouaft, Aguemoune, El Mardj, Tazemalt, Fenaia, Amizour, Sidi Aich, Bouhemza, Taourirt, Akbou, Timezrit, Amalou	36 Souches
Eaux des oueds	Souk el tenine, Aokas, Melbou, Beni maouche,	14 Souches
Total		118 Souches

Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier la résistance aux carbapénèmes des bacilles à Gram négatif isolés des milieux hydrique de la wilaya de Bejaia. Un total de 100 prélèvements d'eau ont été effectués, durant une période d'un mois (de 23 Janvier au 23 Février 2016). L'identification des souches est basée sur la coloration de Gram et la galerie biochimique classique. La sensibilité des entérobactéries aux β -lactamines est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard. La résistance de ces souches aux carbapénèmes est déterminée par différentes méthodes phénotypiques, le DD-test, le carba-NP test modifié, le test de Hodge modifié et le test aux inhibiteurs.

Sur les 100 prélèvements effectués, 118 souches de bacille à Gram négatif sont isolées, 17 souches sont des entérobactéries. La sensibilité de ces souches aux β -lactamines a révélé un taux de résistance élevé au CTX (94,11%) et des taux de 52,94%, 47,05%, 35,29%, 23,52% à l'AMC, IMP, MEM, CX et la CAZ respectivement. Aucune souche n'est productrice de BLSE. D'après les tests phénotypiques on a caractérisé une souche qui est probablement productrice de MBL et 07 souches productrices d'oxacillinase (probablement OXA-48).

Mots clés : Carbapénèmes, Résistance, Bacilles à Gram négatif, Eau d'environnement, Test phénotypiques.

Abstract

The aim of this study was to determine the phenotypes of resistance to β -lactams antibiotics, especially to carbapenem of Gram-negative bacilli isolated from the water environment in Bejaia. A total of 100 water samples were collected during a period of one month (from 23 January to 23 February 2016). The identification of strains is based on Gram stain and classical biochemical gallery. The sensitivity of enterobacteria to β -lactam is carried out by the standard method of the antibiogram. The phenotypes of resistance to β -lactams were determined by the DD-Test, the Hodge test, modified carba-NP test and Combined Disk Test with inhibitors.

118 Gram negative bacilli strains were isolated. Among them, 17 enterobacterial strains. Susceptibility study of β -lactam revealed a high resistance rate to CTX (94.11%) and the rate of AMC, IMP, MEM, CX and CAZ were 52.94%, 47.05%, 35.29%, 23.52% respectively. the phenotypic tests showed that no strain produce ESBL, one strain produce MBL and 07 strains produce an oxacillinase (probably OXA-48).

Keywords: Carbapenems, resistance, Gram-negative bacilli, environment Water, phenotypic test.