

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Vincent LAVIGNE--QUILICHINI

Présentée et soutenue publiquement le 19/10/2020

Etude de la diversité génomique de populations de *Pseudomonas aeruginosa* responsables de pneumopathies chez les patients hospitalisés en Réanimation

Président : Mme Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie

Membres du jury : Dr Lise CREMET, Maître de Conférences Universitaire de Bactériologie,
Dr Jocelyne CAILLON, Maître de Conférence Universitaire de Bactériologie,
Dr. Ronan LE FLOCH, Praticien Hospitaliser en Réanimation Chirurgicale,
Dr Elise PERSYN, Praticien attaché de Bactériologie

Remerciements

A Madame le Professeur Nathalie CAROFF,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Madame le Docteur Lise CREMET,

Pour m'avoir confié ce sujet de thèse pertinent et intéressant. Ta présence et ton soutien tout au long de ce travail m'ont permis d'aboutir à cette thèse. Je suis sincèrement reconnaissant du temps que tu as pu y consacrer.

A Madame le Docteur Jocelyne CAILLON,

Vous m'avez poussé à approfondir mes connaissances théorique et pratique en bactériologie. Vous m'avez également donné de précieux conseils pour ma formation. Je vous témoigne un profond respect et admiration pour votre travail.

A Madame le Docteur Elise PERSYN,

Je te remercie de participer à mon jury de thèse. Ton soutien et ton aide durant ma formation ont contribué à développer mon intérêt pour le domaine de la bactériologie.

A Monsieur le Docteur LE FLOCH Ronan,

Pour avoir accepté sans hésiter d'être membre du jury et d'avoir marqué un profond intérêt pour le sujet.

A ma famille,

En commençant tout particulièrement par ma maman, Pascale. Elle m'a accompagné de son mieux et m'accompagne maintenant à sa manière. Elle est un pilier de mon internat et m'a poussé à toujours me battre.

Mon papa, Philippe, qui reste présent malgré la distance.

Mes frères toujours présents pour animer les débats.

A ma tante, Agnès, qui s'est courageusement investie dans ma thèse alors que ce n'est pas son domaine. Avec Martine, elles ont été une force motrice dans mon quotidien.

A Soizic, ma grand-mère, qui fort de son caractère m'a soutenu.

A Jean-Marc et Caroline, qui m'ont offert un soutien sans faille.

A ma future femme, Jessie,

Sans qui la force et le courage pour réaliser cette thèse m'auraient fait défaut. Son soutien quotidien depuis plus de 5 ans m'a été très précieux pour surmonter les épreuves et y compris celle de la thèse.

A mes amis,

Flore, mon amie toujours présente depuis le collège.

Antoine, qui m'a accompagné durant toutes mes études en tant qu'ami et binôme avec qui je passe de très bons moments. Merci encore pour ta relecture.

Baptiste, Maxime et Mathilde, avec qui j'ai pu m'investir au Tutorat et qui sont restés de proches amis.

Mathieu, mon ami du lycée je sais que je pourrai toujours compter sur toi.

Louise et Louise, indissociables, qui sont également des co-internes précieuses au quotidien pour me supporter.

Claire, pétillante et toujours de bonne humeur.

Martin qui est plein de ressources.

« Mais vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonnes ou de mauvaises situations.

Moi, si je devais résumer ma vie, aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seul chez moi. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres forment une destinée. Parce que quand on a le goût de la chose, quand on a le goût de la chose bien faite, le beau geste, parfois on ne trouve pas l'interlocuteur en face, je dirais le miroir qui vous aide à avancer.

Alors ce n'est pas mon cas, comme je disais là, puisque moi au contraire j'ai pu, et je dis merci à la vie, je lui dis merci, je chante la vie, je danse la vie, je ne suis qu'amour. Et finalement quand beaucoup de gens aujourd'hui me disent : "Mais comment fais-tu pour avoir cette humanité ?" eh bien je leur réponds très simplement, je leur dis : "C'est ce goût de l'amour", ce goût donc, qui m'a poussé aujourd'hui à entreprendre une thèse*, mais demain qui sait ? Peut-être simplement à me mettre au service de la communauté, à faire le don, le don de soi. »

* Dans la tirade du film il est dit « une construction mécanique ».

Edouard BAER dans le rôle d'Otis, Astérix et Obélix : Mission Cléopâtre, 2001.

SOMMAIRE

<u>LISTE DES FIGURES</u>	<u>7</u>
---------------------------------	-----------------

<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	<u>8</u>
----------------------------------	-----------------

<u>ABREVIATIONS</u>	<u>9</u>
----------------------------	-----------------

<u>I. INTRODUCTION</u>	<u>11</u>
-------------------------------	------------------

<u>A. Contexte</u>	<u>11</u>
---------------------------	------------------

<u>B. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	<u>12</u>
--	------------------

1. Généralités	12
2. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence	13
a) Le flagelle et les pili de type IV	14
b) Le lipopolysaccharide	14
c) Les systèmes de sécrétion	16
d) La pyocyanine	18
e) La pyoverdine	19
f) Les protéases	20
3. Le peptidoglycane	23
4. Le <i>quorum sensing</i>	25
a) Généralités	25
b) Voies de régulation	27
5. Le biofilm	29
6. Sensibilité aux antibiotiques	31
a) Résistances intrinsèques : phénotype sauvage	31
b) Acquisition de résistances sous pression de sélection	33

<u>C. Les pneumopathies</u>	<u>39</u>
------------------------------------	------------------

1. Contexte	39
2. Anatomie pulmonaire	39

3.	Physiopathologie	40
4.	Infection pulmonaire par <i>P. aeruginosa</i>	42
5.	Diagnostic	43
6.	Traitement antibiotique des PAVM	44
	a) Traitement antibiotique d'une PAVM	44
	b) Traitement d'une PAVM à <i>P. aeruginosa</i>	46
<u>II. OBJECTIFS DE L'ETUDE</u>		48
<u>III. MATERIELS ET METHODES</u>		49
<u>A. Souches bactériennes étudiées</u>		49
1.	Sélection des LBA (souche de <i>P. aeruginosa</i>)	49
2.	Dépistage phénotypique à partir des cultures de LBA	49
3.	Sélection des isolats pour le séquençage de génome entier	50
<u>B. Méthodes</u>		51
1.	Réalisation d'antibiogrammes	51
2.	Séquençage à haut-débit et mise en évidence des mutations génétiques	51
3.	Analyse de l'effet des mutations génétiques	52
<u>IV. RESULTATS</u>		53
<u>A. Caractéristiques des patients</u>		53
<u>B. Sensibilité aux antibiotiques</u>		57
1.	Résultats rendus par le laboratoire en routine à partir d'une colonie	57
2.	Résultats des tests phénotypiques	59
3.	Antibiogrammes complémentaires à partir des populations	60
4.	Adéquation des antibiothérapies administrées	63
	a) Traitement probabiliste	63
	b) Traitement documenté	64
<u>C. Analyse génomique des populations</u>		66
<u>V. DISCUSSION</u>		71

<u>VI. CONCLUSION</u>	79
------------------------------	-----------

<u>VII. BIBLIOGRAPHIE</u>	81
----------------------------------	-----------

<u>VIII. ANNEXES</u>	90
-----------------------------	-----------

<u>A. Annexe 1 – Antibiothérapie d’une infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / HAS 04/06/2019</u>	90
--	-----------

Liste des figures

FIGURE 1 – FACTEURS PATHOGENES DU PSEUDOMONAS AERUGINOSA (1).....	13
FIGURE 2 – ORGANISATION DU LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) (10)	15
FIGURE 3 – SYSTEMES DE SECRETION EXISTANTS CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA (11)	16
FIGURE 4 – MECANISME D’ACTION DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III (7).....	18
FIGURE 5 – ROLE DE LA PYOVERDINE (20)	19
FIGURE 6 – MECANISMES D’ACTIONS DES PROTEASES (7)	21
FIGURE 7 – RECYCLAGE DU PEPTIDOGLYCANE (26).....	23
FIGURE 8 – MECANISMES DE VIRULENCE DU PSEUDOMONAS AERUGINOSA (4).....	25
FIGURE 9 – REGULATION DU QUORUM SENSING (28).....	28
FIGURE 10 – CYCLE DE FORMATION DU BIOFILM (13)	29
FIGURE 11 – MECANISMES DE RESISTANCE INTRINSEQUES ET ACQUIS (5).....	32
FIGURE 12 – MECANISME D’INDUCTION D’AMPc PAR LES B-LACTAMES (47)	34
FIGURE 13– MECANISMES DE DEREPRESSION D’AMPc (47)	35
FIGURE 14 – SCHEMA D’ACTIVATION ET INHIBITION D’AMPc EN LIEN AVEC LE RECYCLAGE DU PEPTIDOGLYCANE (50)..	36
FIGURE 15 – PHENOTYPES DE RESISTANCE EN FONCTION DU MECANISME (51)	38
FIGURE 16 – MECANISME DE DEFENSE IMMUNITAIRE DES VOIES AERIENNES(1)	40
FIGURE 17 – INFECTION PULMONAIRE PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA (8).....	42
FIGURE 18 – PROBABILITE D’EFFICACITE DU TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE EN FONCTION DU GERME (65)	46
FIGURE 19 – COURBE DE SURVIE EN FONCTION DU TRAITEMENT PAR MONOTHERAPIE, BITHERAPIE OU ANTIBIOTHERAPIE INADAPTEE (64).....	47
FIGURE 20 – ILLUSTRATION DU LOGICIEL SNAP ²	52
FIGURE 21- REGULATION D’AMPc PAR LE SYSTEME CREBC (73).....	74

Liste des tableaux

TABLEAU 1 – RECAPITULATIF DES DIFFERENTS FACTEURS DE VIRULENCE DE P. AERUGINOSA.....	22
TABLEAU 2 – PNEUMONIES ASSOCIEES AUX SOINS DE REANIMATION (2017- SFAR)/ PROTOCOLE DE SOIN N°4 SUGGERE PAR LES EXPERTS : SCHEMAS THERAPEUTIQUES (AVIS D’EXPERTS) (62).....	45
TABLEAU 3 – ISOLATS SEQUENCES.....	50
TABLEAU 4 – DESCRIPTION EPIDEMIOLOGIQUE.....	54
TABLEAU 5 – PRISE EN CHARGE ANTIBIOTIQUE A PARTIR DES RESULTATS CLINIQUES.....	56
TABLEAU 6 – ANTIBIOGRAMME DES ISOLATS CLINIQUES.....	58
TABLEAU 7 – RESULTATS DES TESTS DE DEPISTAGE POUR DETECTER L’HETEROGENEITE DE POPULATION BACTERIENNE .	60
TABLEAU 8 – ANTIBIOGRAMMES COMPLEMENTAIRES.....	61
TABLEAU 9 – SYNTHESE DES MUTATIONS.....	67

Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNe :	ADN extracellulaire
ADPRT :	Activité ADP-ribosyl-transférase
anhydro-MurNAc :	Anhydro-muropeptides
ATB :	Antibiotique
BGN :	Bacille gram négatif
BLSE :	β -lactamase à spectre étendue
BMR :	Bactérie multi-résistantes
BPCO :	Bronchopneumopathies chroniques obstructives
BSL :	C4-HSL
C3G :	Céphalosporines de 3ème générations
CD	Cluster de différenciation
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
DDB :	Dilatation des bronches
ECBC :	Examen cytbactériologique des crachats
EF-2 :	Facteur d'élongation 2
EPS :	Exopolysaccharidique
EUCAST/CASFM :	European committee on antimicrobial susceptibility testing/ Comité de l'antibiogramme - Société française de microbiologie
ExoA :	Exotoxine A
ExoS :	Exoenzyme S
ExoT :	Exoenzyme T
ExoU :	Exoenzyme U
ExoY :	Exoenzyme Y
FPM :	Faible poids moléculaire
GAP :	Activité GTPase sur l'extrémité N-terminale
HPM :	Haut poids moléculaire
HSL :	3-oxo-C12-homosérine lactone
IL :	Interleukine
IM :	Membrane interne

IMP :	Imipenemase
kDa :	kilo-Dalton
LasA :	Staphylolysine
LasB :	Elastase
LBA :	Lavage broncho-alvéolaires
LPS :	Lipopolysaccharide
Mbp	Millions de paires de bases
MLST	MultiLocus Sequence Typing
mpl :	murein peptide ligase
MupP :	MurNAc-6P phosphatase
NAG :	N-acétyl-glucosamine
NAG-anhydro-MurNAc :	N-acétylglucosamide-anhydromuropeptides
NAM :	N-acétyl-muramique
OM :	Membrane externe
PAC :	Pneumonie aiguë communautaire
PAH	Pneumonies acquises à l'hôpital
PAVM :	Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique
PD :	Pharmacodynamique
PIV :	Protéase IV
PK :	Pharmacocinétique
PLP ou PBP :	Protéines liant les pénicillines
PQS :	2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone
QS :	Quorum sensing
QS- :	Déficience en Quorum Sensing
QS+ :	Quorum sensing intact
RFE :	Recommandations formalisées d'expert
SARM :	S. aureus résistant à la méticilline
SDRA :	Syndrome de détresse respiratoire aigu
SP :	Surfactant
SST :	Système de sécrétion de type
TLR :	Toll-like receptor
UDP-MurNAc-P5 :	5-pyrophosphoryl-N-acetylmuramic acide-pentapeptide
UFC :	Unité formant colonie
VIM :	Verona Intergen-encoded Metallo-β-lactamase

I. Introduction

A. Contexte

Pseudomonas aeruginosa appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. C'est l'espèce la plus impliquée en pathologie humaine. Cette bactérie ubiquiste, fréquemment rencontrée dans l'environnement humide proche des malades, exerce son pouvoir pathogène grâce à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires (pili, adhésines non-piliées, flagelle, lipopolysaccharide, alginate) et extracellulaires (protéases, exotoxines, exoenzymes, hémolysines, phospholipase...). *P. aeruginosa* possède le plus grand génome séquencé parmi les génomes bactériens publiés (6,3 millions de paires de bases). Cet équipement génétique, relativement similaire d'une souche à l'autre (90 % environ) est doté d'un grand nombre de gènes de régulation, il reflète la forte capacité d'adaptation de ce pathogène opportuniste à son environnement et aux défenses naturelles de l'hôte (1).

Le bacille pyocyanique ou *Pseudomonas aeruginosa* représente, avec le staphylocoque doré, la cause la plus fréquente d'infections en réanimation. Cet agent pathogène se situe au premier rang parmi les agents infectieux responsables de pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM), représentant ainsi 20 % des microorganismes isolés en 2016, selon le dernier rapport du réseau REA-Raisin (2). Les PAVM représentent la complication infectieuse la plus fréquente en réanimation et la principale cause d'administration d'antibiotiques.

Sous la pression de sélection d'antibiothérapies, cet agent pathogène développe très souvent une multirésistance aux antibiotiques, notamment aux carbapénèmes, classe à large spectre et de dernier recours dans l'arsenal thérapeutique des cliniciens. L'OMS, qui a fait de la lutte contre la résistance aux antibiotiques un des combats majeurs dans le domaine de la Santé, a placé *P. aeruginosa* sur liste numéro 1 (priorité critique) pour la recherche de nouvelles thérapeutiques anti-infectieuses. D'après plusieurs études récentes, la mortalité hospitalière associée aux PAVM à *P. aeruginosa* avoisine les 40 % et la détection de souches multi-résistantes est un facteur indépendant d'allongement de la durée de séjour et du délai de sevrage de la ventilation mécanique.

B. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Généralités

C'est un bacille à Gram négatif, oxydase positive, non fermentant le glucose, aérobic strict, mobile via un flagelle polaire. Cette bactérie non exigeante se développe sur des géloses ordinaires en 24-48h en produisant des pigments (pyoverdine, pyocyanine). Les colonies ont souvent des reflets métalliques et une odeur florale de seringat.

Pseudomonas aeruginosa est un germe saprophyte de l'environnement (1). Ubiquitaire, il se retrouve sur les sols, eaux et végétaux, de préférence en atmosphère chaude et humide. Il peut se trouver de manière transitoire sur la peau et plus particulièrement sur les muqueuses. D'abord responsable d'une colonisation, il peut ensuite devenir pathogène sous certaines conditions et principalement dans un contexte d'immunodépression. Du fait de sa grande capacité d'adaptation et de survie et de ses différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (naturels et acquis), le *P. aeruginosa* est une bactérie non négligeable dans les services cliniques. Le traitement des infections dont il est responsable nécessite souvent une association d'antibiotiques à large spectre, bactéricides et synergiques.

P. aeruginosa est la 3ème cause d'infections nosocomiales (3). Il est principalement responsable d'infections associées à du matériel, chez des sujets âgés et/ou immunodéprimés.

Parmi les principaux facteurs favorisant l'infection à *P. aeruginosa* figurent (4) :

- Une altération de la barrière épithéliale (brûlés, cicatrices post-opératoires, plaies chroniques),
- Inflammation chronique (Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), Dilatation des bronches (DDB) ou mucoviscidose),
- Les dispositifs implantables ou matériels étrangers tels que les chambres implantables, les cathéters ou les sondes,
- Une altération locale de l'immunité innée/adaptative.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie contaminant les surfaces de travail et du matériel. Elle possède des résistances naturelles aux antiseptiques. Elle est capable de survivre sur des surfaces et en conditions qui ne lui sont pas favorables, grâce à la production de biofilm. *P. aeruginosa* est donc souvent retrouvé comme contaminant du matériel. Le plus souvent, cette contamination est liée à une défaillance des procédures de nettoyage des surfaces et du matériel (5).

2. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

P. aeruginosa est responsable d'infections aiguës et chroniques. Il a été mis en évidence qu'entre ces 2 types d'infections, il ne présente pas le même phénotype, ni le même génotype (6).

Dans le contexte d'une infection aiguë, ses facteurs de virulence (flagelle polaire et ses pili de type IV) lui permettent de se déplacer. De plus, la sécrétion de toxines favorise l'invasion tissulaire (Figure 1).

Lors de l'évolution vers l'infection chronique, son système de régulation génétique (correspondant principalement au *quorum sensing* (QS)) va lui permettre de s'adapter. Il va exprimer des facteurs responsables d'une réponse inflammatoire moins importante et favorisant le développement d'un biofilm.

C'est l'exemple des patients atteints de mucoviscidose, porteurs de *P. aeruginosa* sur le long terme. Ils sont porteurs d'une même souche qui va muter pour former des sous-populations aux comportements différents. Les mutations apparaissent le plus souvent dans les systèmes de régulation (QS), les systèmes de réparation de l'ADN, des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Elles vont favoriser la survie et le fitness du bacille pyocyanique dans les poumons des patients. De manière sporadique, des exacerbations vont avoir lieu ce qui reflète la communication et la coopération de ces sous-populations dans l'infection chronique.

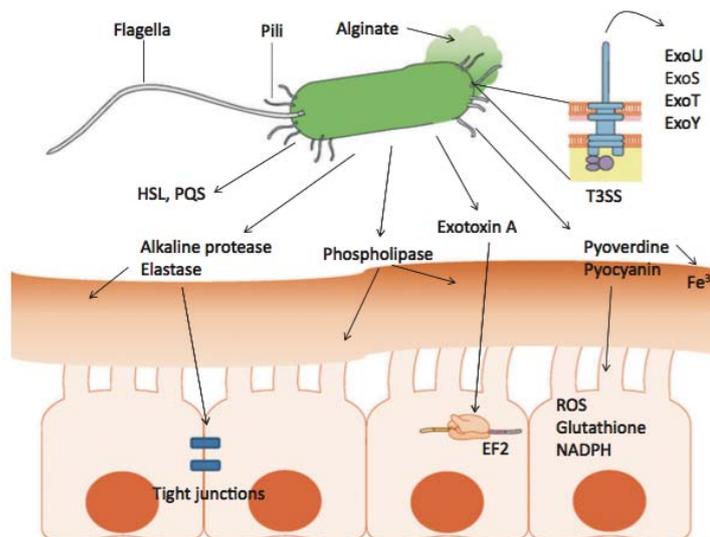


Figure 1 – Facteurs pathogènes du *Pseudomonas aeruginosa* (1)

a) *Le flagelle et les pili de type IV*

Une des caractéristiques de virulence du *P. aeruginosa* est sa capacité à se déplacer et à adhérer aux surfaces. Il possède un flagelle polaire qui est essentiel pour sa mobilité et sa pathogénicité. Il assure le déplacement avec un mouvement de tire-bouchon rotatif. Ce flagelle est associé à des adhésines et principalement aux pili de type IV qui lui permettent d'adhérer à l'épithélium. Ces pili se fixent comme des grappins à la paroi des cellules et permettent à la bactérie de se déplacer par un mouvement d'extension/rétraction, appelé « twitching motility ». Ce phénomène permet de faciliter l'infection des voies aériennes (7). Le flagelle et les pili de type IV se lient sur des glycosphingolipides et des protéoglycanes. Ces composés se trouvent majoritairement sur les cellules immatures ou endommagées (8). Ce sont des facteurs de virulence importants, puisqu'il a été démontré sur modèles animaux, que la perte de ces facteurs entraînait une diminution de la virulence des souches (7).

b) *Le lipopolysaccharide*

Le lipopolysaccharide (LPS) est un glycopeptide de surface complexe qui se trouve sur la membrane extérieure des bactéries. Le LPS joue un rôle dans la virulence et la résistance aux antibiotiques. Il est composé de 3 parties. La première correspond au lipide A. La troisième partie, très spécifique et constituée d'un enchainement de polysaccharides, est appelée l'antigène O. Entre les 2 se trouve le core constitué d'un oligosaccharide ramifié de 9 à 10 sucres (Figure 2).

Le lipide A est un disaccharide ancré à la membrane extérieure qui a un rôle pro-inflammatoire important. Il peut en effet se lier aux corécepteurs MD2, CD14 et TLR4 (toll-like receptor 4), activer la voie NFκB et entraîner la libération de cytokines et chimiokines pouvant conduire à un choc endotoxinique. En général, plus le lipide A présente des acétylations et des phosphorylations, plus il est susceptible d'induire une réaction inflammatoire importante via les TLR4. Dans le contexte de la mucoviscidose, le lipide A du *P. aeruginosa* est souvent hexa- voir hepta-actétylés alors qu'il est penta-actétylé sous sa forme « sauvage » (9). La partie lipide A-core est associée dans 15 % des cas à l'antigène O (1).

L'antigène O est un polysaccharide qui peut être composé d'un à une centaine de sucres. Il en existe 2 grands types différents en termes de structure et de sérologie. L'antigène O « O-commun » (ou A-band) est un homopolymère de D-rhamnose d'environ 70 sucres de long et qui provoque une

faible réponse des anticorps. Par opposition, le « O-spécifique » (ou B-band), est un hétéropolymère dont la longueur est variable et la nature des sucres varie en fonction de la souche. Il provoque une forte production d'anticorps et constitue la base chimique du sérotypage. Très probablement lié à cette différence de réaction du système immunitaire, il est constaté que dans le contexte de mucoviscidose, le O-spécifique diminue au profit du O-commun (1).

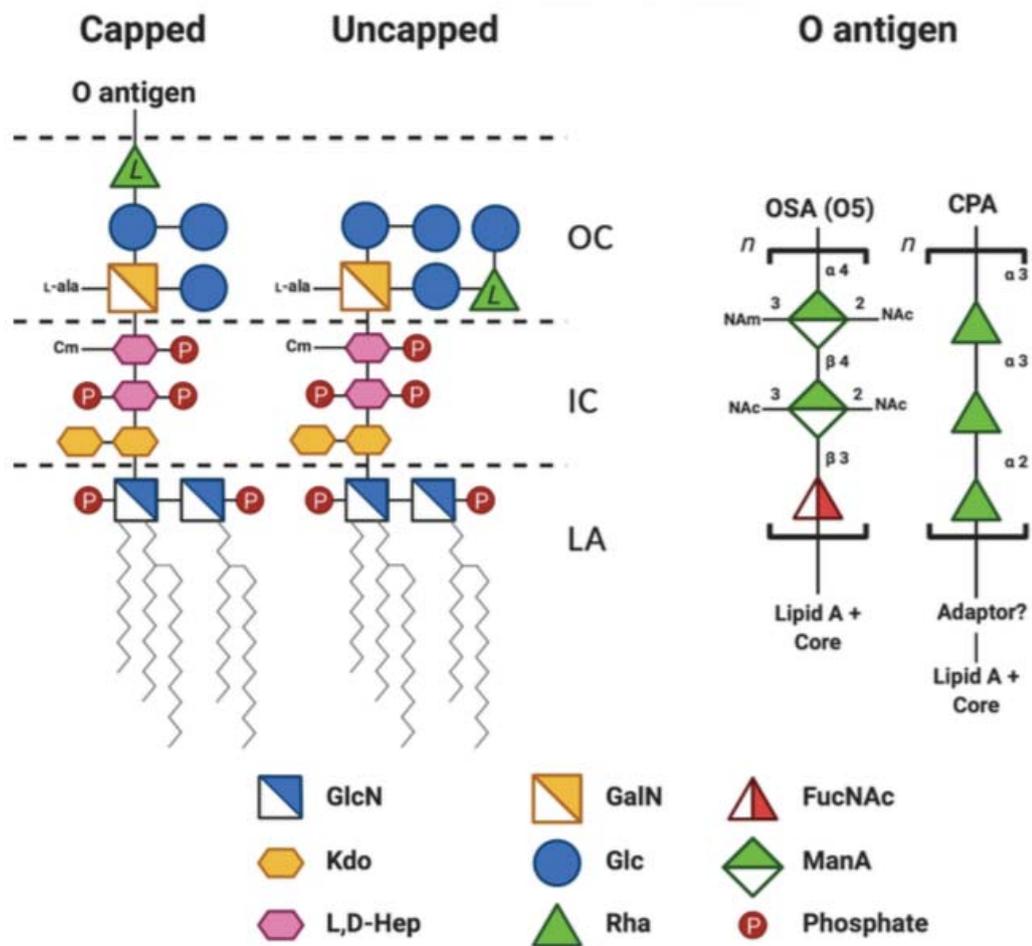


Figure 2 – Organisation du lipopolysaccharide (LPS) (10)

Simplified chemical structure of *P. aeruginosa* PAO1 (serotype O5) lipopolysaccharide. The structure is adapted from several studies [12-17] and coloured according to the Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) [18,19]. A more detailed review of the chemical structure of *P. aeruginosa* LPS can be found in [17]. The lipid A-core region can be capped (or not) with a variable number of O antigen repeats. The predominant penta-acylated lipid 1 structure is shown.

c) Les systèmes de sécrétion

P. aeruginosa possède différents systèmes de sécrétions participant à sa virulence. Chez les bactéries à Gram négatif (BGN), les protéines sécrétées doivent passer au travers de 2 barrières lipophiles, correspondant à la membrane interne (IM) et la membrane externe (OM), séparées par un espace périplasmidique hydrophile contenant le peptidoglycane. Six types de systèmes de sécrétion (SST) (I à VI) vont permettre le passage des facteurs de virulence au travers de ces membranes (Figure 3). A l'exception du système de type IV, ils sont tous présents chez *P. aeruginosa*. Ils sont classés en 2 grandes catégories : la première permet la sécrétion à l'extérieur de la cellule bactérienne (espace extracellulaire), la deuxième s'apparente à un système d'aiguille qui pénètre à l'intérieur même de la cellule de l'hôte pour pouvoir y injecter directement les facteurs de virulence. Les principaux SST responsables de la virulence de *P. aeruginosa* sont le SST II et le SST III.

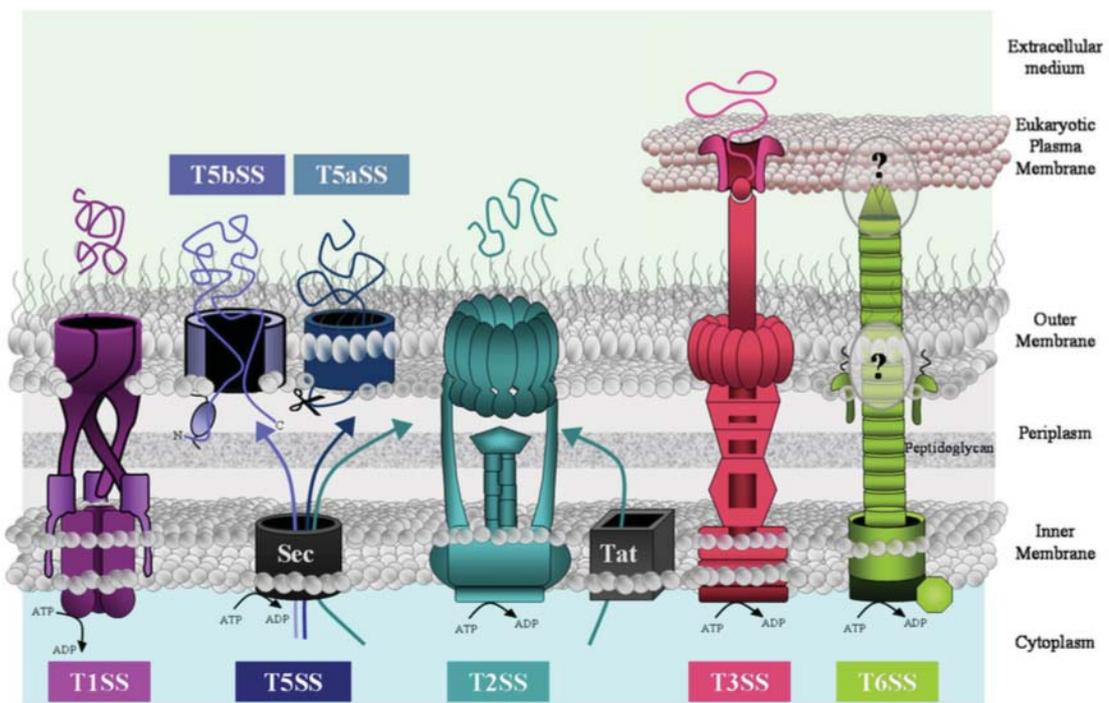


Figure 3 – Systèmes de sécrétion existants chez *Pseudomonas aeruginosa* (11)

Le SST II permet de libérer dans l'environnement extracellulaire des toxines dont l'exotoxine A (ExoA), des élastases (LasB et LasA), des lipases et des protéases. Ce système de sécrétion est sous contrôle direct du QS (voies LasR/I et RhIR/I) (11).

Le SST III permet l'injection de protéines toxiques directement à l'intérieur du cytosol des cellules de l'hôte à l'aide d'un système comparable à une aiguille. L'interaction entre la cellule et la bactérie est primordiale pour ce mécanisme de virulence (11). Les principaux effecteurs sécrétés sont l'exoenzyme S (ExoS) et l'exoenzyme U (ExoU) qui sont mutuellement exclusifs (12). Il permet aussi la sécrétion de l'exoenzyme Y (ExoY) et l'exoenzyme T (ExoT) (Figure 4).

L'ExoU est la plus virulente des 4 cytotoxines sécrétées par le SST III. Elle a une activité phospholipase de type A2 responsable d'une lyse cellulaire rapide des cellules épithéliales, macrophages et polynucléaires neutrophiles (13).

L'ExoS, moins virulente, est une protéine bifonctionnelle. D'un côté, elle inhibe la mobilité et la phagocytose (14) par son activité GTPase sur l'extrémité N-terminale (GAP) des protéines. Cela altère le cytosquelette (cible les protéines de la famille Rho), pouvant même induire la mort cellulaire par apoptose *in vitro* (15) et *in vivo* (16). De l'autre, elle possède une activité ADP-ribosyl-transférase (ADPRT) sur l'extrémité C-terminale des protéines de la famille Ras (17). Son activité va être responsable d'une perturbation de l'organisation du cytosquelette, d'une diminution de la synthèse d'ADN, d'adhésion cellulaire et de viabilité (12). L'activité ADPRT de l'ExoS est celle qui contribue le plus à sa virulence (12).

Il est considéré que l'ExoU est 100 fois plus cytotoxique que l'ExoS, malgré le fait que les toxines soient mutuellement exclusives. Elle peut entraîner la mort cellulaire par une action nécrotique liée à la destruction de la membrane (18).

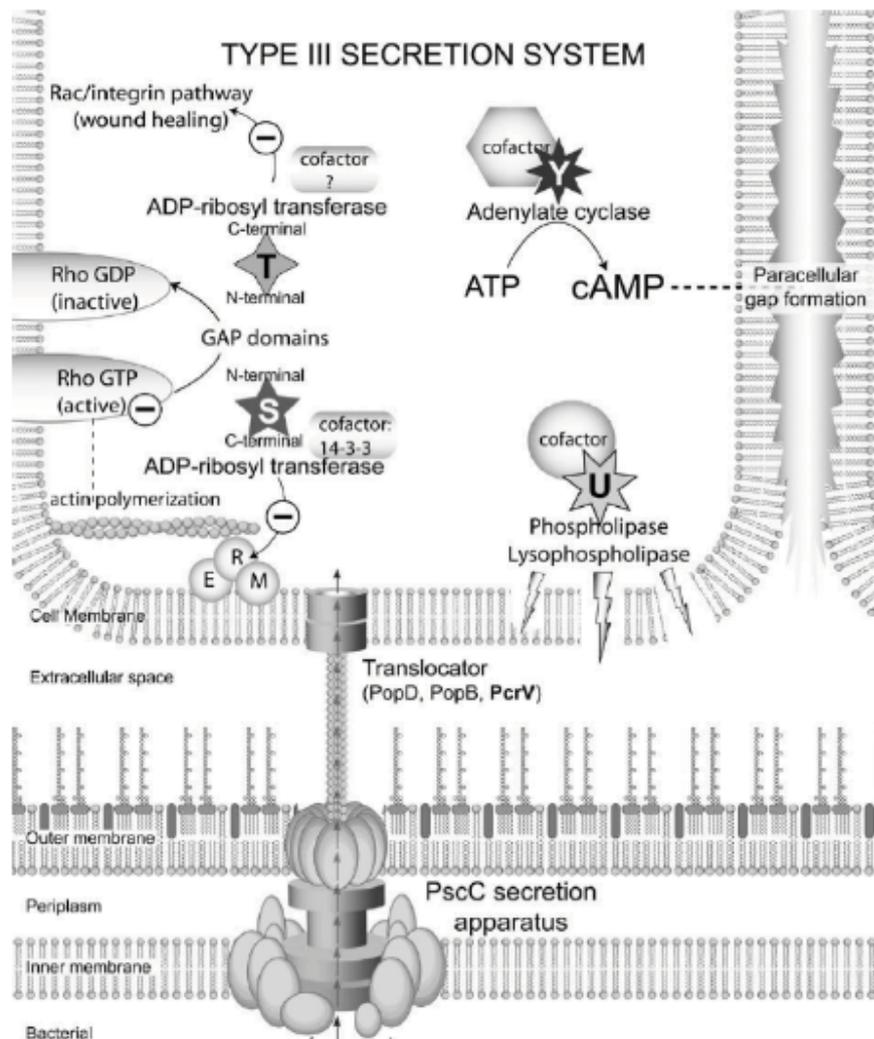


Figure 4 – Mécanisme d'action du système de sécrétion de type III (7)

d) *La pyocyanine*

La pyocyanine est une protéine de type phénazine de couleur bleue qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa*. Elle possède des propriétés oxydo-réductrices avec un effet oxydant sur le glutathion et une inactivation de la catalase des cellules épithéliales. Cela a pour effet d'augmenter les espèces réactives de l'oxygène et ainsi de favoriser le stress oxydatif et la nécrose tissulaire. Elle perturbe la réaction immunitaire en augmentant la sécrétion d'IL-8, mais entraîne globalement une diminution de la réponse de l'hôte et l'induction de l'apoptose des neutrophiles (7).

e) *La pyoverdine*

La pyoverdine est un pigment de couleur verte qui joue le rôle de sidérophore. Elle permet de capter le fer dans l'environnement extérieur du *Pseudomonas aeruginosa*. Ce nutriment est indispensable à la virulence du bacille pyocyanique et permet une évolution vers l'infection chronique (19). De plus, il a été mis en évidence que la pyoverdine intervenait dans la régulation d'au moins 3 facteurs de virulence : l'exotoxine A, une endoprotéase et la pyoverdine elle-même (Figure 5) (20). Ce sidérophore est régulé par le QS et en particulier par la voie *LasR/I* (8).

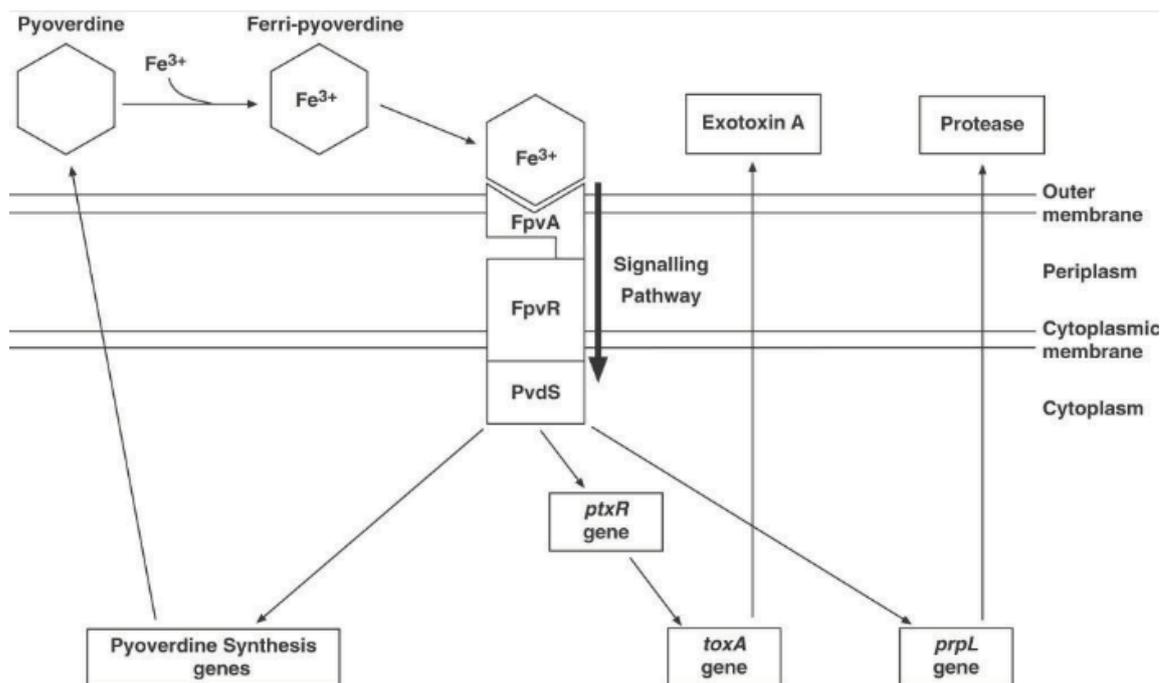


Figure 5 – Rôle de la pyoverdine (20)

f) Les protéases

P. aeruginosa produit différentes protéases, dont certaines jouant un rôle important dans les infections oculaires ainsi que dans les bactériémies. Elles peuvent dégrader les immunoglobulines, la fibrine et détruire les jonctions serrées entre les cellules épithéliales (1). Les principales protéases sont : la protéase alcaline, les élastases LasA et LasB, la sérine protéase appelée protéase IV, l'exotoxine A et la phospholipase C (Figure 6).

La protéase alcaline (AprA) est sécrétée par le SST I et permet de lyser la fibrine (7). Elle peut aussi interférer avec l'activation du complément et empêcher l'opsonisation de la bactérie par le complément (21). Elle peut potentiellement bloquer la phagocytose et la lyse par les polynucléaires neutrophiles (21).

LasA et LasB, respectivement appelées staphylolysine et élastase, sont les 2 principales élastases produites par *P. aeruginosa*. Elles sont régulées par le QS (LasR/I) et sécrétées par le SST II.

LasA est une sérine protéase capable d'hydrolyser des ponts penta-glycine présents dans le peptidoglycane de la paroi des staphylocoques. Son rôle principal est d'agir en synergie avec LasB. L'élastase LasB est une métalloprotéase qui possède une activité protéolytique plus importante. Elle a notamment la capacité de lyser les protéines du surfactant A et D (SP-A et SP-D) (22). Elle joue aussi un rôle dans la destruction des jonctions serrées des cellules épithéliales (7).

Grâce à des modèles murins, il a été mis en évidence que des souches déficientes en LasA avaient une virulence moins importante et une plus grande sensibilité à la phagocytose(23).

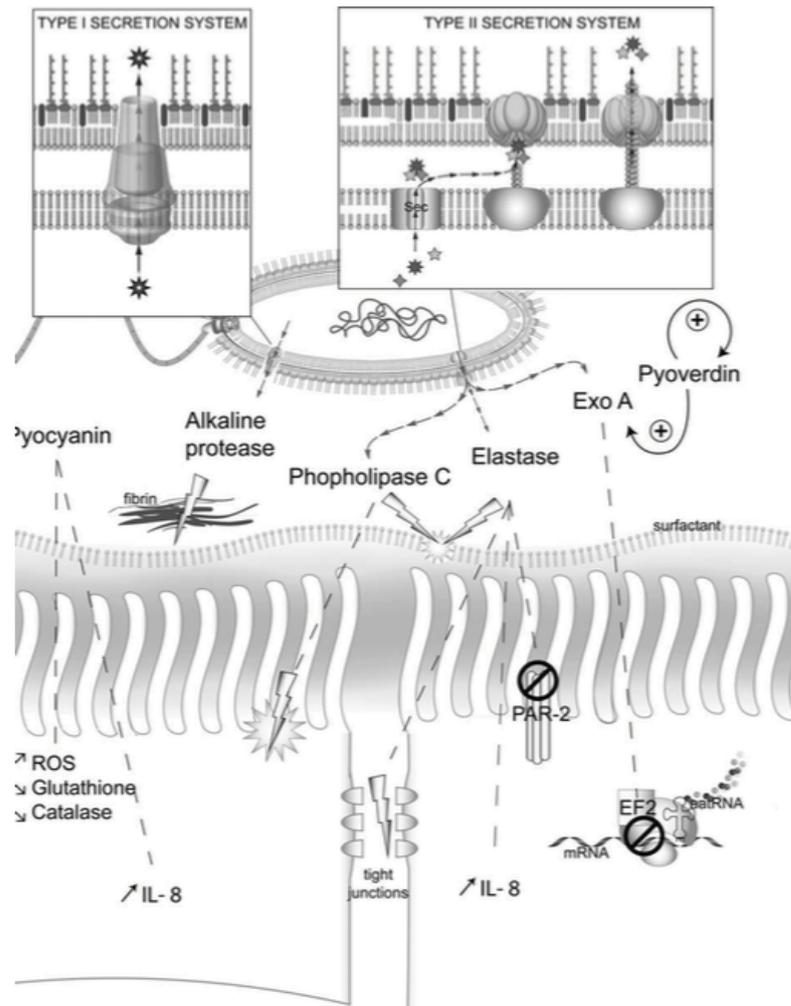


Figure 6 – Mécanismes d'actions des protéases (7)

La protéase IV (PIV) est une sérine protéase qui peut lyser le surfactant (le SP-A et le SP-D). Dans une étude, il a été mis en évidence une diminution de l'activité des macrophages alvéolaires à cause de l'activité de la PIV (24). Elle peut aussi dégrader des protéines du complément, des immunoglobulines et du fibrinogène (25).

L'exotoxine A est une ADPRT sécrétée par le SST II. Elle a pour cible le facteur d'élongation 2 (EF-2). Lorsque ce facteur clé de la synthèse cellulaire est inhibé, il y a induction de l'apoptose. En comparaison ce système est moins efficace que l'ExoS sécrétée par le SST III (26). Ce système est pour autant majeur, car en modèle murin, les souches déficientes en ExoA sont 20 fois moins virulentes que les souches sauvages (27).

La phospholipase C est une phospholipase qui est sécrétée dans l'espace extracellulaire par le SST II. Elle est capable de lyser les phospholipides des cellules eucaryotes (7). Son rôle principal est de dégrader le surfactant (composé à 90 % de phospholipides) (28).

Tableau 1 – Récapitulatif des différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Facteurs de virulences	Mécanismes	Effets pathogènes	Régulation par le QS
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne	Non
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire	Non
Lipopolysaccharide (LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Favorise la réaction inflammatoire/choc	Non
Exoenzyme S (ExoS)	Effet cytotoxique : enzyme bifonctionnelle (activité GAP et ADPRT)	Perturbation du cytosquelette, de la synthèse de l'ADN. Nécrose tissulaire	Non
Exoenzyme U (ExoU)	Activité phospholipase A2 : lyse cellulaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc septique	Non
Exotoxine A (<i>toxA</i>)	Inhibition de la synthèse protéique des cellules cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire Rôle important dans la virulence	Oui
LasA (Staphylolysine)	Sérine protéase	Destruction des tissus contenant de l'élastine	Oui
LasB (Elastase)	Métalloprotéase		Oui
Protéase alcaline (<i>AprA</i>)	Protéolyse	Lyse de la fibrine Empêche l'activation du complément	Oui
Pyocyanine	Production de radicaux libres	Nécrose tissulaire Diminution de la réponse immunitaire	Oui
Pyoverdine	Sidérophore	Régulateur dans la sécrétion de facteur de virulence (y compris la pyoverdine)	Oui
Protéase IV (<i>PrpL</i>)	Sérine protéase	Lyse de surfactant pulmonaire Dégradation du complément, du fibrinogène et des immunoglobulines	Oui
Phospholipase C (<i>plcB</i>)	Phospholipase	Dégrade le surfactant	Oui

3. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est un composé essentiel pour les bactéries durant leur croissance et leur multiplication. Il permet de préserver la forme des bactéries et d'assurer une protection mécanique en maintenant une résistance à la pression osmotique. Il joue un rôle crucial durant la période de croissance et de multiplication. Chez les BGN, le peptidoglycane se trouve dans l'espace périplasmidique compris entre la membrane interne et la membrane externe (Figure 7). Son remodelage naturel chez les bactéries permet d'assurer l'intégrité de la paroi. Chez les BNG, il est estimé qu'environ 50 % est dégradé par génération et jusqu'à 90 % est recyclé pour la synthèse du peptidoglycane (29).

Le peptidoglycane est composé d'une partie glucidique (= polysaccharide) et d'une partie peptidique. Le polysaccharide est un polymère de glycosaminopeptides constitué de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM).

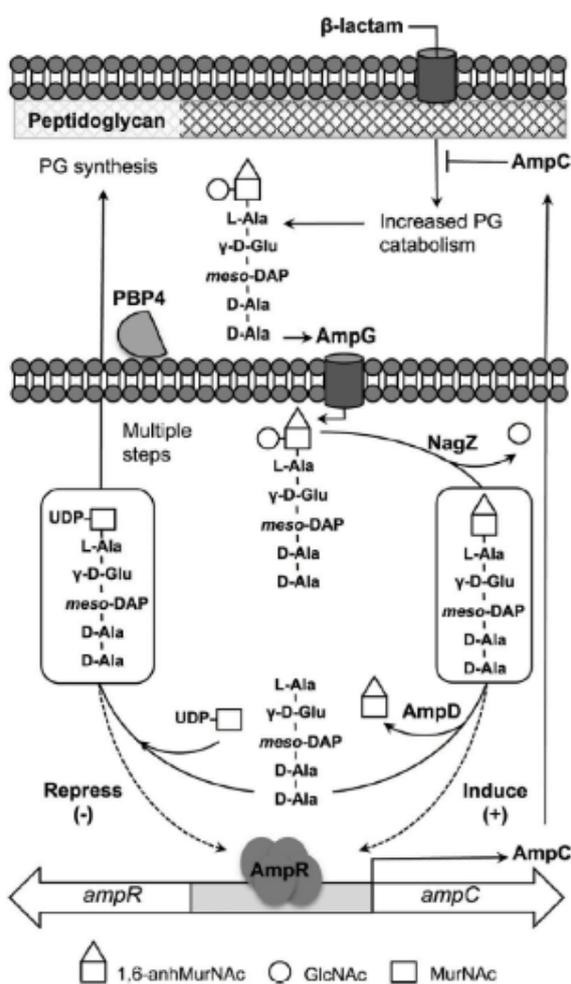


Figure 7 – Recyclage du peptidoglycane (26)

Les protéines liant les pénicillines (PLP ou PBP en anglais) sont des enzymes nécessaires à la formation du peptidoglycane et à son maintien. Elles se situent dans l'espace périplasmidique, sur le côté externe de la membrane interne. Elles possèdent des activités D,D-transpeptidase, D,D-carboxypeptidase et D,D-endopeptidase. Leur site catalytique est aussi le site de fixation/action des β -lactames. En fonction de leur poids moléculaire, elles possèdent des activités enzymatiques différentes. Les PLP de haut poids moléculaire (PLP-HPM, >60kDa) sont responsables de la polymérisation du peptidoglycane et de son incorporation dans la paroi cellulaire préexistante. Les PLP de faible poids moléculaire (PLP-FPM, <60kDa) sont utilisées dans la séparation, la maturation et le recyclage des molécules de peptidoglycane, agissant comme catalyseur pour les activités D,D-carboxypeptidase ou D,D-

endopeptidase.(30). Chez *P. aeruginosa* il existe 5 PLP-HPM : PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3 et PLP3a(3x) ; 3 PLP-FPM : PLP4, PLP5 et PLP7 (6).

Pour recycler le peptidoglycane, des autolysines le lysent en fragments peptidiques (GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc-peptides) soit sous forme de tri-, tétra- ou pentapeptide. Chez *P. aeruginosa*, ces fragments traversent la membrane interne à l'aide d'une perméase appelée AmpG. Dans le cytosol, ils sont métabolisés par une première enzyme appelée NagZ, responsable de la formation de N-acétylglucosamide-anhydromuropeptides (NAG-anhydro-MurNAc), puis, de manière classique, les NAG-anhydro-MurNAc sont métabolisés en anhydro-muropeptides (anhydro-MurNAc) par AmpD. Ils suivent une chaîne de métabolisation pour être réincorporés dans le peptidoglycane sous forme de uridine 5-pyrophosphoryl-N-acetylmuramic acide-pentapeptide (UDP-MurNAc-P5). Les UDP-MurNAc-P5 et anhydro-MurNAc se lient à AmpR et modifient sa conformation. AmpR est un régulateur d'AmpC. Sa liaison à des UDP-MurNAc-P5 inhibe l'expression d'AmpC. A l'inverse, les anhydro-MurNAc favorisent l'expression d'AmpC (30).

AmpC est une céphalosporinase constitutive de *P. aeruginosa* qui est un des mécanismes clés de la résistance aux β -lactamines.

4. Le quorum sensing

a) Généralités

Un élément majeur de la virulence de *P. aeruginosa* est sa capacité à s'adapter à son environnement extérieur. Le *P. aeruginosa* possède un génome de plus de 6,3 Mbp, soit un des plus grands génomes dans le monde bactérien. De part cette caractéristique, il est en capacité de produire un nombre important de métabolites régulés par différentes voies de signalisation (Figure 8). Ces dernières répondent à différents stress provenant de l'environnement extérieur et permettent au bacille pyocyanique de s'adapter.

Le système de régulation le plus connu chez *P. aeruginosa* est le QS. Ce système a aussi été décrit chez d'autres bactéries comme *Vibrio fischeri*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia carotovora*. Dès 1994, il a été découvert un système de régulation des gènes en lien avec la densité de la population bactérienne correspondant au QS (31). Chez *P. aeruginosa*, le QS régule plus de 10 % des gènes (5).

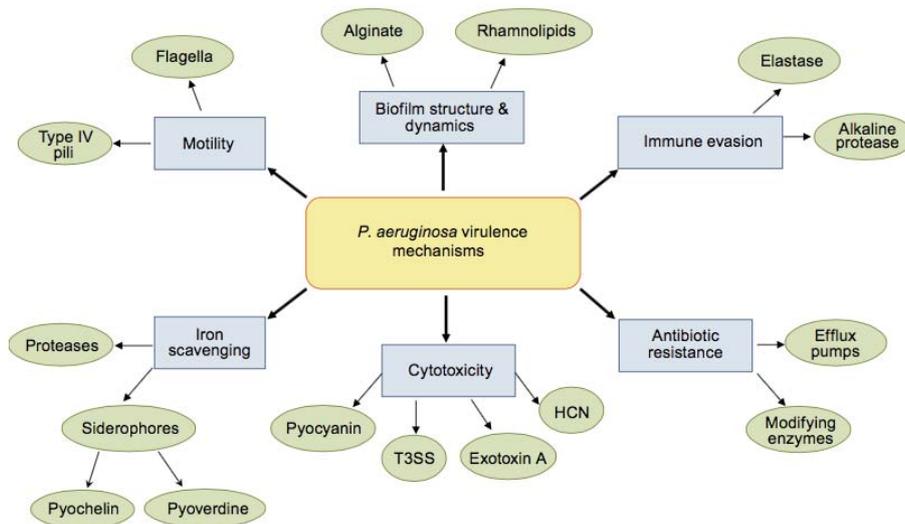


Figure 8 – Mécanismes de virulence du *Pseudomonas aeruginosa* (4)

Le QS permet une communication inter-bactérienne par l'intermédiaire de molécules dites "alarmones" ou "quohormones" qui sont des auto-inducteurs. Elles sont produites par les bactéries elles-mêmes et diffusent soit via des pompes d'efflux, soit de manière passive à travers les membranes, soit par formation de vésicules membranaires. Une accumulation d'auto-inducteurs se

fait en cas de densité bactérienne importante. Lorsque la concentration de ces alarmones dépasse un certain seuil, cela active le QS qui va alors réguler l'expression de différents gènes de *P.aeruginosa*, permettant ainsi à la bactérie de s'adapter à son environnement (32).

Ce système va permettre à la bactérie d'adapter son comportement en fonction de son environnement et va favoriser sa survie. En fonction des conditions, le QS va réguler la mobilité de *P. aeruginosa*, la production de toxines cytotoxiques, les mécanismes d'évasion au système immunitaire, la production d'un biofilm et certains mécanismes de résistances aux antibiotiques (32).

Ce système permet à l'ensemble de l'inoculum bactérien de répondre de manière coordonnée pour mieux dépasser le système immunitaire au moment opportun. Les infections chroniques chez les patients atteints de la mucoviscidose le montrent très bien. En effet, les exacerbations sont corrélées à une augmentation des concentrations systémiques des "alarmones" (4,33).

b) Voies de régulation

Chez *P. aeruginosa*, 4 grandes voies de communication participent au QS. Elles sont complexes et l'ensemble des mécanismes n'est pas totalement compris à l'heure actuelle. Globalement, 3 voies (LasR, RhlR et PQS) sont bien connues. Elles sont activées par des "alarmones" différentes qui se fixent sur leur récepteur respectif, soit LasR, RhlR ou PqsR. Ces récepteurs jouent le rôle d'activateur transcriptionnel, capables d'activer la synthèse des alarmones elles-mêmes par les protéines LasI, RhlI et PqsABCDH, mais aussi de stimuler l'expression de nombreux gènes de virulence ou de résistance (5). La quatrième voie est pour l'instant incomplètement élucidée (Figure 9).

Les principales cascades de signalisation sont LasR et RhlR, dans les premières étapes de la croissance bactérienne pour la régulation de la virulence, puis à la fin de la croissance bactérienne, la voie PQS semble être prédominante (34).

Les auto-inducteurs des voies LasR, RhlR et PqsR sont nommés HSL (3-oxo-C12-homosérine lactone), BHL (C4-HSL) et PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) respectivement (5). Ces 3 voies s'inter-régulent. Ainsi, la voie LasR permet l'activation des voies RhlR et PQS. La voie RhlR régule négativement la voie PQS tandis que la voie PQS active la voie RhlR.

Pour démontrer l'importance du QS dans la virulence chez *P. aeruginosa*, différents modèles animaux et cellulaires ont permis de comparer des souches sauvages à des souches mutantes déficientes en QS. Il a été mis en évidence que les souches mutantes produisaient moins de dommages cellulaires et étaient significativement moins virulentes et moins cytotoxiques (35,36).

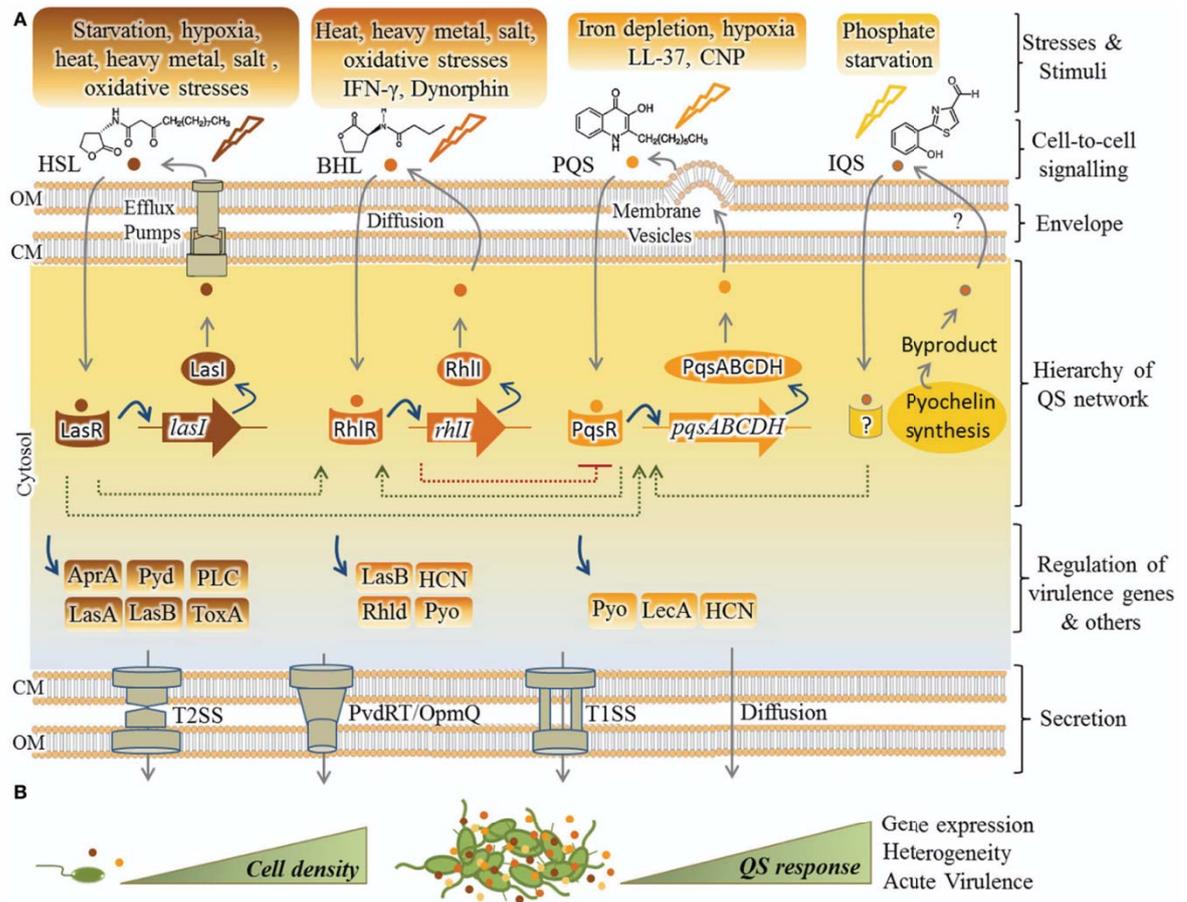


Figure 9 – Régulation du quorum sensing (28)

5. Le biofilm

Après avoir atteint le site de l'infection, notamment grâce à son flagelle et pili de type IV, *Pseudomonas aeruginosa* va perdre sa mobilité pour s'attacher aux surfaces et former un agrégat de cellules et de microcolonies qui vont s'entourer d'une substance exopolysaccharidique (EPS). C'est un élément majeur pour le passage d'une infection aiguë à chronique. Cet ensemble correspond au biofilm qui permet au bacille pyocyanique de se prémunir du stress oxydatif, de la restriction en nutriments/oxygène, de l'accumulation de déchets métaboliques, de la phagocytose, de la compétition inter-espèces et des antibiotiques (37,38).

Dans le biofilm, les bactéries vont pouvoir communiquer les unes avec les autres de manière importante. De plus, le biofilm va servir de réservoir de substances métaboliques, de nutriments et d'énergie pour favoriser la croissance tout en protégeant les bactéries contre les conditions défavorables (39). Par la suite, des bactéries peuvent s'en détacher, diffuser dans l'environnement, adhérer à de nouvelles surfaces et ainsi refaire un biofilm (Figure 10).

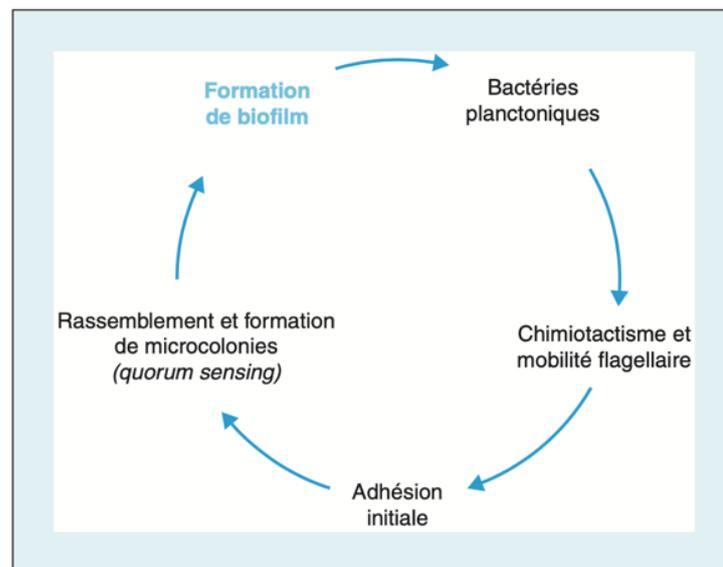


Figure 10 – Cycle de formation du biofilm (13)

Le biofilm est avant tout composé d'alginate et de polysaccharides associés à des protéines, de l'ADN extracellulaire (ADNe) et de lipides (40).

Les principaux polysaccharides sont le Psl et Pel. Le Psl joue un rôle clé dans l'initiation de la formation du biofilm sur les surfaces (41). Le Pel est proche du Psl. Il joue un rôle important dans l'initiation et le maintien de l'interaction entre les cellules au sein du biofilm (42). Le Pel va particulièrement interagir avec l'ADNe et compenser le manque de Psl dans la périphérie du biofilm (43).

L'alginate est le composé majoritaire du biofilm. Il permet de protéger les bactéries de l'opsonisation et de la phagocytose, des radicaux libres et des antibiotiques (5).

L'ADNe joue un rôle de chélateur cationique du fait de sa structure fortement anionique. Il facilite aussi la mobilité et la coordination des mouvement cellulaires et confère une résistance aux antibiotiques (5).

6. Sensibilité aux antibiotiques

P. aeruginosa possède des résistances naturelles aux antibiotiques, des résistances acquises et des résistances adaptatives. Ce dernier mécanisme de résistance n'est pour l'instant pas complètement élucidé et serait responsable de résistances transitoires liées aux signaux de l'environnement extérieur perçus par la bactérie (5).

Pour être efficace un antibiotique doit atteindre son site d'action, qui peut être sur la membrane, l'espace périplasmidique, dans le cytosol (ribosomes) ou sur l'ADN bactérien. Pour bloquer l'effet d'un antibiotique, il existe 4 grands mécanismes de résistance : l'imperméabilité, les pompes d'efflux, la modification de la cible ou la lyse enzymatique.

Les principaux mécanismes pourvoyeur de résistance de *P. aeruginosa* sont intrinsèques ou liés à des dérégulations/mutations (Figure 11).

a) *Résistances intrinsèques : phénotype sauvage*

Il existe 3 grands mécanismes intrinsèques de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*, retrouvés à l'état « sauvage », sans lien avec une pression de sélection par les antibiotiques.

Le premier existe de manière chromosomique. Il s'agit d'une céphalosporinase (AmpC) qui correspond à une β -lactamase de type C dans la classification d'Ambler. Elle est inductible et confère une résistance naturelle aux amino-pénicillines, céphalosporines de 1ère, 2ème et 3ème génération à l'exception de la ceftazidime (44). L'association de ces molécules à des inhibiteurs de β -lactamase ne permet pas de récupérer une activité antibiotique.

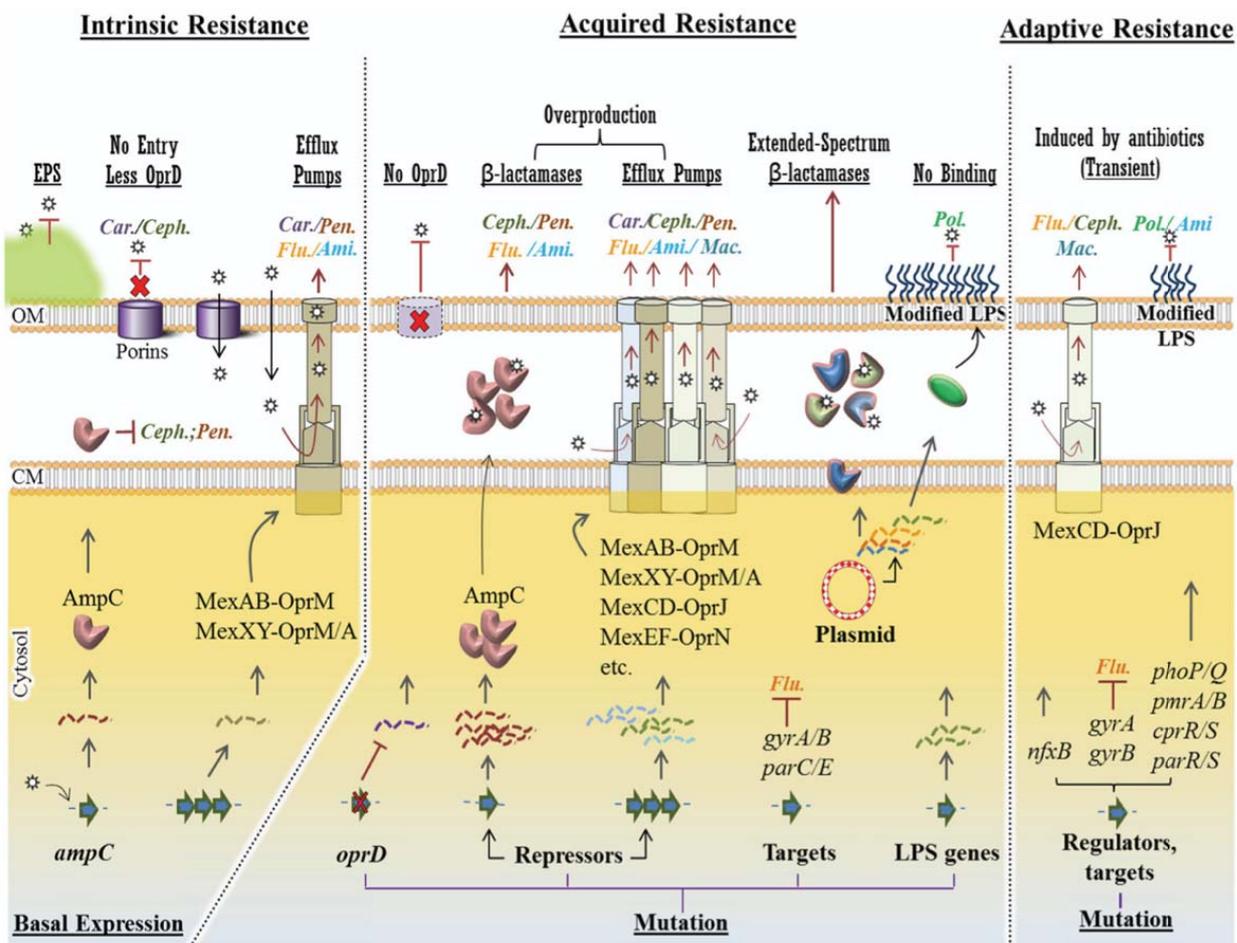
Le deuxième correspond à une réduction du nombre de porines (OprD). Les porines situées dans la membrane externe ont pour rôle de permettre le transport de sucres, d'acides aminés, de phosphates, des cations divalents et des sidérophores (45). Les antibiotiques hydrophiles dont certains β -lactames, des aminosides, des tétracyclines et des quinolones pénètrent au travers de la membrane externe par cette voie (46). La porine OprD joue un rôle majeur car elle est la porte d'entrée préférentielle pour la pénétration des carbapénèmes dans l'espace périplasmidique, soit le lieu où se trouvent leurs cibles (47). La réduction de cette porine est responsable d'une forte diminution de la sensibilité aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* (48). La prévalence des souches résistantes à

l'imipénème de manière isolée est estimée à 20 % des cas et quasiment toutes sont liées à la perte de OprD (44).

Le troisième grand mécanisme est lié à des mécanismes d'efflux. *P. aeruginosa* possède plusieurs pompes d'efflux pour expulser les antibiotiques qui ont diffusé à l'intérieur de la paroi bactérienne. Le plus important est l'efflux MexAB-OprM, il est exprimé de manière constitutive et stable. Il est composé de 3 parties différentes permettant de sortir les antibiotiques du cytosol vers l'espace extracellulaire. Il est efficace sur les tétracyclines, les macrolides, le cotrimoxazole, le chloramphénicol, les fluoroquinolones, les carboxypénicillines, les céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime et ceftazidime), le méropénème (pas l'imipénème) et l'aztréonam (47).

L'efflux MexXY, associé à OprM, existe de manière constitutive et peut être induit par la croissance bactérienne où la présence d'antibiotiques (tétracyclines, érythromycine et gentamicine). Il peut extruder certains β -lactames, fluoroquinolones, aminosides, tétracyclines, chloramphénicol et l'érythromycine (47). L'importance de cet efflux est surtout liée à la résistance aux aminosides qu'il confère (44).

Figure 11 – Mécanismes de résistance intrinsèques et acquis (5)



b) *Acquisition de résistances sous pression de sélection*

P. aeruginosa peut acquérir une résistance aux antibiotiques sous la pression de sélection des antibiotiques. Il peut acquérir des résistances soit par induction, soit par mutation de gènes chromosomiques, soit grâce à l'acquisition de nouveaux gènes, par transfert « horizontal » à partir d'autres bactéries. Les gènes acquis sont alors le plus souvent portés par des plasmides (5).

L'acquisition de résistance vis-à-vis des β -lactames est principalement liée à l'obtention de β -lactamases. La principale β -lactamase responsable de l'acquisition de résistance est AmpC. Les β -lactames se lient aux PLP en fonction de leurs affinités pour les différentes PLP existantes et inhibent leurs activités enzymatiques. Il en résulte une modification de l'équilibre du remodelage du peptidoglycane. A ce phénomène se surajoute un mécanisme qui n'est pas clairement compris mais connu, correspondant à augmentation d'activité des autolysines. Ces mécanismes expliquent l'effet bactéricide des β -lactames.

D'un autre côté, chez *P. aeruginosa* le métabolisme de sa paroi est étroitement lié à la régulation d'*ampC*. Il a été démontré que l'utilisation de l'acide clavulanique, de l'imipénème ou de la céfoxitine pouvait induire l'expression d'*ampC*. Ils sont responsables d'une accumulation d'anhydro-MurNAc qui dépasse la capacité de prise en charge d'AmpD, ce qui entraîne une surexpression d'AmpC (47). Ce mécanisme est réversible à l'arrêt des inducteurs (Figure 12). L'augmentation de production d'AmpC va être alors responsable d'une résistance aux carboxypénicillines, aux uréidopénicillines voir ceftazidime et céphalosporine de 4ème génération (le céfépime).

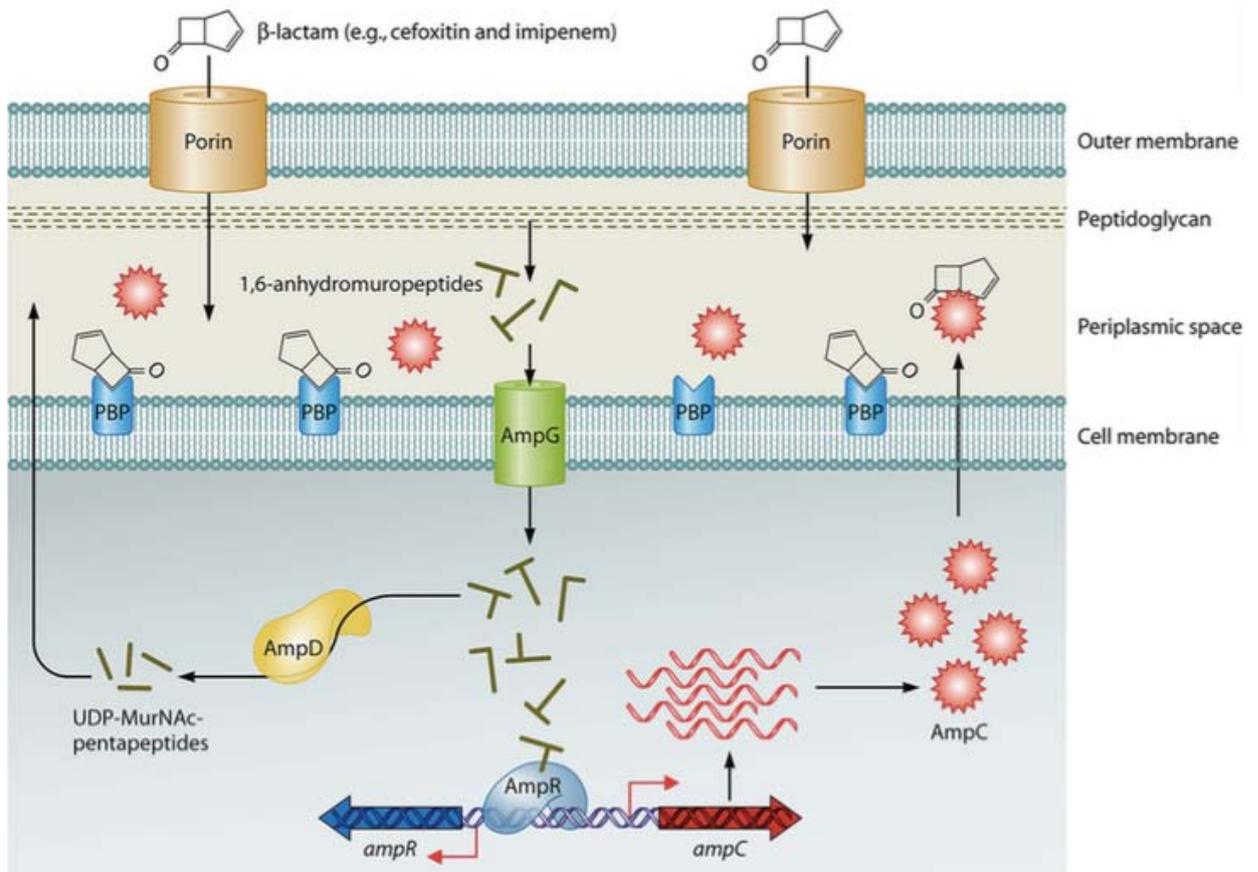


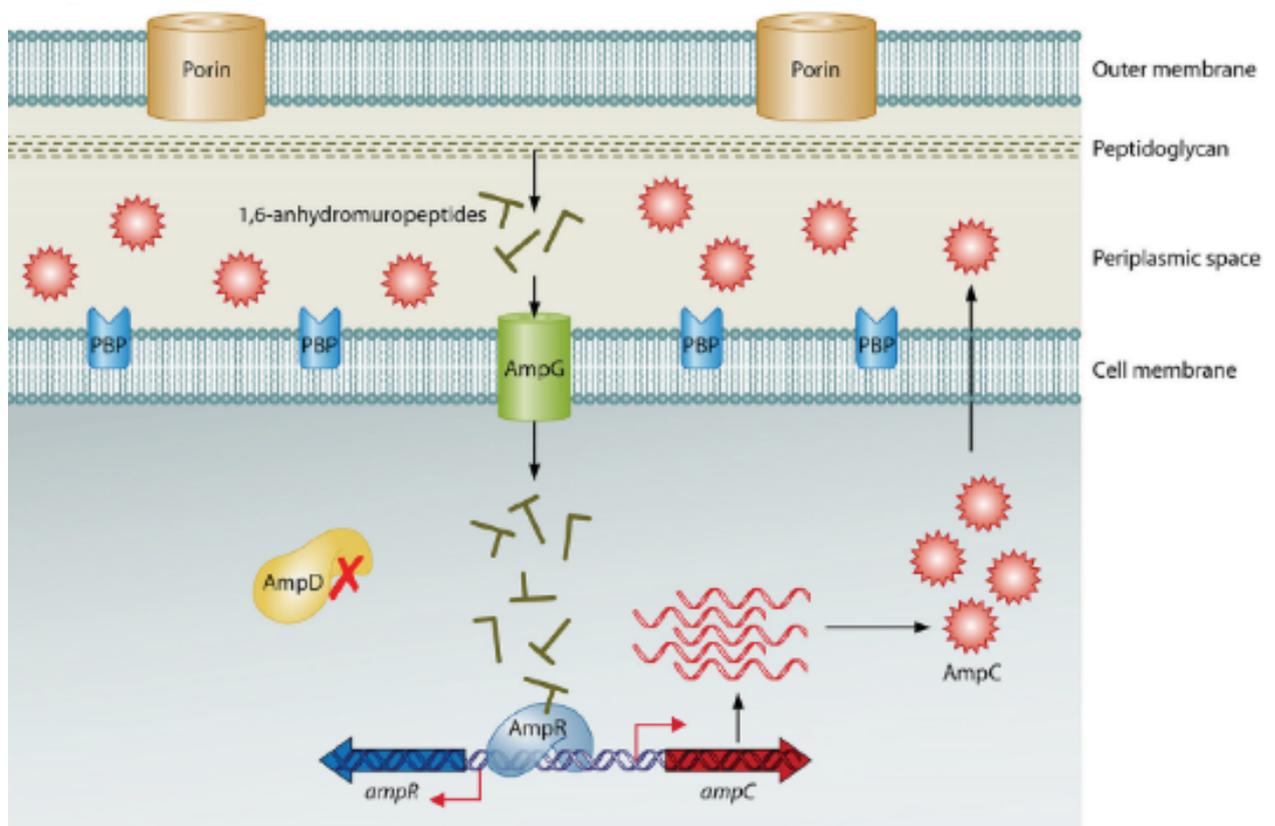
Figure 12 – Mécanisme d'induction d'AmpC par les β -lactames (47)

Il a aussi été constaté que l'expression d'*ampC* pouvait être augmentée par des mutations chromosomiques (47). La régulation d'*ampC* est liée au remodelage du peptidoglycane. L'expression d'*ampC* peut être « déréprimée » soit par mutation d'*ampD* ou d'*ampR* qui sont les régulateurs d'*ampC* les plus connus (Figure 13) (49) :

- Une diminution d'expression d'*ampD*, voire une mutation inactivatrice d'*ampD* induit une stimulation permanente d'AmpR, non liée au recyclage du peptidoglycane,
- Des mutations spécifiques d'*ampR* entraînent l'activation d'AmpR par modification de sa conformation.

Cette dérépression est irréversible.

Figure 13– Mécanismes de dérépression d'AmpC (47)



Les mécanismes expliquant la dérépression d'AmpC et la résistance clinique ont été approfondis ces 15 dernières années. D'autres mécanismes plus complexes ont été proposés mais leurs implications *in vivo* sont encore débattues. Ils sont étroitement liés à la régulation du peptidoglycane et seront présentés dans la discussion (Figure 14).

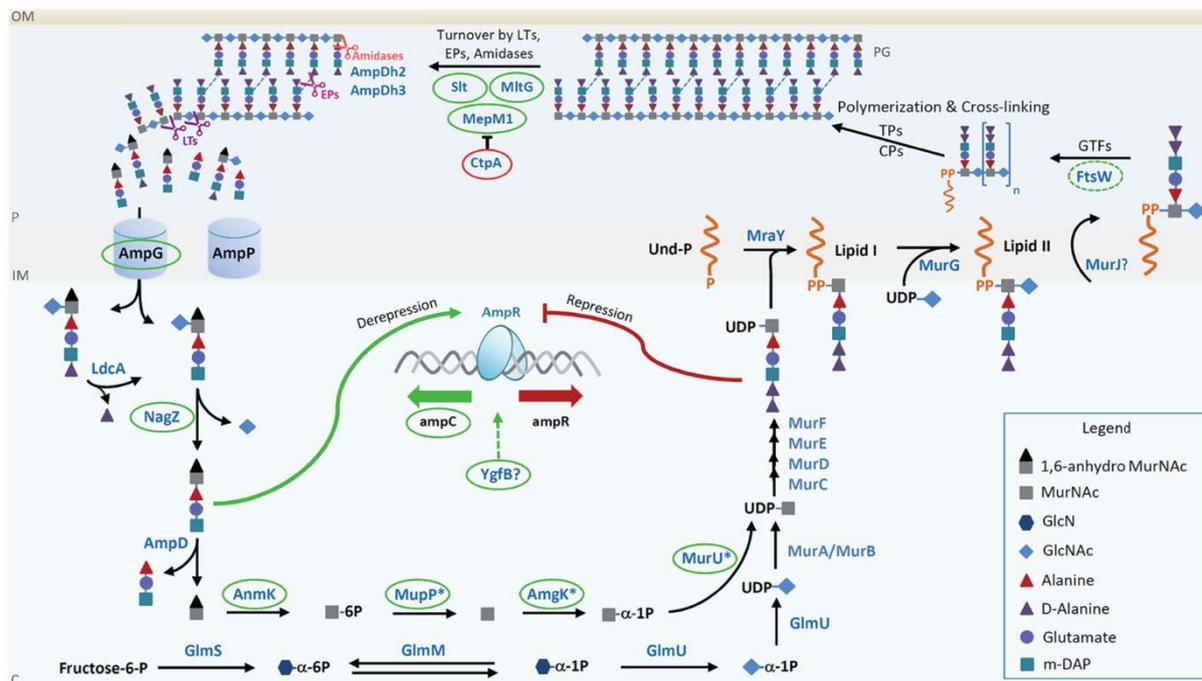


Figure 14 – Schéma d'activation et inhibition d'AmpC en lien avec le recyclage du peptidoglycane (50)

OM, outer membrane; P, periplasm; IM, inner membrane; C, cytoplasm; PG, peptidoglycan; CPs, DD-carboxypeptidases; GTFs, glycosyltransferases; EPs, endopeptidases; LTs, lytic transglycosylases

L'acquisition de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) par l'intermédiaire de plasmides est retrouvée chez *P. aeruginosa* (51). Elle lui confère une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération et à l'aztréonam. De plus, *P. aeruginosa* peut acquérir des carbapénémases responsables de résistance à l'ensemble des β -lactames. Les principales carbapénémases appartiennent à la classe B d'Amber et sont principalement de type VIM (Verona Intergon-encoded Metallo- β -lactamase) et IMP (Imipenemase) (51).

Plusieurs gènes de régulation comme *mexR*, *nalD*, *nalB* et *nalC* permettent de réguler négativement l'efflux MexAB-OprM. Les mutations inactivatrices de ces gènes sont responsables d'une hyperproduction de ce système d'efflux (48). A cause de son large profil de substrats, l'hyper-expression de MexAB-OprM réduit la sensibilité à tous les β -lactames sauf l'imipénème. Lorsque l'efflux MexXY est surexprimé, en plus de la résistance aux aminosides, il confère une résistance au céfépime. Cette hyper-expression est relativement fréquente (10-30 %) (44).

La prédiction d'une résistance aux β -lactames sur la base du génotype de la souche est difficile. Cela a surtout été montré chez les patients atteints de mucoviscidose. La relation entre un génotype de résistance connu et le phénotype observé peuvent être discordants. Ces divergences suggèrent que des mutations supplémentaires, non connues, soient probablement impliquées dans la résistances aux β -lactames (52). L'équipe de Mesaros et al., a proposé une combinaison d'antibiotiques à tester pour détecter les principaux mécanismes de résistance existant chez *P. aeruginosa* (53) (Figure 15).

Figure 15 – Phénotypes de résistance en fonction du mécanisme (51)

Antibiotics	Resistance mechanisms																
	Permeability alterations				Active efflux				Antibiotic-inactivating enzymes				Target modifications				
	OprD loss	MecA-B-OprM	MecCD-OprJ	MexEF-OprN	MexXY-OprM	β -Lactamases	Restricted-spectrum penicillinases	Extended-spectrum oxacillinases	Extended-spectrum β -lactamases	Metallo- β -lactamases	AAC (3)-I	AAC (3)-II	AAC (6)-I	AAC (6)-II	ANT (2)-I	Mutations in topoisomerases	Ribosomal methylation
Ticarcillin	S	L/R	S	S	S	L/R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Ticarcillin-clavulanic acid	S	L/R	S	S	S	L/R	L/R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Piperacillin	S	S	S	S	S	L/R	R	R	L/R	S	S	S	S	S	S	S	S
Piperacillin-tazobactam	S	S	S	S	S	L/R	L/R	R	L/R	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefoperazone	S	L/R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxime	S	L/R	S	S	S	R	L/R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S	L/R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefepime	S	S	I	S	S	S/I	S	L/R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Aztreonam	S	L/R	S	S	S	L/R	I	S/I/R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	L/R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S/I/R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicin	S	S	S	S	S	L/R	S	S	R	S	R	S/I	R	R	S	S	R
Tobramycin	S	S	S	S	S	L/R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R
Amikacin	S	S	S	S	S	L/R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R
Ciprofloxacin	S	S/I	S/I	S/I	S/I	S/I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Colistin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

^aBased on data from <http://bacresist.org.uk/> and [86,57,86/91,196-198]. The limit of 16 antibiotics is meant to allow determination with only one plate, which seems reasonable to implement in most routine laboratories. Antibiotics have been selected on the basis of their clinical interest and/or their usefulness for identifying specific resistance mechanisms. This selection may need to be amended in the light of the local epidemiology of resistance and of drug availability.

^bResistance to imipenem in MexEF-OprN overproducers is mediated by the concomitant downregulation of the expression of OprD porin.

C. Les pneumopathies

1. Contexte

Les infections pulmonaires sont définies en différentes entités. Elles sont liées au contexte de survenue de l'infection. Lorsque l'acquisition se fait en « ville », on parle de pneumonie aiguë communautaire (PAC). Dans un contexte d'hospitalisation, les pneumopathies nosocomiales surviennent après 48h, sinon elles doivent être considérées comme des PAC. Les pneumopathies nosocomiales sont divisées en 2 catégories : pneumonies associées à la ventilation mécaniques (PAVM) survenant après 48h d'intubation et les pneumonies acquises à l'hôpital (PAH) survenant après au moins 48h d'hospitalisation (54).

En France, les pneumonies nosocomiales sont au 3^{ème} rang des infections nosocomiales (15,6 %) avec pour principaux germes le *Staphylococcus aureus* (14,7 %) et *P. aeruginosa* (13,9 %) (3). La pneumopathie est l'infection la plus fréquente en réanimation (2). *P. aeruginosa* est la principale bactérie responsable de PAVM (20 %) (2). Les PAVM sont la première cause de mortalité associée à une infection nosocomiale dans les services de réanimations et également associées à un surcoût (55).

2. Anatomie pulmonaire

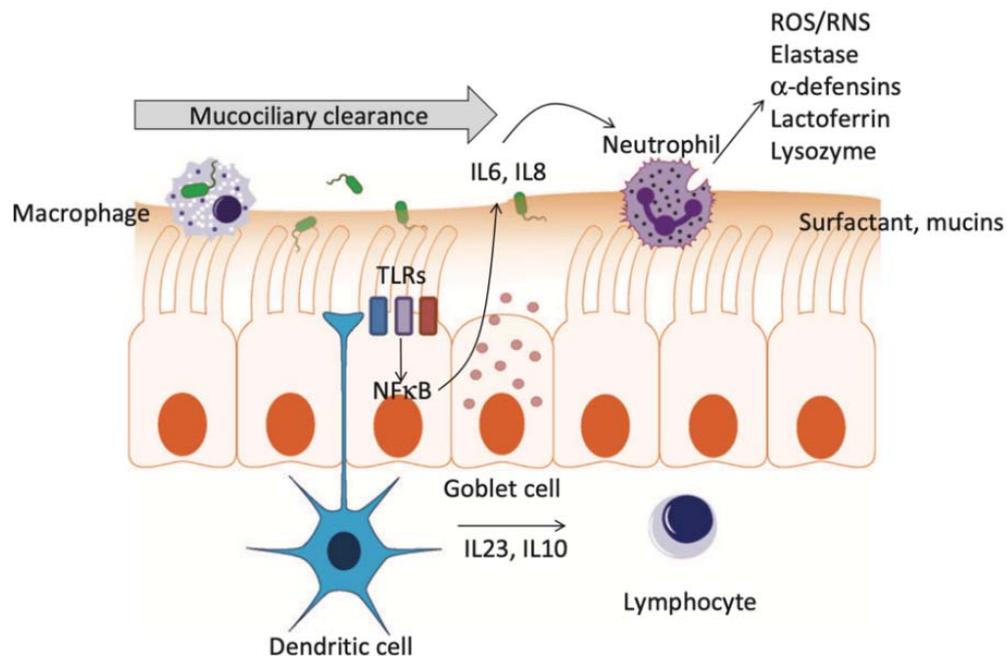
La surface des poumons est composée principalement de 2 types de cellules, les pneumocytes de type I et II. Les pneumocytes de type I couvrent 90 % de la surface alvéolaire pulmonaire mais représentent 8 % des cellules totales du tissu pulmonaire. Leur rôle principal est l'échange gazeux entre les alvéoles et la circulation sanguine. Les pneumocytes de type II représentent 7 % de la surface pulmonaire, mais constituent 16 % des cellules du tissu pulmonaire. Elles vont produire, sécréter et recycler le surfactant pulmonaire, essentiel au maintien de la surface respiratoire nécessaire pour fonctionner normalement (56).

3. Physiopathologie

Une pneumopathie correspond à une infection des voies respiratoires basses. La contamination se fait majoritairement par inhalation de la flore endogène. La contamination est associée à d'autres facteurs, tel qu'une immunodépression locale, un fort inoculum bactérien ou une souche virulente (57).

Dans les conditions physiologiques, il existe plusieurs mécanismes de protection des voies respiratoires basses (Figure 16). Tout d'abord la présence des barrières anatomiques avec la glotte et le larynx, limite l'accès aux voies basses. Ensuite l'arbre muco-ciliaire recouvert de sécrétions trachéo-bronchiques (mucus) et les réflexes de toux constituent des facteurs mécaniques d'élimination. Ces mécanismes non spécifiques sont efficaces contre les particules les plus volumineuses ($>5 \mu\text{m}$).

Figure 16 – Mécanisme de défense immunitaire des voies aériennes(1)



Au niveau pulmonaire, la présence du système immunitaire à médiation innée, humorale et cellulaire complète les facteurs mécaniques (57). Les pneumocytes de type I et II sont recouverts d'un surfactant. Dans le surfactant pulmonaire, le SP-A et le SP-D opsonisent les bactéries (58). La synthèse d'IgA au niveau des bronches empêche l'adhésion des micro-organismes. Les IgG permettent de les agglutiner et de les opsoniser au niveau des alvéoles pulmonaires. Les macrophages vont ainsi pouvoir phagocyter les micro-organismes présents dans les alvéoles pulmonaires. La présence de bactéries génère une réaction inflammatoire (IL-8) et induit un afflux de polynucléaires

neutrophiles. Ils vont phagocyter et lyser les bactéries par production d'espèces réactives de l'oxygène et d'azote, et libérer des α -défensines, lactoferrines et du lysozyme (1).

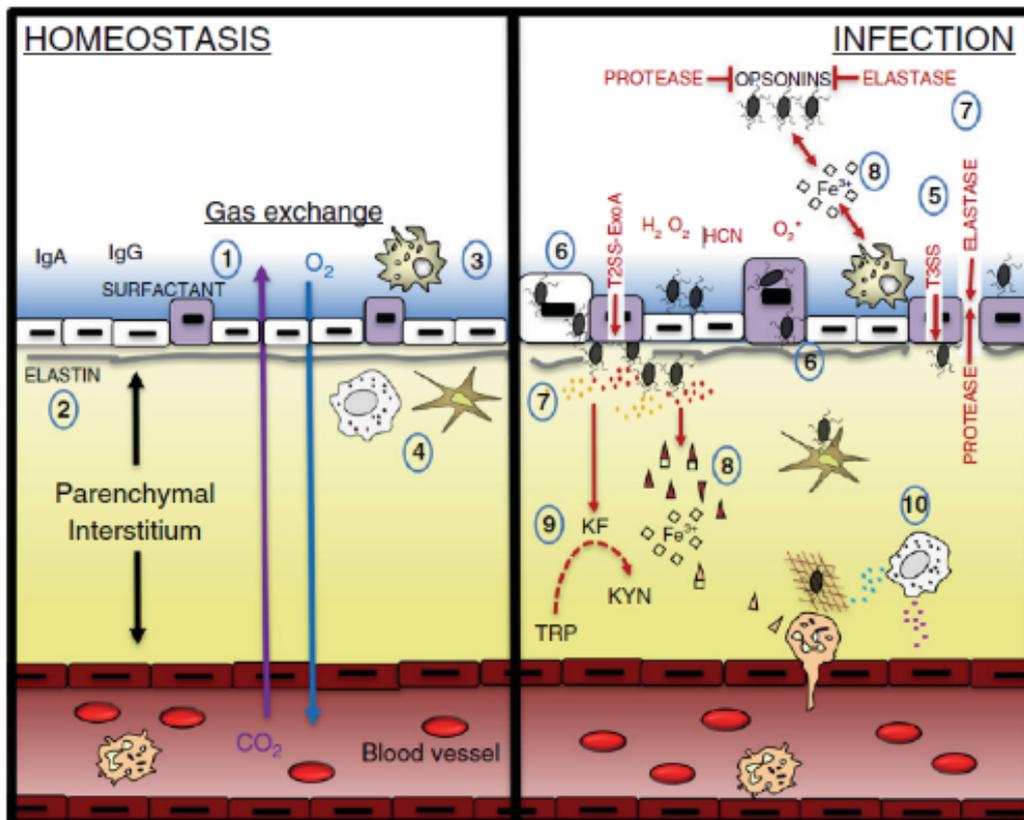
Lorsque le patient est intubé, l'efficacité de ces mécanismes naturels est altérée. L'intubation ne permet pas aux barrières physiques de jouer leur rôle et d'autant plus lorsque le patient est allongé. La pose du tube endotrachéal provoque souvent une brèche de l'épithélium (59). Le matériel nécessite la pose d'un ballonnet qui va altérer l'équilibre de la flore et favoriser l'accumulation de bactéries (dont *P. aeruginosa*) (57). Ces bactéries peuvent contaminer les voies respiratoires basses par fuite autour du ballonnet et ainsi contaminer les poumons. La contamination de l'arbre trachéo-bronchique précède souvent l'infection pulmonaire (57).

4. Infection pulmonaire par *P. aeruginosa*

L'incidence des infections à *P. aeruginosa* est liée à la fragilité de l'état de santé des patients, à la présence, dans les services, d'un taux élevé de portage de souches souvent multi-résistantes et à l'utilisation préalable d'antibiotiques à large spectre (60).

Le bacille pyocyanique va adhérer à l'épithélium alvéolaire principalement par les pili de type IV (8). Il lyse le surfactant et les cellules grâce à ses facteurs de virulence. Une fois à l'intérieur des pneumocytes de type II, la bactérie est protégée par la phagocytose et peut ainsi proliférer (61). Les pneumocytes de type I lysés sont remplacés par des pneumocytes de type II (8). L'activation du QS va perturber la réponse du système immunitaire inné et acquis. Les effets cytotoxiques associés aux facteurs de virulence vont permettre l'infection pulmonaire (Figure 17) (8).

Figure 17 – Infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* (8)



5. Diagnostic

D'après les recommandations formalisées d'experts (RFE) de 2017 publiées par la Société française d'anesthésie et de réanimation (SFAR) et la Société de réanimation de langue française (SRLF), le diagnostic combine des éléments radiologiques, cliniques et microbiologiques (62).

Signes radiologiques :

- Au moins 2 clichés radiologiques avec l'apparition d'un foyer de pneumonie,
- En l'absence d'antécédent de cardiopathie ou maladie pulmonaire sous-jacente, une seule radiologie suffit.

Signes cliniques généraux (au moins 1) :

- Fièvre $>38,3^{\circ}\text{C}$ sans autre cause,
- Leucocytose, soit $<4\ 000/\text{mm}^3$, soit $>12\ 000/\text{mm}^3$.

Signes cliniques pulmonaires (au moins 2) :

- Sécrétions purulentes,
- Toux ou dyspnée,
- Désaturation ou besoin accru en oxygène ou nécessité d'assistance ventilatoire.

Confirmation microbiologique d'un pathogène en fonction du prélèvement :

- Examen cytobactériologique des crachats (ECBC) : seuil $>10^7$ UFC/mL,
- Aspiration endotrachéale : seuil $>10^5$ UFC/mL,
- Lavage broncho-alvéolaire (LBA) : seuil $>10^4$ UFC/mL,
- Prélèvement distal protégé par brosse bronchique : $>10^3$ UFC/mL.

En pratique, elle est fortement suspectée suite à l'apparition ou à l'aggravation d'un infiltrat objectivé radiologiquement avec cliniquement des signes tels que la fièvre, les sécrétions trachéales purulentes ou l'altération de l'oxygénation.

Dans les pneumonies nosocomiales, les germes mis en cause varient en fonction du délai de survenue de l'infection. Si l'infection est précoce (2 à 4 premiers jours d'hospitalisation) les principaux germes sont le *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis* (63). Si l'infection est tardive (après 5 jours), les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés sont *S. aureus* (14,7 %) et *P. aeruginosa* (13,9 %). Elles sont plurimicrobiennes dans

23,3 % des cas (3). Pour les PAVM développées dans les services de réanimation, le *P. aeruginosa* est le principal pathogène retrouvé (20 %) (2).

6. Traitement antibiotique des PAVM

a) *Traitement antibiotique d'une PAVM*

L'antibiothérapie doit être initiée dès que le diagnostic est posé, sans attendre le résultat microbiologique. Une antibiothérapie adaptée dès l'initiation, diminue le risque de mortalité (57). Le choix de l'antibiothérapie dépend du délai de survenue, des facteurs de risque de bactéries multi-résistantes et des facteurs de risque reconnus pour développer une pneumonie à *P. aeruginosa* (Tableau 2).

Dans une pneumonie précoce, sans facteur de risque de bactéries multi-résistantes, ni de choc septique, une monothérapie peut être instaurée en probabiliste. En pratique, l'amoxicilline-acide clavulanique ou les C3G comme le céfotaxime sont utilisées.

Dans les autres cas, une bithérapie est recommandée avec une β -lactamine à large spectre et un aminoside.

Les facteurs de risque d'infections à BGN non fermentant sont une antibiothérapie dans les 90 jours précédant l'épisode de pneumonie, une hospitalisation de plus de 5 jours précédant l'épisode de pneumonie, un recours à une séance d'épuration extra-rénale lors du diagnostic de pneumonie, un choc septique et un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA).

Les facteurs de risque de développer une pneumonie à *P. aeruginosa* sont la BPCO, la DDB et la mucoviscidose (62).

Cadre nosologique	Classes thérapeutiques	Molécules	Posologies ^a
- Pneumonie précoce (<5jours) En l'absence de choc septique ou de facteur de risque de BMR	β-lactamine	- Amoxicilline/acide clavulanique - C3G - Si allergie β-lactamine : lévofloxacine	-3 à 6 g/j -3 à 6 g/j
- Pneumonie précoce (<5jours) Avec choc septique en absence de facteur de risque de BMR	β-lactamine + Aminoside ^b Ou Fluoroquinolones	- Amoxicilline/acide clavulanique - C3G Gentamicine Ofloxacine - Si allergie β-lactamine : lévofloxacine + aminoside	-3 à 6 g/j -3 à 6 g/j 8mg/kg/j 200mg x2/j 500mg x2/j
- Pneumonie tardive (>5jours) ou facteur de risque de BGN non fermentant	β-lactamine + Aminosides ^b Ou Fluoroquinolones	Ceftazidime Ou céfépime Ou Pipéracilline-tazobactam ou si connu à BLSE ^c Imipénème-cilastatine Méropénème Amikacine ^d Ciprofloxacine - Si allergie β-lactamine : aztréonam + clindamycine	6 g/j 4 à 6 g/j 16 g/j 3 g/j 3 à 6 g/j 30 mg/kg/j 400 mg x3/j 3 à 6 g/j 600mg x 3 à 4/j
Facteur de risque de SARM	Molécule anti-SARM	Vancomycine Ou Linézolide	15 mg/kg puis 30 à 40 mg/kg/j 600 mg x 2/j

Tableau 2 – Pneumonies associées aux soins de réanimation (2017- SFAR)/ Protocole de soin n°4 suggéré par les experts : schémas thérapeutiques (AVIS D'EXPERTS) (62)

BMR : bactérie multi-résistante ; Facteur de risque de SARM : prévalence locale de SARM élevée, colonisation récente du patient à SARM, lésion cutanée chronique, dialyse chronique.

^a Posologies données à titre indicatif pour un patient avec fonction rénale normale et poids standard

^b Privilégier l'usage des aminosides par rapport aux fluoroquinolones pour limiter l'émergence de BMR

^c Selon les critères de la RFE « réduire l'utilisation des antibiotiques en réanimation »

^d Utiliser en priorité l'amikacine par rapport à la gentamicine en raison de son activité sur les BGN non-fermentants.

b) Traitement d'une PAVM à *P. aeruginosa*

La prise en charge probabiliste d'une PAVM à *P. aeruginosa* est la bithérapie. L'intérêt de la bithérapie est d'augmenter la probabilité d'être actif sur le germe (Figure 18). En effet, dans la littérature il est montré qu'une monothérapie efficace fait aussi bien que la bithérapie (64) (Figure 19). Cependant, la prise en charge par un traitement adapté au moment du diagnostic est cruciale. La bithérapie permet ainsi d'optimiser la prise en charge. Une fois l'antibiogramme réalisé, une monothérapie adaptée peut être mise en place. La durée totale de traitement par un antibiotique efficace doit être de 8 jours, en dehors de cas particuliers (immunodépression, empyème, pneumonie nécrosante ou abcédée) (62). Complément Annexe 1 – Antibiothérapie d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* / HAS 04/06/2019.

Microorganism	No./total no. (%) receiving:		OR (95% CI)	P
	Combination	β-Lactam		
Non-ESBL <i>E. coli</i>	242/248 (98)	2,454/2,489 (99)	0.6 (0.2–1.7)	0.3
ESBL <i>E. coli</i>	21/28 (75)	62/122 (51)	2.9 (1.07–8.2)	0.02
Non-ESBL <i>K. pneumoniae</i>	62/63 (98)	393/420 (94)	4 (0.7–177)	0.2
ESBL <i>K. pneumoniae</i>	18/20 (90)	38/63 (60)	2 (1.2–4.2)	0.01
<i>P. mirabilis</i>	10/10 (100)	116/118 (98)		1
<i>Salmonella</i> spp.	15/15 (100)	108/109 (99)		1
AmpC organisms	78/82 (95)	258/326 (79)	5.1 (1.8–20)	0.001
<i>P. aeruginosa</i>	133/143 (93)	201/319 (63)	7.8 (3.8–16)	<0.0001
Other nonfermenters	24/51 (47)	53/105 (51)	0.9 (0.4–1.8)	0.7
Miscellaneous	18/18 (100)	105/114 (92)		0.4

Figure 18 – Probabilité d'efficacité du traitement antibiotique en fonction du germe (65)

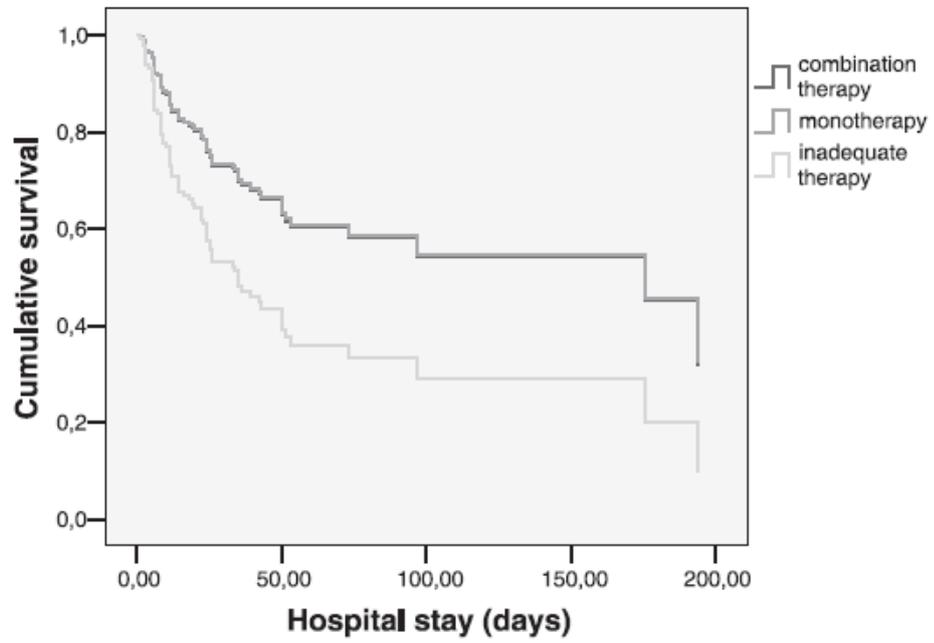


Figure 19 – Courbe de survie en fonction du traitement par monothérapie, bithérapie ou antibiothérapie inadaptée (64)

II. Objectifs de l'étude

D'après des travaux préliminaires, des populations mixtes de *P. aeruginosa* (isolats déficients ou non en QS et/ou isolats résistants ou non à certains antibiotiques) peuvent être retrouvées dans des LBA au cours de PAVM. Pourtant, faute de données scientifiques suffisantes, les recommandations portant sur la prise en charge et le diagnostic de ces infections, n'intègrent pas la possibilité que des sous-populations bactériennes aux comportements différents, puissent coexister dans ce contexte. Ainsi, l'objectif de ce travail est d'explorer la variabilité génétique intra-population chez des souches de *P. aeruginosa* isolées de pneumopathies chez des patients de réanimation.

Nous allons comparer dans un premier temps l'adéquation entre le phénotype rendu au service clinique et l'ensemble des phénotypes observés de la population présente dans le prélèvement avec ces conséquences potentielles. Ensuite, nous allons approfondir cette hétérogénéité en réalisant un séquençage haut-débit (Whole-Genome Sequencing) sur l'intégralité des génomes de plusieurs isolats issus de mêmes LBA. Notre travail a ainsi pour objectifs d'avoir une idée de la micro-hétérogénéité de ces populations, d'explorer les processus évolutifs rencontrés dans ce contexte (variations dans des gènes de résistance aux antibiotiques, gènes de régulation) et de rechercher une dynamique de convergence entre différentes populations.

III. Matériels et méthodes

A. Souches bactériennes étudiées

1. Sélection des LBA (souche de *P. aeruginosa*)

Nous avons sélectionné pour cette étude 14 LBA positifs à *P. aeruginosa*. Les 14 LBA ont été réalisés durant l'année 2018, chez 9 patients (A à I) hospitalisés en Réanimation, présentant des signes cliniques de pneumopathie nécessitant une ventilation mécanique.

Un LBA a été réalisé au cours d'une PAVM précoce (≤ 4 jours de ventilation mécanique) chez un patient, et 13 LBA au cours d'une pneumopathie tardive (> 4 jours de ventilation mécanique) chez 9 patients.

A noter que les patients B, C, H et I ont présenté une pneumopathie récidivante à *P. aeruginosa*. Nous avons analysé différents LBA provenant de ces 4 patients.

2. Dépistage phénotypique à partir des cultures de LBA

Pour chaque LBA, un dépistage phénotypique a été réalisé à partir de 30 colonies isolées en culture, afin de rechercher une hétérogénéité de comportement au sein de la population. Pour ce dépistage, lorsque la culture de LBA était composée de colonies d'aspects différents (colonies \pm pigmentées, reflet métallique ou non, aspect muqueux ou non...), il était choisi un panel de 30 colonies représentant les différents morphotypes observés.

Au cours de ce dépistage, nous avons recherché pour les 30 isolats de chaque LBA :

1. des différences de sensibilité à la ceftazidime, l'imipénème et la ciprofloxacine. Pour cela, nous avons réalisé des cultures sur géloses Mueller-Hinton imprégnées de ceftazidime à la concentration de 8 mg/L, d'imipénème à la concentration de 8 mg/L ou de ciprofloxacine à la concentration de 0,5 mg/L (concentrations critiques définies dans le EUCAST/CASFM-2017). L'absence de pousse était interprétée comme une sensibilité de la bactérie à l'antibiotique contenu dans la gélose.

2. une différence de production d'enzymes (élastase et protéases) régulée par le QS, afin de rechercher la présence d'isolats, déficients ou non, en QS au sein des populations.

3. Sélection des isolats pour le séquençage de génome entier

Pour notre étude génomique, nous avons choisi chez les 9 patients retenus pour notre étude, 5 colonies issues d'un même LBA. Les 5 isolats ont été choisis pour faire en sorte de représenter la diversité mise en évidence à partir du dépistage phénotypique (Tableau 3).

Pour les 4 patients ayant présenté des pneumopathies récidivantes, des isolats supplémentaires issus d'autres LBA, ont été ajoutés à notre analyse, à titre de comparaison.

Par ailleurs, nous avons vérifié que chaque patient était infecté par une seule souche, en comparant les différents isolats par MultiLocus Sequence Typing (MLST).

Au total, 58 génomes entiers de 58 isolats ont été séquencés.

Tableau 3 – Isolats séquencés

PATIENT IPP	LBA	ISOLAT DE REFERENCE	ISOLATS COMPLEMENTAIRES										
A 026018781	6	6-1	6-6	6-12	6-18	6-24							
B 011043129	3 et 7	3-1	7-1	7-7	7-12	7-18	7-25						
C 026053080	10, 16 et 41	10-1	10-6	10-12	10-18	10-24	16-1	16-6	16-12	16-18	16-24	41-1	
D 026069046	19	19-1	19-2	19-6	19-7	19-18							
E 012150612	24	24-1	24-6	24-12	24-18	24-24							
F 005085543	38	38-1	38-6	38-12	38-18	38-24							
G 011295755	39	39-1	39-6	39-12	39-18	39-24							
H 026665574	51 et 52	51-1	51-6	51-12	51-18	51-24	52-1	52-2	52-5	52-20	52-25		
I 004171730	22 et 25	22-1	25-1	25-2	25-3	25-6	25-15						

B. Méthodes

1. Réalisation d'antibiogrammes

Un antibiogramme automatisé par méthode VITEK 2®, plus ou moins complété par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (technique E-test ou en milieu liquide (UMIC)) sur avis biologique, a été réalisé à partir d'une colonie pour chaque LBA, au moment du diagnostic.

Nous avons complété ces résultats en réalisant des antibiogrammes sur les colonies sélectionnées pour notre étude génomique, lorsque notre dépistage phénotypique a mis en évidence des différences de résistance à au moins l'un des 3 antibiotiques testés (ceftazidime, imipénème ou ciprofloxacine).

Les techniques utilisées pour ces résultats complémentaires, étaient les suivantes :

- Antibiogrammes automatisés par méthode VITEK 2® ,
- CMI par bandelettes E-test sur gélose Mueller-Hinton pour la témocilline, l'association ceftazidime/avibactam, l'association ceftolozane-tazobactam et la fosfomycine.

Pour considérer une variation des CMI entre 2 isolats, il fallait au moins un écart de 2 dilutions entre les CMI.

2. Séquençage à haut-débit et mise en évidence des mutations génétiques

L'ADN des bactéries a été extrait à l'aide du kit QIAamp DNA mini kit® (Qiagen), à partir de cultures sur milieu gélosé.

Les bibliothèques ont été préparées à partir de 1 µg d'extrait d'ADN, à l'aide du kit QIAseq FX DNA Library Kit® (Qiagen). Elles ont ensuite été quantifiées, regroupées, puis séquencées sur les appareils HiSeq® et MiSeq® (Illumina), au niveau de la plateforme GenoBiRD de l'IRS1 à Nantes.

L'analyse bio-informatique et la génomique comparative des données de séquençage ont été réalisées à l'aide des outils développés par nos partenaires bio-informaticiens (Dr AUBRY et Dr SASSI, plateforme GEH, Rennes), permettant de recueillir directement à partir des données brutes, une liste de mutations différenciant les isolats de chaque population (LBA).

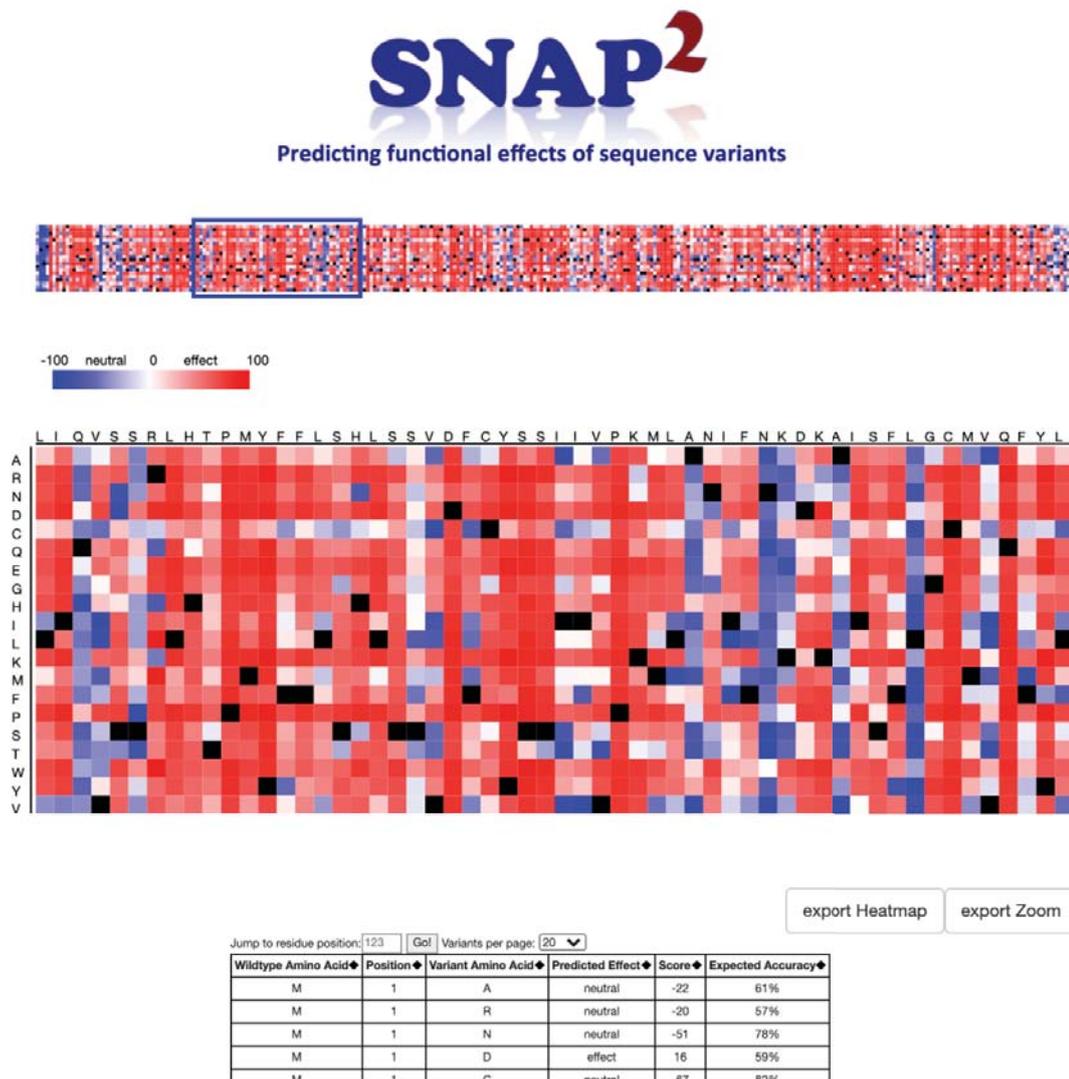
La souche de référence PAO1 a été utilisée comme référence pour l'assemblage des génomes. Pour chaque patient, un isolat issu du LBA le plus précoce en cas de LBA multiples, a été choisi comme référence pour la comparaison.

3. Analyse de l'effet des mutations génétiques

Nous avons utilisé le logiciel SNAP2 (<https://roslab.org/services/snap/>) pour prédire l'effet des mutations non synonymes mises en évidence.

Pour chaque protéine et mutation étudiées, la séquence peptidique de l'isolat de référence était téléchargée dans le logiciel, qui fournissait en retour une prédiction d'effet pour chaque substitution en acide aminé possible sur toute la longueur de la protéine (Figure 20).

Figure 20 – Illustration du logiciel SNAP²



IV. Résultats

A. Caractéristiques des patients

Les 9 patients étaient âgés de 35 à 78 ans (58,2 ans en moyenne). Il y avait 7 hommes et 2 femmes.

Cela correspondait à 14 LBA positifs à *P. aeruginosa*, dont 2 ayant une co-infection à *Klebsiella* sp. (Tableau 4). Sur l'ensemble des LBA, 12 comportaient une numération bactérienne $\geq 10^4$ UFC/mL. Dans les 2 cas de co-infection, *P. aeruginosa* a été considéré par le service clinique comme le seul pathogène à cibler par l'antibiothérapie.

Les patients ont tous été sous ventilation mécanique sauf dans le cas du LBA n°41 du patient C. Ce patient a été trachéotomisé, avec pose de canule par la suite. La durée d'intubation avant infection était de 4 à 36 jours, avec une moyenne de 17,9 jours avant infection.

Tableau 4 – Description épidémiologique

Patient IPP	Sexe	Age (ans)	Date d'entrée en réanimation	Motif d'hospitalisation	Début de la ventilation mécanique	Durée d'intubation avant infection	Antibiothérapie dans les 15 jours avant	Date du LBA	Isolat	Germe n°1	Germe n°2
Patient A 026018781	M	35	19/01/2018	AVP	19/01/2018	9 jours	Amoxicilline-acide clav	28/01/2018	6	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient B 011043129	M	72	26/12/2017	SDRA et choc septique	29/12/2017	21 jours	-	19/01/2018	3	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
			26/12/2017		29/12/2017	35 jours	-	02/02/2018	7	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient C 026053080	M	59	02/02/2018	SDRA sur syndrome coronarien aigu	02/02/2018	5 jours	Ceftriaxone	07/02/2018	10	<i>P. aeruginosa</i>	-
			02/02/2018		02/02/2018	30 jours	-	04/03/2018	16	<i>P. aeruginosa</i>	-
			02/07/2018		Trachéotomie	-	Méropénème puis ceftolozane-tazobactam	17/07/2018	41	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient D 026069046	F	38	08/02/2018	Céphalées brutales avec hémiplégie gauche	09/02/2018	32 jours	Méropénème	13/03/2018	19	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient E 012150612	M	44	20/03/2018	SDRA, sur pneumopathie post-grippale	20/03/2018	13 jours	Clindamycine + céfotaxime puis pipéracilline-tazobactam	01/04/2018	24	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient F 005085543	F	69	07/06/2018	SDRA sur PFLA droite	08/06/2018	8 jours	Amoxicilline-acide clav puis spiramycine et ceftriaxone	16/06/2018	38	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient G 011295755	M	78	27/06/2018	Choc hémorragique post-néphrectomie totale droite	26/06/2018	5 jours	-	01/07/2018	39	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient H 026665574	M	68	16/10/2018	Coma sur IMV poly-médicamenteuse	16/10/2018	4 jours	Amoxicilline + acide clav	20/10/2018	51	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. oxytoca</i>
			16/10/2018		16/10/2018	15 jours	-	31/10/2018	52	<i>P. aeruginosa</i>	-
Patient I 04171730	M	65	25/02/2018	Dyspnée aiguë de repos sur décompensation BPCO	27/02/2018	21 jours	Céfazoline	20/03/2018	22	<i>P. aeruginosa</i>	-
			25/02/2018		27/02/2018	36 jours	-	04/04/2018	25	<i>P. aeruginosa</i>	-

IPP : identifiant permanent du patient ; AVP : accident de la voie publique ; SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë ; PFLA : Pneumopathie franche lobaire aiguë ; IMV : Intoxication médicamenteuse volontaire ; acide clav : acide clavulanique

Les antibiotiques utilisés pour le traitement de la pneumopathie étaient principalement la ceftazidime (43 %), le céfépime (14 %), le méropénème (14 %) et la colistine (7 %). La durée totale de traitement était en moyenne de 9,4 jours, avec un minimum de 1 jour et un maximum de 18 jours (Tableau 5).

Cinq patients ont reçu préalablement (dans les 15 jours précédant le LBA) une antibiothérapie par amoxicilline ± acide clavulanique, céfazoline, céfotaxime, ceftriaxone ou clindamycine, ayant pu favoriser l'infection à *P. aeruginosa*.

Tableau 5 – Prise en charge antibiotique à partir des résultats cliniques

Patient IPP	Isolat (date de prélèvement du LBA)	Seuil (log 10)	Date du début du traitement	Antibiothérapie	CMI mg/L (interprétation)	Durée (jours)	Évolution
Patient A 026018781	-	-	19/01/2019	Amoxicilline-acide clav	R*	7	-
	6 (28/01/18)	>4	28/01/2018	Ceftazidime	4 (S)	7	Favorable
Patient B 011043129	3 (19/01/18)	>4	19/01/2018	Imipénème	2 (S)	3	Favorable
			22/01/2018	Ceftazidime	4 (S)	4	
	7 (02/02/18)	>4	02/02/2018	Ciprofloxacine	<0,25 (S)	7	Favorable
			02/02/2018	Amikacine	4 (S)	2	
			02/02/2018	Imipénème	2 (S)	2	
04/02/2018	Méropénème	2 (S)	8				
Patient C 026053080	-	-	02/02/2018	Ceftriaxone	R*	5	
	10 (07/02/18)	>4	07/02/2018	Pipé-tazo	16 (S)	2	Favorable
			09/02/2018	Ceftazidime	4 (S)	2	
			11/02/2018	Méropénème	0,5 (S)	14	
	16 (04/03/18)	4	04/03/2018	Céfépime	2 (S)	14	Favorable
			04/03/2018	Amikacine	<2 (S)	3	
	-		16/07/2018	Méropénème	8 (R)**	1	-
				Colistine	1 (S)**	1	
Daptomycine				R*	1		
41 (17/07/18)	>4	17/07/2018	Méropénème	8 (R)	2	Favorable	
		17/07/2018	Colistine IV Colistine aérosols	1 (S)	9		
Patient D 026069046	-	-	25/02/2018	Méropénème	<0,25 (S)**	14	Favorable
	19 (13/03/18)	>4	13/03/2018	Ceftazidime	4 (S)	10	Favorable
			13/03/2018	Amikacine	<2 (S)	2	
Patient E 012150612	-	-	19/03/2018	Clindamycine	R*	2	-
			19/03/2018	Céfotaxime	R*	4	
			23/03/2018	Pipé-tazo	8 (S)**	7	
	24 (01/04/18)	3	01/04/2018	Ceftazidime	2 (S)	7	Favorable
Patient F 005085543	-	-	04/06/2018	Amoxicilline-acide clav	R*	2	-
	-	-	05/06/2018	Spiramycine	R*	14	Favorable
			07/06/2018	Ceftriaxone	R*	7	Favorable
	38 (16/06/18)	2	16/06/2018	Non traité	-	-	Favorable
Patient G 011295755	39 (01/07/18)	>4	01/07/2018	Céfépime	<1 (S)	7	Favorable
Patient H 026665574	-	-	16/10/2018	Amoxicilline-acide clav.	R*	2	Favorable
	51 (20/10/18)	>4	20/10/2018	Pipé-tazo	8 (S)	2	Favorable
			22/10/2018	Ceftazidime	4 (S)	5	
	52 (31/10/18)	>4	31/10/2018	Imipénème	2 (S)	2	Favorable
02/11/2018			Ceftazidime	4 (S)	14		
Patient I 04171730	-	-	10/03/2018	Céfazoline	R*	21	-
	22 (20/03/18)	>4	20/03/2018	Pipé-tazo	NR	2	Favorable
	25 (04/04/18)	4	04/04/2018	Imipénème	2 (S)	1	Décès

*Résistance naturelle ; **Phénotype rendu pour la souche clinique par le laboratoire en routine ;

NR : Non rendu ; acide clav : acide clavulanique ; pipé-tazo : pipéracilline-tazobactam

B. Sensibilité aux antibiotiques

1. Résultats rendus par le laboratoire en routine à partir d'une colonie

Les résultats des antibiogrammes réalisés par le laboratoire à partir des 14 LBA sélectionnés pour notre étude, ont été présentés dans le Tableau 6.

Au total, parmi les 14 souches étudiées en routine, 2 étaient de type « sauvage ».

Huit présentaient un phénotype de résistance de type efflux MexAB-OprM avec une résistance aux carboxypénicillines ± inhibiteur de β -lactamase et aztréonam, sans autre résistance associée.

Deux souches étaient résistantes à toutes les pénicillines (uréidopénicillines avec ou sans inhibiteur de β -lactamase) avec une sensibilité conservée pour les céphalosporines et carbapénèmes.

Deux souches étaient résistantes à la ceftazidime et au céfépime, associées à des résistances aux carboxy- et uréidopénicillines.

Seule l'une des 14 souches était résistante à l'imipénème. Concernant la ciprofloxacine, 12 souches étaient sensibles, une de sensibilité intermédiaire et une résistante, avec pour les 2, une résistance à la lévofloxacine.

Tableau 6 – Antibiogramme des isolats cliniques

Patient	Isolat	CMI – VITEK 2 [®] /E-test/UMIC																
		TIC	TCC	PIL	PTZ	CAZ	FEP	IPM	MER	TMN	GMN	AKN	CIP	LEV	CZA	C/T	TEM	COL
A	6 -	32 (R)	32 (R)	8 (S)	8 (S)	4 (S)	8 (S)	2 (S)	1 (S)	<1 (S)	8 (R)	16 (I)	0,5 (S)	2 (I)	-	-	-	-
B	3 -	32 (R)	16 (I)	8 (S)	8 (S)	4 (S)	2 (S)	2 (S)	0,5 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	-	-	-	-
	7 -	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>32 (R)	>32 (R)	<u>2</u> (S)	<u>2</u> (S)	<1 (S)	<1 (S)	4 (S)	<0,25 (S)	-	<u>32</u> (R)	-	<u>>1024</u> (R)	<u>1</u> (S)
C	10 -	32 (R)	32 (R)	8 (S)	16 (S)	4 (S)	<1 (S)	2 (S)	0,5 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	0,25 (S)	1 (S)	-	-	-	-
	16 -	64 (R)	64 (R)	16 (S)	8 (S)	4 (S)	2 (S)	2 (S)	1 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<1 (S)	0,25 (S)	1 (S)	-	-	-	-
	41 -	-	>64 (R)	>64 (R)	-	>32 (R)	32 (R)	>8 (R)	8 (R)	<1 (S)	8 (R)	16 (I)	<0,25 (S)	2 (I)	<u>>256</u> (R)	<u>>256</u> (R)	-	<u>1</u> (S)
D	19 -	32 (R)	-	<4 (S)	<4 (S)	4 (S)	<1 (S)	1 (S)	<0,25 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	0,25 (S)	1 (S)	-	-	-	-
E	24 -	16 (S)	16 (S)	8 (S)	8 (S)	2 (S)	<1 (S)	1 (S)	0,5 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	<0,25 (S)	<0,5 (S)	-	-	-	-
F	38 -	32 (R)	64 (R)	-	16 (S)	8 (S)	2 (S)	2 (S)	1 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	<0,25 (S)	0,5 (S)	-	-	-	-
G	39 -	16 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	2 (S)	<1 (S)	1 (S)	<0,25 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	<0,25 (S)	<0,5 (S)	-	-	-	-
H	51 -	-	64 (R)	16 (S)	8 (S)	4 (S)	2 (S)	2 (S)	<0,25 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	<0,25 (S)	1 (S)	-	-	-	-
	52 -	-	64 (R)	16 (S)	8 (S)	4 (S)	2 (S)	2 (S)	0,25 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	<0,25 (S)	1 (S)	-	-	-	-
I	22 -	>64 (R)	>64 (R)	64 (R)	-	<u>1,5</u> (S)	<u>3</u> (S)	2 (S)	2 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	2 (R)	4 (R)	-	<u>0,5</u> (S)	-	-
	25 -	>64 (R)	>64 (R)	32 (R)	-	-	-	2 (S)	2 (S)	<1 (S)	<1 (S)	<2 (S)	1 (I)	4 (R)	-	-	-	-

TIC : Ticarcilline ; TCC : Ticarcilline-acide clavulanique ; PIL : Pipéracilline ; PTZ ; Pipéracilline-tazobactam ; CAZ : Ceftazidime ; CEF : Céfépime ; IMP : Imipénème ; MER : Méropénème ; TMN : Tobramycine ; GMN : Gentamicine ; AKN : Amikacine ; CIP : Ciprofloxacine ; LEV : Lévofloxacine ; CZA : Ceftazidime-avibactam ; C/T : Ceftolozane-tazobactam ; TEM : Témocilline ; COL : colistine

2. Résultats des tests phénotypiques

Le résultat du dépistage phénotypique réalisé à partir des 14 groupes de 30 colonies est présenté dans le Tableau 7. Il a été mis en évidence que 6 patients (B, C, D, F, H et I) présentaient des populations hétérogènes. L'hétérogénéité de résistance aux antibiotiques concernait les patients C, D et F. Il a été constaté qu'une déficience en QS était présente pour 6 patients. L'hétérogénéité de déficience en QS a été retrouvée chez 4 patients (B, F, H et I).

Le test de dépistage de résistance aux antibiotiques a permis de confirmer les résultats rendus en routine dans 10 LBA (71 %), sans différence de résistance entre les isolats. Des variations de résistance entre colonies ont été observées dans 4 LBA (29 %) pour les patients C, D et F.

Les isolats 16, 41, et 38 possédaient à la fois, une hétérogénéité de résistances aux antibiotiques et une déficience en QS, partielle ou totale.

Pour les 5 patients avec un seul LBA, il a été constaté une hétérogénéité de la résistance à la ceftazidime pour les patients D et F. Pour le patient D, 8 isolats sur les 30 (27 %) étaient résistants et 3 isolats (10 %) pour le patient F. Pour ces 2 patients, cette diversité de phénotypes de résistance aux antibiotiques était présente alors qu'ils n'avaient pas d'antécédent d'infection à *P. aeruginosa*.

Quand il y a eu des LBA itératifs, il a été mis en évidence une hétérogénéité de résistance chez la moitié des patients (B et C). Des différences de résistance pour l'imipénème concernaient 2 LBA du patient C. Pour le LBA n°16, 21 isolats (70 %) étaient résistants, tandis que dans le LBA n°41, 14 isolats (46 %) étaient résistants à l'imipénème.

Pour la ciprofloxacine, le test de dépistage n'a pas mis en évidence de variations.

La recherche de déficience en QS par les tests d'élastase et de protéase a permis de détecter une déficience en QS au sein de 8 populations chez 6 patients. Les isolats 10, 16, 41 et 39 sont totalement déficients en QS. Les isolats 7, 38, 52 et 25 présentaient une sous-population déficiente en QS.

Patients		Durée d'intubation (jours)	Sensibilité aux antibiotiques (Nombre d'isolats S/R)			Nombre d'isolats QS+/QS-
			CAZ	IPM	CIP	
Patient A	6-	9	30/0	30/0	30/0	30/0
Patient B	3-	21	30/0	30/0	30/0	30/0
	7-	35	0/30	30/0	30/0	22/8
Patient C	10-	5	30/0	30/0	30/0	0/30
	16-	30	30/0	9/21	30/0	0/30
	41-	Trachéotomisé	0/30	16/14	30/0	0/30
Patient D	19-	32	22/8	30/0	30/0	30/0
Patient E	24-	13	30/0	30/0	30/0	30/0
Patient F	38-	8	27/3	30/0	30/0	7/23
Patient G	39-	5	30/0	30/0	30/0	0/30
Patient H	51-	4	30/0	30/0	30/0	30/0
	52-	15	30/0	30/0	30/0	21/9
Patient I	22-	21	30/0	30/0	30/0	30/0
	25-	36	30/0	30/0	30/0	7/23

Tableau 7 – Résultats des tests de dépistage pour détecter l'hétérogénéité de population

S : sensible ; R : résistant ; QS+ : Quorum sensing intact ; QS- : Déficience en Quorum Sensing

3. Antibiogrammes complémentaires à partir des populations

L'hétérogénéité de population a été explorée de façon plus approfondie par la réalisation d'antibiogrammes à partir d'isolats d'intérêt (Tableau 8).

Pour les patients avec un seul LBA, des antibiogrammes complémentaires ont été réalisés pour les patients D et F. Les isolats des populations 19 (patient D) et 38 (patient F) présentaient des variations de CMI à la piperacilline-tazobactam (de 8 mg/L ou 16 mg/L respectivement, à >64 mg/L). Il a aussi été observé des variations de CMI pour la ceftazidime (de 4 mg/L (sensible) à >32 mg/L (résistant)) et pour le céfépime (de 2 mg/L (sensible) à >32 mg/L (résistant)). Il n'y avait pas de variation pour les carbapénèmes, ni pour les quinolones et la tobramycine.

Tableau 8 – Antibiogrammes complémentaires

Patient	Isolat	PTZ	CAZ	FEP	C/T	IPM	MER	ATM	CIP	TMN
Patient A	6-1		4 (S)			2 (S)			<0,25 (S)	
Patient B	3-1		S			S			S	
	7-1	>64 (R)	64 (R)	64 (R)	6 (R)	2 (S)	16 (R)	>32 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	7-7	>64 (R)	16(R)	16 (R)	0,75 (S)	2 (S)	4 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	7-12	>64 (R)	32 (R)	16 (R)	1,5 (S)	2 (S)	1 (S)	>32 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	7-25	>64 (R)	>32 (R)	>32 (R)		2 (S)	4 (I)	>32 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
Patient C	10-1	32 (R)	4 (S)	2 (S)	0,75 (S)	2 (S)	1 (S)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	10-6	16 (S)	4 (S)	2 (S)	0,75 (S)	2 (S)	0,5 (S)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	10-18	32 (R)	4 (S)	2 (S)	0,75 (S)	1 (S)	0,5 (S)	8 (I)	<0,25 (S)	<1 (S)
	10-24	32 (R)	4 (S)	2 (S)		2 (S)	0,5 (S)	4 (I)	<0,25 (S)	<1 (S)
	16-1	32 (R)	4 (S)	4 (S)		>8 (R)	8 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	16-12	64 (R)	4 (S)	2 (S)		>8 (R)	8 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	16-18	32 (R)	4 (S)	2 (S)		>8 (R)	8 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	16-24	<4 (S)	4 (S)	2 (S)	0,75 (S)	2 (S)	0,5 (S)	16 (R)	0,5 (S)	<1 (S)
	41-1	>64 (R)	>32 (R)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	41-5	>64 (R)	>32 (R)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	41-10	>64 (R)	>32 (R)	8 (S)		1 (S)	4 (I)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
Patient D	19-1	8 (S)	4 (S)	2 (S)		2 (S)	<0,25 (S)	4 (I)	<0,25 (S)	<1 (S)
	19-2	>64 (R)	>32 (R)	>32 (R)		2 (S)	1 (S)	>32 (S)	<0,25 (S)	<1 (S)
	19-7		R			S			S	
Patient E	24-1		S			S			S	
Patient F	38-1	16 (S)	4 (S)	2 (S)		2 (S)	1 (S)	16 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	38-6	>64 (R)	> 32 (R)	> 32 (S)		2 (S)	1 (S)	>32 (R)	<0,25 (S)	<1 (S)
	38-12		R			S			S	
Patient G	39-1	8 (S)	2 (S)	1 (S)		1 (S)	<0,25 (S)		<0,25 (S)	<1 (S)
Patient H	51-1	8 (S)	4 (S)	2 (S)		2 (S)	<0,25 (S)		0,25 (S)	<1 (S)
	52-1	8 (S)	4 (S)	2 (S)		2 (S)	<0,25 (S)		<0,25 (S)	<1 (S)
Patient I	22-1	32 (R)	8 (S)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	>32 (R)	1 (I)	<1 (S)
	25-1	64 (R)	4 (S)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	>32 (R)	1 (I)	<1 (S)
	25-2	64 (R)	4 (S)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	>32 (R)	1 (I)	<1 (S)
	25-3	64 (R)	4 (S)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	>32 (R)	1 (I)	<1 (S)
	25-6	64 (R)	4 (S)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	32 (R)	1 (I)	<1 (S)
	25-15	64 (R)	4 (S)	8 (S)		2 (S)	4 (I)	>32 (R)	1 (I)	<1 (S)

R : résistant ; I : Intermédiaire ; S : sensible ; CAZ/IMP/CIP : molécules utilisées pour le dépistage

Concernant les patients qui avaient au moins 2 LBA itératifs :

- il a été constaté l'acquisition de résistances avec des variations de CMI entre 2 prélèvements, chez les patients B et C,
- il n'y a pas eu d'évolution de l'antibiogramme entre le premier et le second LBA chez les patients H et I.

D'après le dépistage, les isolats 7 du patient B présentaient des différences de CMI. Les CMI aux différentes molécules testées ont toutes augmenté par rapport au précédent LBA, sauf pour l'imipénème. Les plus grandes variations concernaient la ceftazidime (16 mg/L à 64 mg/L), le céfépime (16 mg/L à 64mg/L), le méropénème (1 mg/L à 16 mg/L) et l'association ceftolozane-tazobactam (0.75 mg/L à 6 mg/L).

Pour le patient C, les différents antibiogrammes obtenus à partir des isolats n°10 ne présentaient pas d'hétérogénéité de résistance pour les molécules complémentaires, à l'exception de l'aztréonam.

Le dépistage des isolats 16 mettait en évidence une hétérogénéité de résistance pour l'imipénème. Ces isolats avaient des CMI variables pour l'imipénème (2 mg/L (S) à >8 mg/L (R)) et pour le méropénème (0,5 mg/L (S) à 8 mg/L (I)). L'ensemble des isolats n°16 étaient résistants à l'aztréonam, ce qui n'était pas le cas des isolats 10. Les isolats 16-1, 16-12 et 16-18 étaient résistants à la pipéracilline-tazobactam alors que l'isolat 16-24 était sensible à toutes les molécules complémentaires (sauf l'aztréonam). De manière étonnante, les isolats 16 présentaient des CMI plus élevées à l'imipénème que les isolats 41.

Les isolats du LBA 41 étaient résistants à toutes les pénicillines avec des CMI qui étaient augmentées par rapport aux isolats 16. Les CMI à la ceftazidime étaient élevées (>32 mg/L) alors que pour les isolats 16, elles étaient sensibles (4 mg/L). D'un autre côté, la CMI de la souche clinique à l'imipénème (>8 mg/L) était supérieure à celles retrouvées dans les antibiogrammes complémentaires (2 mg/L) pour les isolats 41. Cette observation était en accord avec l'hétérogénéité trouvée lors du dépistage de l'isolat.

4. Adéquation des antibiothérapies administrées

Concernant la prise en charge initiale, 7 patients ont eu une antibiothérapie dans les 15 jours précédant la pneumopathie. Elle n'était pas active sur *P. aeruginosa* dans 5 cas sur 7 (70 %).

a) *Traitement probabiliste*

Au moment où le prélèvement respiratoire a été réalisé pour une suspicion clinico-radiologique de PAVM, une antibiothérapie probabiliste à plus large spectre a été mise en place dans 13 cas sur 14. Le traitement probabiliste était une monothérapie dans 9 cas et une bithérapie dans 4 cas.

La bithérapie comprenant un β -lactame s'associait à un aminoside dans 2 cas, à une fluoroquinolone dans 1 cas et à la colistine dans le dernier cas. L'association colistine et méropénème était utilisée dans un contexte de PAVM récidivante à *P. aeruginosa* multi-résistant, ce qui a permis de conserver une efficacité antibactérienne malgré la résistance au méropénème. Pour le patient F, l'absence d'élargissement du spectre antibiotique était liée à l'attente de documentation microbiologique avant l'adaptation.

A partir des antibiogrammes qui ont été réalisés en routine, le traitement probabiliste était efficace pour tous les patients avec une infection avérée ($\geq 10^4$ UFC/mL), sauf pour le LBA n°22. Étonnamment dans le cas du LBA n°22, la sensibilité à la pipéracilline-tazobactam n'a pas été rendue.

La réalisation d'antibiogrammes complémentaires montrait que la pipéracilline-tazobactam et la ceftazidime n'étaient pas efficaces sur l'ensemble de la population de *P. aeruginosa*, respectivement pour les LBA n°10 et n°19. Dans le cas du LBA n°10, il n'y avait pas de discordance de CMI ≥ 2 dilutions (16 mg/L à 32 mg/L), alors que c'était le cas pour le LBA n°19 (2 mg/L à >32 mg/L).

b) *Traitement documenté*

b) i. *Analyse sur la base des résultats fournis en routine par le laboratoire*

A partir des résultats d'antibiogrammes fournis par le laboratoire, les traitements antibiotiques ont été adaptés dans 5 cas sur 13 (LBA n°3, n°7, n°10, n°51 et n°52) correspondant à 4 patients (B, C, H). Une désescalade de l'antibiothérapie a été effectuée dans 4 cas, avec un changement pour de la ceftazidime dans 3 cas, et l'arrêt de l'antibiothérapie dans 1 cas. L'arrêt des antibiotiques était justifié par la régression des symptômes sous une antibiothérapie probabiliste non active (LBA n°22) (Tableau 5).

Dans les 12 cas où *P. aeruginosa* était considéré comme pathogène, il a été majoritairement traité par monothérapie (11 cas). Il y a eu 1 cas de bithérapie correspondant au LBA n°7. La prise en charge antibiotique était en accord avec les recommandations, avec 10 cas de monothérapie par β -lactames. Une souche était résistante à l'ensemble des β -lactames y compris les nouvelles associations de céphalosporines avec inhibiteurs justifiant sa prise en charge par colistine.

Dans le cadre des 4 cas de PAVM récidivantes, pour 3 des cas (LBA n°3, n°10 et n°51), la première PAVM était prise en charge par une antibiothérapie efficace en accord avec les résultats du laboratoire. En moyenne, le délai de survenue de la seconde PAVM était de 6 jours après l'arrêt des antibiotiques.

b) ii. *Analyse sur la base des résultats complémentaires obtenus après étude des populations*

À la suite de l'analyse des antibiogrammes pour les différents isolats, il a pu être constaté des discordances de CMI avec celles rendues par le laboratoire en routine. Ces discordances auraient pu entraîner une modification du traitement antibiotique.

Chez le patient B, le dépistage n'a pas mis en évidence d'hétérogénéité à l'imipénème. Pourtant il a été constaté des variations de CMI chez les isolats 7 pour le méropénème allant de 1 mg/L à 16 mg/L. Le méropénème a été instauré après réception de l'antibiogramme réalisé en routine avec une CMI à 2 mg/L.

Les CMI complémentaires réalisées pour les isolats 10 du patient C étaient proches/identiques à celles rendues par le laboratoire en routine. Les isolats des LBA n°16 et n°41 ont présenté une hétérogénéité de résistance à l'imipénème, avec respectivement, 70 % et 46 % des colonies résistantes. Cependant la population de *P. aeruginosa* du LBA n°16 a été traité par céfépime. Les isolats 16 n'ont pas présenté de CMI différentes pour le céfépime sur les antibiogrammes complémentaires. Pour les isolats 41, traités par méropénème et colistine, la CMI au méropénème était plus élevée sur l'antibiogramme en routine, on ne constatait donc pas de discordance.

Le patient D a été pris en charge par ceftazidime durant 10 jours avec une évolution favorable, mais d'après l'analyse de 30 isolats, 27 % étaient résistants à la ceftazidime. La CMI à la ceftazidime pour l'isolat 19-2 était >32 mg/L (résistant) alors que la CMI de la souche clinique était de 4 mg/L (sensible).

Chez le patient F, la souche clinique était sensible à la ceftazidime (16 mg/L), mais 3 isolats sur 30 étaient pourtant résistants à la ceftazidime d'après le dépistage de la population. La CMI à la ceftazidime était >32 mg/L pour l'isolat 38-6. Cependant, il n'a pas été traité car la numération bactérienne était inférieure au seuil de significativité (10^2 UFC/mL).

C. Analyse génomique des populations

L'analyse par séquençage haut débit des génomes entiers de plusieurs isolats issus de mêmes LBA, a montré que tous les patients inclus dans notre étude étaient infectés par un seul clone, y compris dans le cadre des PAVM récidivantes. Il n'y a pas eu de transmission croisée d'un clone circulant entre différents patients. Notre technique ne nous a pas permis d'étudier le matériel génétique plasmidique éventuellement porté par les isolats séquencés, et donc de rechercher une éventuelle transmission de plasmide.

Notre analyse génomique a permis de montrer que 2 des 9 patients étaient infectés par une population homogène de *P. aeruginosa* (patients A et E, à J9 et J13 de la ventilation mécanique, respectivement). Chez chacun de ces patients, les isolats analysés présentaient des génomes identiques. De façon concordante, chez chacun des 2 patients, les isolats présentaient les mêmes profils de résistance.

Chez les 7 autres patients, nous avons pu mettre en évidence des différences génétiques entre les isolats étudiés (Tableau 9) :

- 3 patients (D, F et G) avec un LBA réalisé respectivement à J31, J5 et J8 de la ventilation mécanique,
- 4 patients (B, C, H et I) avec des LBA itératifs. Chez ces patients, les populations hétérogènes étaient mises en évidence à J35, J5, J15 et J36 de la ventilation mécanique, respectivement,
- Pour 6 patients sur 7, il y a une exposition préalable aux β -lactames avant l'apparition des mutations.

Au total, l'analyse comparative des 58 génomes a permis d'identifier 22 gènes mutés dans au moins l'une des populations étudiées. Nous avons répertorié 79 mutations chez 36 isolats, allant de 0 à 4 mutations/isolat et une moyenne de 2,2 mutations/isolat (Tableau 9).

Ces gènes mutés pouvaient être répartis en 5 sous-catégories en fonction de leur effet décrit dans la littérature. Sur les 22 gènes mutés :

- 8 possèdent un rôle dans le remodelage du peptidoglycane,
- 3 possèdent un rôle dans le transport des acides-aminés,
- 2 possèdent un rôle dans la régulation transcriptionnelle,
- 2 possèdent un rôle dans le système des pili,
- 7 ont un rôle non décrit chez *P. aeruginosa*.

À la suite de l'analyse génomique, différents types de mutations ont été mis en évidence. De larges insertions ont été identifiées dans le gène *lasR*. Les mutations observées dans le gène *oprD* étaient toutes des mutations non-sens entraînant l'apparition d'un codon STOP. Les insertions/délétions et mutations non-sens responsables de la production de protéines tronquées ont été considérées comme ayant un effet majeur sur les protéines correspondantes. Pour les autres mutations (faux-sens), l'outil bio-informatique SNAP2 a permis de déterminer leur impact sous forme d'un score (0-100 %).

Après utilisation de SNAP2, 15 gènes mutés ont eu des mutations significatives. Ces 15 gènes concernaient 36 isolats. Pour ces 36 isolats, il y avait un total de 61 mutations ce qui faisait 2,2 mutations/isolat, en moyenne.

Parmi les 15 gènes, 4 gènes étaient mutés chez au moins 2 patients.

Ils correspondaient au gène *lasR* muté chez 6 patients (28 isolats), *ampD* muté chez 4 patients (7 isolats), *dacB* muté chez 2 patients (4 isolats), et *pilQ* muté chez 2 patients (3 isolats).

Les mutations identifiées dans ces 4 gènes, correspondaient à 70 % des mutations « significatives ».

Les mutations significatives potentiellement impliquées dans le développement de résistances aux antibiotiques concernaient 7 gènes (*ampC*, *ampD*, *dacB*, *mpl*, *mupP*, *ftsI* et *oprD*). Les 6 premiers gènes s'impliquaient dans le recyclage du peptidoglycane. Le dernier concernait la porine D2.

Tout d'abord pour *ampC*, la seule mutation mise en évidence concernait l'isolat 41-1. Nous avons retrouvé chez cet isolat 9 mutations différentes au total dont *ampD* et *ftsI*. Il présentait une résistance à toutes les pénicillines, les céphalosporines et l'aztréonam. Il était sensible aux carbapénèmes alors que la souche clinique était résistante aux carbapénèmes. L'effet de ces mutations était difficile à interpréter.

Pour les mutants *ampD*, les isolats 19-2, 19-7 présentaient des mutations isolées. Comparativement à l'isolat 19-1 qui était sans mutation et sensible à toutes les molécules sauf l'aztréonam, les CMI mesurées pour les isolats 19-2 et 19-7 étaient plus élevées pour les pénicillines, les céphalosporines et l'aztréonam, sans affecter les carbapénèmes.

Les isolats 7-1 et 7-25 présentaient également des mutations isolées d'*ampD*. Leurs CMI à la ceftazidime et au céfépime étaient plus élevées que pour les isolats 7-7 et 7-12 qui présentaient des mutations dans d'autres gènes impliqués dans le recyclage du peptidoglycane.

Les isolats 38-6 et 38-12, du patient F, présentaient une mutation *ampD* associée à une mutation *dacB*. En présence de ces 2 mutations, il a été constaté que la CMI aux uréidopénicillines, à la ceftazidime, au céfépime et à l'aztréonam étaient très élevées pour l'isolat 38-6. Alors que pour l'isolat 38-1 qui ne présentait pas de mutation *ampD*, ni *dacB*, il a été mis en évidence des CMI interprétées comme sensibles.

Le dernier mutant *ampD* correspondait à l'isolat 41-1. Cet isolat présentait des CMI élevées pour la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime et l'aztréonam. Il montrait des CMI sensibles pour les carbapénèmes et une CMI à la limite du cut-off de sensibilité pour le céfépime.

Des mutations *dacB* ont été détectées chez les isolats 7-12, 7-18, 38-6 et 38-12. Les isolats 7-12 et 7-18 ne présentaient pas d'autres mutations dans des gènes impliqués dans le recyclage du peptidoglycane. L'isolat 7-12 avait des CMI à 32 mg/L pour la ceftazidime, 16 mg/L pour le céfépime, >32 mg/L pour l'aztréonam et 1,5 mg/L pour le ceftolozane-tazobactam.

Les mutants 38-6 et 38-12 étaient également mutés *ampD*. L'isolat 38-6 montrait des CMI élevées pour tous les β -lactames excepté les carbapénèmes.

Il a été détecté un seul mutant *mpl*, qui correspondait à l'isolat 7-7. Il n'était pas associé à d'autres mutations sur des gènes du recyclage. Ces CMI ont été mesurées pour la ceftazidime à 16 mg/L, le céfépime à 16 mg/L, l'aztréonam à 16 mg/L et le ceftolozane-tazobactam à 0,75 mg/L. Ces mutations ont conféré une résistance à un niveau proche de l'isolat 7-12 muté *dacB*.

Pour les 3 mutants *mupP*, les isolats 10-18, 10-24 et 16-12 présentaient une résistance à la pipéracilline-tazobactam comparable.

Le mutant *ftsI* concernait encore l'isolat 41-1 qui a déjà été mentionné précédemment.

Nous avons détecté 3 types de mutation dans le gène *oprD* chez 4 isolats (D118fs, Y328* et Y399*) du patient C. Dans tous les cas, elles entraînaient la synthèse d'une protéine tronquée. Les isolats 16-1 et 16-18 (mutés Y328*) présentaient des mutations supplémentaires différentes de l'isolat 16-12 (muté D118fs). Pour autant, toutes les CMI étaient élevées pour les carbapénèmes (imipénème et méropénème) avec une sensibilité conservée pour les céphalosporines. Concernant l'isolat 41-1 (muté Y399*), il était de sensibilité intermédiaire au méropénème et sensible à l'imipénème malgré la mutation détectée dans le gène *oprD*.

Concernant le gène *lasR* du QS de *P. aeruginosa*, 3 LBA contenaient des isolats avec une large délétion de plus de 20 paires de bases dans ce gène, ce qui a été considéré comme ayant un effet majeur sur la molécule transcrite. Cette large délétion représentait 50 % des mutations de *LasR*. Les autres mutations *LasR* étaient spécifiques des isolats.

V. Discussion

P. aeruginosa est l'une des bactéries la plus fréquemment mise en cause dans les PAVM, avec une mortalité importante, même lorsque le traitement antibiotique est adéquat (66). Une antibiothérapie initiale inadaptée et/ou une multirésistance fréquente chez cette espèce augmentent le risque de mortalité (67). Le diagnostic de ces infections et l'adaptation de l'antibiothérapie reposent sur des recommandations européenne (68) et française (62). Du fait du manque d'études, il n'y a pas de recherche particulière de sous-populations bactériennes aux comportements différents lors du diagnostic.

Dans notre étude, nous avons étudié l'hétérogénéité de populations de *P. aeruginosa* responsables d'infections aiguës de type PAVM chez des patients hospitalisés en réanimation, à l'aide de tests phénotypiques dans un premier temps, puis par séquençage haut-débit d'isolats sélectionnés.

Nous avons sélectionné des colonies de morphotypes différents. Cette approche avait pour objectif de mettre en évidence des sous-populations de *P. aeruginosa* présentes dans les prélèvements respiratoires. La présence d'hétérogénéité de population a été retrouvée dans les 2/3 des LBA. Une déficience en QS a été observée chez 6 patients et elle était hétérogène chez 66 % d'entre-eux. Deux patients présentaient une hétérogénéité de résistance aux antibiotiques et une déficience en QS, partielle ou totale.

Le laboratoire de bactériologie du CHU de Nantes suit les recommandations officielles éditées par le CA-SFM/EUCAST. La réalisation des CMI au laboratoire par la méthode semi-automatisée en milieu liquide (Vitek 2 ®) et la méthode de gradient de concentration (E-test ®) sont des techniques validées par rapport à la technique de référence de microdilution en milieu liquide. Elles nécessitent une concentration bactérienne calibrée à 0,50 unités MacFarland issue de colonies qui ont poussé sur un milieu non sélectif. En pratique, pour obtenir la suspension bactérienne de 0,50 unités MacFarland, il est utilisé seulement quelques colonies, voir une seule. Pour étudier la présence d'hétérogénéité de résistance du *P. aeruginosa*, nous avons tout d'abord réalisé un test de dépistage. En reprenant les 30 mêmes colonies par LBA, nous avons testé leur sensibilité à la ceftazidime, à l'imipénème et à la ciprofloxacine. Nous avons pu observer une hétérogénéité de la résistance chez 4 populations (29 %), parmi les 14 sélectionnées pour notre étude.

Au total, grâce au dépistage chez plus de 1/3 des patients, une hétérogénéité de population a été mise en évidence. Cette hétérogénéité de résistance aux antibiotiques était plus ou moins marquée, variant de 10 à 70 % de la population. Elle touchait les β -lactames qui sont des molécules de choix utilisées dans le traitement du *P. aeruginosa*. Cette hétérogénéité de résistance était surtout retrouvée quand les patients avaient été préalablement traités par β -lactames dans les jours précédents. Du fait de l'hétérogénéité, une situation aurait pu mettre en doute l'efficacité du traitement choisi sur la base de l'antibiogramme réalisé à partir d'une seule colonie (LBA n°19). Malgré l'utilisation de la méthode officielle, il n'a pas été détecté de résistance à la ceftazidime. Ces résultats suggèrent qu'il semblerait intéressant de prendre plusieurs colonies pour obtenir l'antibiogramme le plus proche de l'ensemble de la population bactérienne. Malgré cela, la surveillance clinique du patient reste primordiale pour optimiser sa prise en charge qui peut nécessiter des examens biologiques complémentaires.

Les résistances phénotypiques ont été confirmées par la mise en évidence de mutations dans des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Ces gènes mutés étaient impliqués soit dans la dérégulation d'AmpC, soit dans la perte de la porine OprD ou dans la régulation du QS.

La dérégulation d'AmpC est étroitement liée au recyclage du peptidoglycane chez *Pseudomonas aeruginosa*. Dans notre étude, il a été mis en évidence des protéines mutées (AmpC, AmpD, DacB, FtsI, Mpl, MupP et AnmK) qui sont impliquées dans le recyclage du peptidoglycane (60).

La production constitutive d'AmpC a d'abord été décrite chez *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*. Un système similaire a ensuite été décrit chez *P. aeruginosa* avec des mutations inactivatrices d'AmpD responsables de l'hyperproduction d'AmpC (69). Cette inactivation s'est avérée assez courante parmi les souches cliniques de *P. aeruginosa* et elle entraîne une altération du recyclage du peptidoglycane comparable au phénomène d'induction par la présence d'antibiotiques. Les 2 phénomènes saturent AmpD et aboutissent à la surproduction d'AmpC.

Pour autant, les mutations mises en évidence dans le gène *ampD* par Taimour Yousef Langae et al. dans une étude publiée en 2000, n'expliquaient pas tout. Ils soupçonnaient la présence de mutations dans des gènes aux fonctions inconnues à l'époque (69).

Par la suite, il a été décrit différents gènes *ampD* (70). Trois enzymes de type AmpD ont été caractérisées : AmpD, AmpDh2 et AmpDh3. Dans l'étude de Juan et al, 4 phénotypes de résistance ont été décrits où *ampD* était principalement responsable de l'hyperpression d'*ampC*, puis *ampDh3* et enfin *ampDh2* (70). Ces résultats vont dans le sens que toutes les mutations d'*ampD* n'entraînent

pas les mêmes niveaux de dérépression d'*ampC*. Cependant, ces observations n'ont pas été faites à partir de souches cliniques (29).

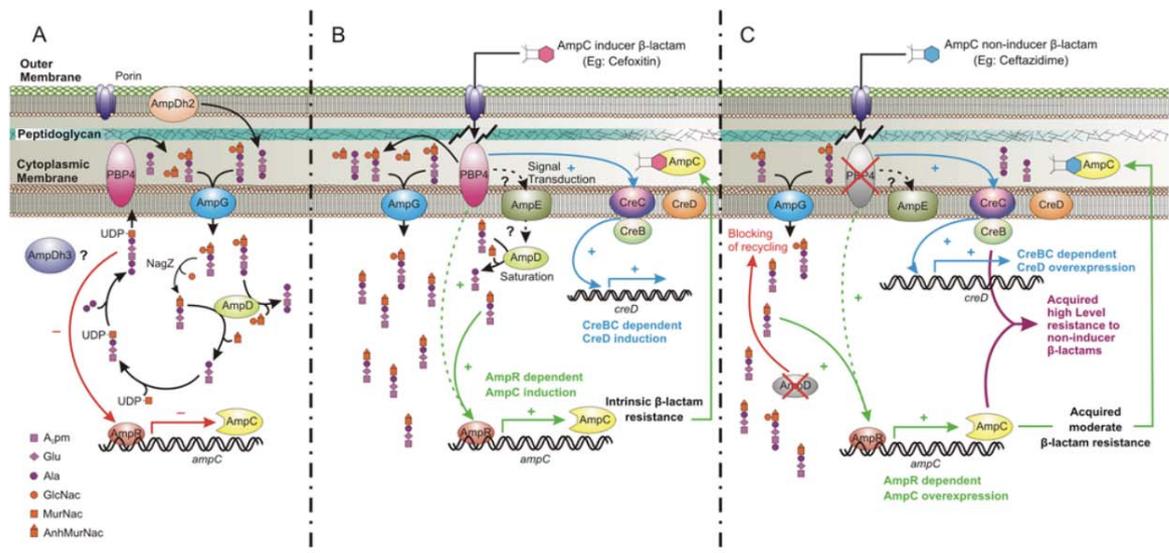
Pour nos souches cliniques, il y a eu apparition de populations mutantes *ampD* chez plus de 40 % des patients. Pour les isolats avec une mutation d'*ampD* isolée, il a été constaté des CMI pour les pénicillines et les céphalosporines élevées (>32 mg/L). Il n'y a pas de mise en évidence de mutations pour *AmpDh2* et *AmpDh3*.

Dans notre étude le gène *dacB*, codant pour une PLP4, était détecté muté chez 2 patients. Chez le patient B, l'isolat 3-1 ne présentait pas de mutations. Cet isolat était sensible à toutes les molécules du dépistage. Lorsque cette souche a été responsable d'une seconde PAVM (LBA n°7), il a été objectivé des mutations. L'isolat 7-12 présentait une mutation de *dacB* sans autre mutation impliquant le recyclage du peptidoglycane. Pour cet isolat, on a constaté des CMI élevées, comparables (sauf pour le céfépime) à l'isolat 7-1 qui est muté *ampD*. Il semblerait ici que la mutation *dacB* entraîne une augmentation des CMI comparable à celle liée à la mutation *ampD*. Les autres isolats mutés *dacB* (38-6 et 38-12) présentaient également une mutation *ampD*. D'après la littérature, des mutations dans ce gène ont été décrites comme responsables de l'hyperproduction d'AmpC (30,71). Ainsi, dans l'étude de Gabriel Cabot et al. en 2018 (72), à partir de la souche de référence PAO1, ce lien fort entre les PLP4 et AmpC a été constaté. Les auteurs ont comparé PAO1 sauvage à 2 souches dérivées mutées, soit dans le gène *ampC*, soit dans le gène *ampG*, avec aussi un phénotype « sauvage » de résistance aux antibiotiques. Après exposition *in vitro* à de la ceftazidime, ils ont comparé l'évolution de leurs phénotypes de résistance et les divers mécanismes acquis. Les mutations les plus souvent observées chez PAO1 touchaient *dacB +/- ampD* ou *mpl*. Dans ces conditions, l'expression d'AmpC était multipliée par 3905 en moyenne. Il n'a pas été retrouvé de mutations dans les gènes impliqués dans la régulation d'AmpC ou AmpG. A noter, l'augmentation des CMI pour l'imipénème et le méropénème pour ces souches qui sont devenues résistantes.

Pour confirmer l'importance des mutations *dacB* dans la résistance aux β -lactames, Joseph F. Cavallari et al.,(71) ont comparé les profils de résistance de 5 souches mutées dans 5 gènes différents (*sltB1*, *mltB*, *slt*, *mltF* et *dacB*). Parmi ces 5 cibles, 4 étaient des transglycosylases lytiques (LT) (*sltB1*, *mltB*, *slt* et *mltF*). Les auteurs ont montré que les mutants *dacB*, *sltB1* et *mltB*, étaient plus résistants que les autres aux β -lactames. Cependant, en l'absence d'antibiotiques inducteurs d'AmpC, l'expression de cette céphalosporinase était augmentée uniquement chez la souche mutante *dacB* et pas pour les souches LT mutées.

Ainsi, l'inactivation de la PLP4 provoquerait une réponse très marquée et complexe aboutissant à la surproduction d'AmpC et donc à la résistance aux β -lactamines. Ce phénomène serait lié à l'activation spécifique du système de régulation à 2 composants CreBC (connu sous le nom de BlrAB chez *Aeromonas* spp.). L'activation de CreBC entraîne une surexpression de *CreD*. Cette surexpression a été clairement mise en lien avec la surproduction d'AmpC mais par un mécanisme encore inconnu (73).

Figure 21- Régulation d'AmpC par le système CreBC (73)



Laura Zamorano et al. en 2010 (74), ont étudié l'expression d'*AmpC* chez 10 souches différentes (1 PAO1, 1 PA14 et 8 souches cliniques sensibles à la ceftazidime, non mutées dans *dacB* et *ampD*) avant et après inactivation de ces 2 gènes. L'expression d'*ampC* était multipliée par 106 en moyenne chez les mutants *dacB*, et par 67 en moyenne pour les mutants *AmpD*, sans différence significative entre les 2 gènes. Les auteurs ont aussi constaté que les CMI des pénicillines et des céphalosporines étaient plus élevées chez les mutants *dacB* que chez les mutants *ampD*. Contrairement à la mutation *dacB*, la mutation *ampD* ne modifiait pas l'expression de *CreD* ce qui, pour les auteurs, expliquait la différence de CMI pour les β -lactames.

Le gène *ftsI* (aussi appelé *pbpB*) code pour la PLP3 (ou *ftsI*). La PLP3 est une PLP-HPM, avec une activité transpeptidase principalement. Cette activité semble nécessaire pour la croissance de *P. aeruginosa*. Dans des conditions de laboratoire, une première étude des PLP-FPM (75), à partir de mutants déficients en PLP4, PLP5 ou PLP7 (simple, double ou triple mutants), n'a pas mis en évidence de perturbations de la vitesse de croissance chez ces souches. Une seconde étude qui s'est intéressée aux PLP-HPM (76), a mis en évidence que seule la mutation des PLP3 avait un impact sur la croissance bactérienne *in vitro*, alors que les mutants simples PLP1a, PLP1b ou PLP2 n'étaient pas

impactés. Du fait de leur importance pour la croissance *in vitro*, les mutations inactivatrices de *ftsI* ne semblent pas être un avantage pour la bactérie. En revanche, les mutations non-synonymes, entraînant un changement d'acide aminé, semblent être liées à la résistance aux β -lactames. Leur fréquence est pour l'instant mal déterminée.

Cette PLP est la cible de nombreux β -lactames, comme l'aztréonam (77), la ceftazidime, le ceftolozane (78), le céfépime et les carbapénèmes (76). Généralement la résistance à l'aztréonam est associée à un mécanisme d'efflux MexAB-OprM (47). Dans une étude récente où les auteurs se sont intéressés à l'acquisition de résistance à l'aztréonam, il a été décrit 19 mutations récurrentes en lien avec cette résistance (77). Ces mutations touchaient principalement des régulateurs ayant un effet inhibiteur sur la pompe d'efflux MexAB-OprM (*mexR* et *nalD*), mais aussi les PLP3, correspondant à la principale cible de l'aztréonam (79). Parmi les 100 isolats de l'étude, 28 étaient mutés *ftsI*, avec principalement des mutations faux-sens. Les mutations se localisaient au niveau du site d'action des β -lactames (77). Des résultats similaires ont aussi été décrits chez *Escherichia coli* (80). Ils ont aussi confirmé, pour *P. aeruginosa*, que l'acquisition de résistance à l'aztréonam impacte la vitesse de croissance des colonies *in vitro*. Par ailleurs, dans le modèle de sélection de souches résistantes à l'aztréonam, les auteurs ont aussi constaté que les gènes *mexR* et *nalD* étaient responsables d'une augmentation de la virulence des souches (77). L'hypothèse que les mutations de PLP3 soient un mécanisme pourvoyeur de résistance chez *P. aeruginosa* a aussi été mise en évidence chez des isolats issus de portage chronique chez des patients atteints de mucoviscidose (52). Dans ce contexte, des mutations non-synonymes ont été décrites au niveau du domaine de l'activité transpeptidase et mises en lien avec la résistance aux β -lactames.

Dans l'étude de Jorth et al (77), les polymorphismes dans le gène *ftsI* étaient essentiellement détectés chez les patients exposés aux β -lactames. L'augmentation des CMI était strictement liée aux polymorphismes de *pbpB*, puisque aucun autre mécanisme de résistance n'était mis en évidence (hyperproduction d'AmpC, BLSE et/ou hyper-expression de *mexA*). Ce mécanisme de résistance touche *a priori* aussi le ceftolozane, d'après une étude de 2017 réalisée en Espagne (81). Les auteurs de cette étude ont constaté qu'en l'absence d'hyperproduction d'AmpC ou en l'absence de BLSE, la CMI au ceftolozane-tazobactam était augmentée à 8 mg/L et serait en lien avec une mutation retrouvée au niveau du site de liaison aux β -lactames dans la protéine FtsI. Dans notre étude, la mutation non synonyme identifiée chez un isolat (41-1) du patient C, était associée à de nombreuses autres mutations dans les gènes *ampC*, *ampD* et *lasR*, ce qui ne nous a pas permis d'estimer son impact sur la résistance. Cependant, la mutation identifiée dans notre étude n'était pas située au niveau du

site d'action de la protéine et n'avait donc probablement pas le même impact que celle décrite en 2017.

Le gène *mpl* (murein peptide ligase) code pour une enzyme qui intervient dans le recyclage du peptidoglycane. L'enzyme Mpl permet principalement de lier l'UDP-MurNAc avec un tripeptide pour former de l'UDP-MurNAc-tripeptide. Elle prend aussi en charge les tétra- et pentapeptides. Ce métabolite va activer AmpR et donc inhiber *ampC* (82). L'impact de mutations *mpl* a été étudié par l'équipe de Yuko Tsutsumi et al., en 2013 (83) chez PAO1. Ils ont mis en évidence que l'inactivation de *mpl* était responsable d'une augmentation de l'expression d'*ampC*, par l'intermédiaire d'AmpR, ce qui a eu pour conséquence l'augmentation des CMI aux β -lactames. Dans 2 études récentes (84,85) étudiant les mutations génétiques survenant chez *P. aeruginosa* au cours d'infections aiguës, des souches mutantes *mpl* ont été identifiées. Elles semblaient, dans certains cas, être responsables de l'augmentation des CMI pour la pipéracilline-tazobactam et la ceftazidime. Dans notre étude, seul l'isolat 7-7 est muté *mpl*. Il présentait des CMI résistantes à la ceftazidime (16 mg/L) et au céfépime (16 mg/L) ce qui n'était pas le cas de l'isolat 3-1. Cependant les isolats 7-1, 7-25 mutés *ampD* et l'isolat 7-12 muté *dacB* avaient des CMI plus élevées pour la ceftazidime et le céfépime. Même si cette mutation semble être responsable d'une augmentation des CMI vis-à-vis des céphalosporines, cette mutation aurait moins d'impact que les mutations de *dacB* et d'*ampD*.

La voie de signalisation MurU, décrite en 2014, est composée par les enzymes AnmK, AmgK et MurU. Elle sert de raccourci et limite la synthèse *de novo* d'UDP-MurNAc (86). En 2017, il a été découvert l'intervention de l'enzyme MurNAc-6P phosphatase (MupP) dans cette voie (87). MupP est une phosphatase dont le rôle est de convertir le MurNAc-6P en MurNAc. D'après les expériences de Fumeaux et al., des mutations inactivatrices de la voie de signalisation MurU entraînent une augmentation d'AmpC en lien avec l'activité d'AmpR. Les auteurs ont avancé l'hypothèse que lorsque la voie de signalisation MurU était mutée, cela induisait une diminution d'UDP-MurNAc-P5. La balance entre UDP-MurNAc-P5 et anhydro-MurNAc va être déplacée, induisant une activation d'AmpR responsable de l'hyper-expression d'AmpC. Dans leur étude, ils n'ont pas approfondi les liens avec la résistance vis-à-vis des β -lactames. Dans notre étude, les seuls isolats (10-18 et 10-24) mutés *mupP* ne présentaient pas d'augmentation de CMI aux β -lactames. Il semblerait intéressant de voir l'impact réel des mutants *mupP* sur les CMI des β -lactames.

L'exploration de ces différents mécanismes a surtout pris de l'ampleur durant ces 15 dernières années et encore plus avec le séquençage haut-débit. Mieux les comprendre pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Les mutations impliquées apparaissent sous pression de sélection des antibiotiques. Dans notre étude, la principale classe d'antibiotique utilisée pour la prise en charge des PAVM était les β -lactames. Il semble donc logique, que l'on ait retrouvé essentiellement des mutations qui octroyaient des résistances aux β -lactames.

Pour limiter l'apparition des résistances aux β -lactames, 2 stratégies ont été proposées par les sociétés savantes. La première consiste à traiter les patients par bithérapie, stratégie souvent privilégiée. Cependant, l'association synergique de β -lactames avec un aminoside ne permet pas toujours de prévenir l'émergence de résistance (47). La combinaison imipénème-lévofloxacine semble prévenir l'émergence de résistance, mais elle nécessite d'être confirmée (47).

La seconde stratégie repose sur les notions de pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD). Cette approche est souvent moins réalisée en pratique clinique mais elle est décrite dans la littérature. Les β -lactames sont des molécules bactéricides, avec un effet temps dépendant. L'efficacité de l'antibiothérapie par β -lactames dépend de l'inoculum bactérien et du temps que l'antibiotique libre passe au lieu de l'infection au-dessus de la CMI (88). Des études cliniques rétrospectives suggèrent qu'il faudrait une concentration au minimum 4 fois supérieure à la CMI entre 2 injections pour prévenir l'émergence de mutants résistants. Dans le cas d'une PAVM, l'inoculum peut être élevé (environ 10^8 UFC/mL) et l'apparition de résistance se fait dès que la concentration sanguine résiduelle est inférieure à 4 fois la CMI de la souche (89). Le traitement clinique par antibiotique a pour objectif la guérison clinique. Ce n'est pas le même objectif que la prévention d'apparition de mutants résistants. Pour prévenir l'émergence de mutants, il faut une concentration sanguine supérieure à la CMI du pathogène au moins 45 % du temps entre 2 injections ou une concentration résiduelle 12 fois supérieure à la CMI (89). La posologie d'antibiotique pour éviter l'émergence de résistance aux β -lactames est plus importante que celle nécessaire à l'efficacité thérapeutique (89). Dans l'étude de Robert et al., 60,4 % des patients en soins intensifs étaient 100 % du temps entre 2 injections avec une concentration résiduelle supérieure à la CMI de la souche (88). Les conditions PK/PD sont plus altérées pour les patients en soins intensifs, avec un volume de distribution augmenté, une concentration d'albumine diminuée et un débit de filtration glomérulaire augmenté (88). Ainsi, les doses habituelles ne sont pas suffisantes pour ce type de patients et il est nécessaire d'augmenter les posologies pour empêcher l'émergence de résistances y compris aux β -lactames (88). Dans une étude sur les carbapénèmes (90), il a été mis en évidence que les CMI des BGN étaient plus élevées pour les patients en soins intensifs que pour les autres. Pour eux, du fait des

variations PK/PD des patients en soins intensifs et de l'augmentation des CMI des pathogènes, il serait plus difficile d'obtenir les conditions nécessaires pour traiter les patients et empêcher l'émergence de résistances aux antibiotiques. En effet, la description récente de souches de *P. aeruginosa* résistantes à de nouvelles molécules telles que le ceftolozane-tazobactam ou le ceftazidime-avibactam (91) laisse supposer qu'une optimisation des paramètres PK/PD semblerait être une alternative thérapeutique intéressante. Cela ayant pour objectif de limiter l'utilisation précoce de nouvelles molécules qui conduirait indéniablement à l'émergence de résistances.

La pression de sélection liée aux conditions de l'infection et à l'utilisation d'antibiotiques entraîne la sélection de mutations. Cela amène logiquement à la survie de populations résistantes aux antibiotiques utilisés. On constate aussi que d'autres protéines bactériennes sans lien avec la résistance peuvent être mutées et en l'occurrence la voie de signalisation LasI/R. Elle participe à la régulation du QS avec 2 autres voies, RhlR et PQS. La voie LasI/R est la voie principale de régulation des différentes protéines de virulence telles que LasA, LasB, l'ExoA, la pyocyanine et les exopolysaccharidiques (92).

Dans notre étude, parmi les 7 patients présentant des isolats mutés, 6 étaient infectés par des mutants LasR. L'étude de Persyn et al., a permis de montrer que ce phénomène était aussi courant en contexte aigu. Pour ce travail de Thèse, des populations déficientes en QS ont été délibérément choisies pour faire l'analyse génomique, d'où la prévalence élevée de mutants LasR. Les travaux antérieurs du laboratoire montrent cependant qu'environ la moitié des LBA positifs à *P. aeruginosa*, collectés chez des patients présentant une pneumonie aiguë, contiennent des isolats déficients en QS. Ces mutations semblent contre-intuitives, puisqu'elles entraîneraient une diminution de la virulence des souches *in vitro* (35,36).

Cependant, lorsque l'on regarde les mutations des souches issues de patients porteurs chroniques de *P. aeruginosa*, essentiellement chez les patients atteints de mucoviscidose, des mutants *lasR* sont souvent retrouvés (93,94). Ces derniers sont également décrits dans un contexte de PAVM (95). Les 2 principales hypothèses expliquant la présence de ces mutants *lasR* sont que toutes les mutations n'inactivent pas LasR et que le QS s'est réorganisé (96). D'autres voies du QS (RhlR ou PQS) régulant les mêmes gènes que la voie LasI/R, peuvent être hyperexprimées lorsque cette voie LasI/R est inactive. (96). Ces mécanismes de régulation complexes font l'objet de beaucoup de travaux de recherche, et mériteront d'être encore mieux compris, du fait de leur importance dans les pneumopathies.

VI. Conclusion

P. aeruginosa est l'un des pathogènes le plus fréquemment retrouvé dans les PAVM chez des patients hospitalisés dans les services de réanimations. Ces PAVM sont généralement d'acquisitions tardives (>5 jours) et nécessitent une prise en charge par antibiothérapie à large spectre, au moins en probabiliste. La présence d'un ou plusieurs facteurs de risque d'infection à BGN non fermentant nécessite la prise en charge par bithérapie pour optimiser la prise en charge thérapeutique. Le diagnostic d'une PAVM à *P. aeruginosa* doit être suspectée notamment chez les patients atteints d'une pathologie pulmonaire chronique de type BPCO, DDB ou mucoviscidose. Une fois le germe documenté, une monothérapie adaptée a la même efficacité clinique qu'une bithérapie adaptée. L'allongement de la durée du traitement antibiotique au-delà de 7 jours n'est pas recommandé en dehors de certaines situations. Les traitements recommandés concernent principalement les β -lactames associés à un aminoside.

Nous avons décidé d'explorer la diversité génomique du *P. aeruginosa* dans un contexte aigu, à ce jour peu décrit dans la littérature, alors qu'il est relativement bien développé dans le contexte de la mucoviscidose.

Dans notre étude, les 2/3 des patients présentaient des souches mutées dans le gène *lasR*. C'est l'un des 3 composants majeurs du QS et le plus important lors de la phase d'invasion du *P. aeruginosa*. Ces mutations semblaient contre-intuitives car elles sont habituellement associées à une diminution de virulence. Pour autant, au vue de la fréquence de ces mutations et des données de la littérature, il paraît pertinent d'explorer ces mutations et l'impact qu'elles ont sur le QS et la pathogénicité du *P. aeruginosa*. Ce sera le cadre d'un prochain travail.

Il a aussi été mis en évidence que plus de 40 % des LBA sélectionnés contenaient une population de *P. aeruginosa* avec une hétérogénéité de résistance aux principaux antibiotiques habituellement prescrits dans ce contexte.

Du fait de l'hétérogénéité de résistance, il a parfois été rendu en routine un antibiogramme avec des CMI plus basses que celles mesurées pour certains isolats présents dans le prélèvement. Dans notre étude, le traitement antibiotique par bithérapie ou monothérapie a toujours permis de satisfaire la réussite clinique que cela soit en probabiliste ou après documentation. De ce fait, l'expérience de la prise en charge de PAVM et l'ajustement du traitement en fonction de l'état du patient est essentiel.

Les mutations mises en évidence permettent l'acquisition de résistances aux molécules principalement utilisées, c'est à dire aux β -lactames. Ce qui ressort de cette étude est la dérégulation de mécanismes de résistance intrinsèques de *P. aeruginosa* (la céphalosporinase AmpC et les porines OprD). La dérégulation d'AmpC est étroitement liée au recyclage du peptidoglycane. En effet, la perte d'activité de certaines enzymes dans le recyclage du peptidoglycane a été identifiée chez différentes souches en lien avec une augmentation des CMI. Les gènes les plus pertinents ici et les mieux décrits dans la littérature sont *ampD*, *dacB*, *mpl* et *ftsI*. La perte de la porine OprD, à la suite d'une mutation d'*oprD*, est aussi retrouvée avec pour conséquence l'augmentation des CMI aux carbapénèmes.

Ce travail montre que des populations hétérogènes de *P. aeruginosa* peuvent exister en contexte aigu. Nos résultats ont montré l'apparition précoce de mutations génétiques hétérogènes. La chronicisation de l'infection serait le résultat d'une probable sélection au sein de ces mutations qui résulterait de la meilleure balance coût/efficacité pour la survie bactérienne. Il serait intéressant de réaliser ce travail sur une plus large cohorte de souches responsables de PAVM pour ainsi déterminer si l'apparition de certaines mutations est en lien avec la durée de la ventilation mécanique. Il pourrait être pertinent d'étudier l'impact des mutations sur le coût en énergie pour le *P. aeruginosa* qui est un facteur de sélection, en plus de l'acquisition de résistances aux antibiotiques. Le contexte de PAVM récidivantes semblerait être approprié pour observer la sélection de mutants résistants.

VII. Bibliographie

1. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens Disease*. avr 2013;67(3):159-73.
2. Savey A. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-Raisin, France. Résultats 2017. :82.
3. SPF. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017 [Internet]. [cité 3 août 2020]. Disponible sur: /import/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-mai-juin-2017
4. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. janv 2015;6(1):26-41.
5. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 15 févr 2017 [cité 15 avr 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00039/full>
6. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30 mai 2006;103(22):8487-92.
7. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. févr 2006;36(2):78-91.
8. Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P. Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mars 2018;197(6):708-27.
9. Ernst RK, Moskowitz SM, Emerson JC, Kraig GM, Adams KN, Harvey MD, et al. Unique Lipid A Modifications in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from the Airways of Patients with Cystic Fibrosis. *J INFECT DIS*. oct 2007;196(7):1088-92.
10. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens* [Internet]. 19 déc 2019 [cité 21 août 2020];9(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168646/>
11. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*. déc 2010;300(8):534-43.
12. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*. déc 2004;72(12):6969-77.

13. Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Annales de biologie clinique*. juill 2011;69(4):393-403.
14. Hall A, Nobes CD. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*. 29 juill 2000;355(1399):965-70.
15. Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem*. 17 déc 1999;274(51):36369-72.
16. Krall R, Sun J, Pederson KJ, Barbieri JT. In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun*. janv 2002;70(1):360-7.
17. Ganesan AK, Frank DW, Misra RP, Schmidt G, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem*. 27 mars 1998;273(13):7332-7.
18. Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun*. mars 2005;73(3):1695-705.
19. Nadal Jimenez P, Koch G, Papaioannou E, Wahjudi M, Krzeslak J, Coenye T, et al. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology (Reading, Engl)*. janv 2010;156(Pt 1):49-59.
20. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 mai 2002;99(10):7072-7.
21. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JAG, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol*. 1 janv 2012;188(1):386-93.
22. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol*. avr 2003;28(4):528-37.
23. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27091.
24. Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. févr 2005;288(2):L409-418.

25. Engel LS, Hill JM, Moreau JM, Green LC, Hobden JA, O'Callaghan RJ. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* mars 1998;39(3):662-5.
26. Kudoh I, Wiener-Kronish JP, Hashimoto S, Pittet JF, Frank D. Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *Am J Physiol.* nov 1994;267(5 Pt 1):L551-556.
27. Miyazaki S, Matsumoto T, Tateda K, Ohno A, Yamaguchi K. Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol.* sept 1995;43(3):169-75.
28. Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol.* juill 1991;71(1):317-21.
29. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiology Reviews.* 1 nov 2017;41(6):781-815.
30. Aguilera Rossi CG, Gómez-Puertas P, Ayala Serrano JA. In vivo functional and molecular characterization of the Penicillin-Binding Protein 4 (DacB) of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* déc 2016;16(1):234.
31. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* janv 1994;176(2):269-75.
32. Barr HL, Halliday N, Cámara M, Barrett DA, Williams P, Forrester DL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* oct 2015;46(4):1046-54.
33. Jaffar-Bandjee MC, Lazdunski A, Bally M, Carrère J, Chazalotte JP, Galabert C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* avr 1995;33(4):924-9.
34. Choi Y, Park H-Y, Park SJ, Park S-J, Kim S-K, Ha C, et al. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells.* juill 2011;32(1):57-65.
35. Feng L, Xiang Q, Ai Q, Wang Z, Zhang Y, Lu Q. Effects of Quorum Sensing Systems on Regulatory T Cells in Catheter-Related *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection Rat Models [Internet]. Vol. 2016, *Mediators of Inflammation*. Hindawi; 2016 [cité 27 juill 2020]. p. e4012912. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/4012912/>
36. Nelson LK, D'Amours GH, Sproule-Willoughby KM, Morck DW, Ceri H. *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems are important for infection and inflammation in a rat prostatitis model. *Microbiology.* 2009;155(8):2612-9.

37. Leid JG. Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses. 2009;5.
38. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 mai 2015;34(5):877-86.
39. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. sept 2010;8(9):623-33.
40. Stempel N, Neidig A, Nusser M, Geffers R, Vieillard J, Lesouhaitier O, et al. Human Host Defense Peptide LL-37 Stimulates Virulence Factor Production and Adaptive Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*. 13 déc 2013;8(12):e82240.
41. Overhage J, Schemionek M, Webb JS, Rehm BHA. Expression of the *psl* Operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms: *PslA* Performs an Essential Function in Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol*. 1 août 2005;71(8):4407-13.
42. Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GCL, et al. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*. 27 janv 2011;7(1):e1001264.
43. Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PNAS*. 8 sept 2015;112(36):11353-8.
44. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. 1 juill 2015;21-22:41-59.
45. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:17-38.
46. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 1989;33(11):1831-6.
47. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *CMR*. oct 2009;22(4):582-610.
48. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*,. 2009;58(9):1133-48.
49. Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular Mechanisms of β -Lactam Resistance Mediated by AmpC Hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER*. 2005;49:6.
50. Sonnabend MS, Klein K, Beier S, Angelov A, Kluj R, Mayer C, et al. Identification of Drug Resistance Determinants in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* by High-Density Transposon Mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 9 déc 2019;64(3):e01771-19, /aac/64/3/AAC.01771-19.atom.

51. Poole K. *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 [cité 31 juill 2020];2. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00065/full>
52. Clark ST, Sinha U, Zhang Y, Wang PW, Donaldson SL, Coburn B, et al. Penicillin-binding protein 3 is a common adaptive target among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from adult cystic fibrosis patients treated with β -lactams. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 mai 2019;53(5):620-8.
53. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 juin 2007;13(6):560-78.
54. SF2H_surveiller-et-prevenir-les-IAS-2010.pdf [Internet]. [cité 3 août 2020]. Disponible sur: https://www.sf2h.net/wp-content/uploads/2010/09/SF2H_surveiller-et-prevenir-les-IAS-2010.pdf
55. Torres A, Ferrer M, Badia JR. Treatment guidelines and outcomes of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1 août 2010;51 Suppl 1:S48-53.
56. Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci* [Internet]. 15 févr 2019 [cité 5 août 2020];20(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6412348/>
57. Chastre J, Fagon J-Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 avr 2002;165(7):867-903.
58. Guagliardo R, Pérez-Gil J, De Smedt S, Raemdonck K. Pulmonary surfactant and drug delivery: Focusing on the role of surfactant proteins. *Journal of Controlled Release*. 10 déc 2018;291:116-26.
59. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*. oct 2010;15(7):1037-56.
60. Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. juill 2011;32(7):687-99.
61. Schmiedl A, Kerber-Momot T, Munder A, Pabst R, Tschernig T. Bacterial distribution in lung parenchyma early after pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Tissue Res*. oct 2010;342(1):67-73.
62. Pneumonies associées aux soins de réanimation - La SFAR [Internet]. Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. 2017 [cité 3 août 2020]. Disponible sur: <https://sfar.org/pneumonies-associees-aux-soins-de-reanimation/>
63. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 nov 2017;36(11):1999-2006.

64. Garnacho-Montero J, Sa-Borges M, Sole-Violan J, Barcenilla F, Escoreca-Ortega A, Ochoa M, et al. Optimal management therapy for *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: an observational, multicenter study comparing monotherapy with combination antibiotic therapy. *Crit Care Med.* août 2007;35(8):1888-95.
65. Martínez JA, Cobos-Trigueros N, Soriano A, Almela M, Ortega M, Marco F, et al. Influence of empiric therapy with a beta-lactam alone or combined with an aminoglycoside on prognosis of bacteremia due to gram-negative microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2010;54(9):3590-6.
66. Kollef MH, Chastre J, Fagon J-Y, François B, Niederman MS, Rello J, et al. Global Prospective Epidemiologic and Surveillance Study of Ventilator-Associated Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa**. *Critical Care Medicine.* oct 2014;42(10):2178–2187.
67. Micek ST, Wunderink RG, Kollef MH, Chen C, Rello J, Chastre J, et al. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. *Crit Care [Internet].* 2015 [cité 14 sept 2020];19(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446947/>
68. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *European Respiratory Journal [Internet].* 1 sept 2017 [cité 13 août 2020];50(3). Disponible sur: <https://erj.ersjournals.com/content/50/3/1700582>
69. Langaee TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the ampD Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Leads to Moderate-Basal-Level and Hyperinducible AmpC β -Lactamase Expression. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2000;44(3):583-9.
70. Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A. Stepwise Upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Chromosomal Cephalosporinase Conferring High-Level β -Lactam Resistance Involves Three AmpD Homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2006;50(5):1780-7.
71. Cavallari JF, Lamers RP, Scheurwater EM, Matos AL, Burrows LL. Changes to Its Peptidoglycan-Remodeling Enzyme Repertoire Modulate β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2013;57(7):3078-84.
72. Cabot G, Florit-Mendoza L, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Oliver A. Deciphering β -lactamase-independent β -lactam resistance evolution trajectories in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal*

- of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 5 sept 2018 [cité 22 mai 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dky364/5091007>
73. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. β -Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. Ausubel FM, éditeur. PLoS Pathog. 27 mars 2009;5(3):e1000353.
 74. Zamorano L, Moya B, Juan C, Oliver A. Differential b-lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. :3.
 75. Ropy A, Cabot G, Sánchez-Diener I, Aguilera C, Moya B, Ayala JA, et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* Low-Molecular-Mass Penicillin-Binding Proteins in AmpC Expression, β -Lactam Resistance, and Peptidoglycan Structure. Antimicrob Agents Chemother. juill 2015;59(7):3925-34.
 76. Chen W, Zhang Y-M, Davies C. Penicillin-Binding Protein 3 Is Essential for Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(1).
 77. Jorth P, McLean K, Ratjen A, Secor PR, Bautista GE, Ravishankar S, et al. Evolved Aztreonam Resistance Is Multifactorial and Can Produce Hypervirulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Goldberg JB, éditeur. mBio. 8 nov 2017;8(5):mBio.00517-17, e00517-17.
 78. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan- β -Lactam Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: Molecular Mechanisms, Penicillin-Binding Protein Profiles, and Binding Affinities. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1 sept 2012;56(9):4771-8.
 79. Sykes RB, Bonner DP. Aztreonam: The first monobactam. The American Journal of Medicine. 8 févr 1985;78(2, Supplement 1):2-10.
 80. Alm RA, Johnstone MR, Lahiri SD. Characterization of *Escherichia coli* NDM isolates with decreased susceptibility to aztreonam/avibactam: role of a novel insertion in PBP3. J Antimicrob Chemother. 1 mai 2015;70(5):1420-8.
 81. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, et al. Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 24 oct 2017 [cité 19 août 2020];61(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5655108/>
 82. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling. Ann N Y Acad Sci. janv 2013;1277(1):54-75.
 83. Tsutsumi Y, Tomita H, Tanimoto K. Identification of Novel Genes Responsible for Overexpression of *ampC* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob Agents Chemother. déc 2013;57(12):5987-93.

84. Wang K, Chen Y, Salido MM, Kohli GS, Kong J, Liang H, et al. The rapid in vivo evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia patients leads to attenuated virulence. *Open Biol* [Internet]. 6 sept 2017 [cité 17 août 2020];7(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627047/>
85. Persyn E, Sassi M, Aubry M, Broly M, Delanou S, Asehnoune K, et al. Rapid genetic and phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains during ventilator-associated pneumonia. *Sci Rep* [Internet]. 18 mars 2019 [cité 17 août 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423012/>
86. Gisin J, Schneider A, Nägele B, Borisova M, Mayer C. A cell wall recycling shortcut that bypasses peptidoglycan de novo biosynthesis. *Nature Chemical Biology*. août 2013;9(8):491-3.
87. Fumeaux C, Bernhardt TG. Identification of MupP as a New Peptidoglycan Recycling Factor and Antibiotic Resistance Determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. Shuman HA, éditeur. *mBio*. 3 mai 2017;8(2):mBio.00102-17, e00102-17.
88. Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, et al. DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current β -lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin Infect Dis*. avr 2014;58(8):1072-83.
89. Sumi CD, Heffernan AJ, Lipman J, Roberts JA, Sime FB. What Antibiotic Exposures Are Required to Suppress the Emergence of Resistance for Gram-Negative Bacteria? A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet*. 1 nov 2019;58(11):1407-43.
90. Valenza G, Seifert H, Decker-Burgard S, Laeuffer J, Morrissey I, Mutters R. Comparative Activity of Carbapenem Testing (COMPACT) study in Germany. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 mars 2012;39(3):255-8.
91. Humphries RM, Hindler JA, Wong-Beringer A, Miller SA. Activity of Ceftolozane-Tazobactam and Ceftazidime-Avibactam against Beta-Lactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(12).
92. Wang Y, Gao L, Rao X, Wang J, Yu H, Jiang J, et al. Characterization of *lasR*-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. déc 2018;8(1):13344.
93. Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW, et al. PSEUDOMONAS AERUGINOSA *lasR* MUTANTS ARE ASSOCIATED WITH CYSTIC FIBROSIS LUNG DISEASE PROGRESSION. *J Cyst Fibros*. janv 2009;8(1):66-70.
94. D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E, Smith EE, et al. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol*. avr 2007;64(2):512-33.

95. Persyn E, Sassi M, Aubry M, Broly M, Delanou S, Asehnoune K, et al. Rapid genetic and phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains during ventilator-associated pneumonia. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):4720.
96. Feltner JB, Wolter DJ, Pope CE, Groleau M-C, Smalley NE, Greenberg EP, et al. LasR Variant Cystic Fibrosis Isolates Reveal an Adaptable Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* [Internet]. 2 nov 2016 [cité 3 sept 2020];7(5). Disponible sur: <https://mbio.asm.org/content/7/5/e01513-16>

VIII. Annexes

A. Annexe 1 – Antibiothérapie d’une infection à *Pseudomonas aeruginosa* / HAS 04/06/2019

1. Antibiothérapie avant réception de l’antibiogramme

Le choix de la β -lactamine dépend des données d’épidémiologie locale, des données microbiologiques disponibles chez le patient et des antibiothérapies déjà reçues par celui-ci (grade C). Il est recommandé de choisir un antibiotique n’ayant pas été prescrit dans le mois précédent et d’éviter les carbapénèmes si d’autres molécules sont possibles (grade C).

Les carbapénèmes ne sont pas recommandés en probabiliste chez un patient traité par un carbapénème (y compris l’ertapénème) dans le mois précédent (grade C).

Il est recommandé de débiter une bithérapie (avec un aminoside, amikacine ou tobramycine) jusqu’à réception de l’antibiogramme en cas d’infection à *P. aeruginosa* avec signes de gravité (grade B).

Les associations ceftazidime-avibactam et ceftolozane-tazobactam ne sont pas recommandées en traitement probabiliste (AE).

2. Antibiothérapie après réception de l’antibiogramme

Il est recommandé de mettre en place une désescalade de l’antibiothérapie pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* en épargnant les carbapénèmes (AE).

a) Mono ou bithérapie

Une fois l’antibiogramme disponible, une bithérapie active sur *P. aeruginosa* n’est pas recommandée (grade B).

Certaines situations cliniques ou microbiologiques (évolution défavorable, profil de résistance particulier) ainsi que le type d’infection (infection non ou insuffisamment drainée, matériel étranger) peuvent conduire à discuter la poursuite d’une bithérapie (AE).

b) Modalités d'administration des antibiotiques

En cas d'infection à *P. aeruginosa* avec signes de gravité traitée par une β -lactamine, il est recommandé d'optimiser l'antibiothérapie (grade A) par :

- l'utilisation de posologies élevées (grade B) ;
- l'administration par voie intraveineuse prolongée ou continue² après dose de charge pour les molécules suivantes : pipéracilline-tazobactam, céfépime, ceftazidime, méropénème (grade A) ;
- l'ajustement posologique en fonction des résultats des dosages plasmatiques (mesure de la résiduelle si perfusion prolongée, ou à l'équilibre si perfusion continue) et de la CMI estimée ou mesurée (grade B).

c) Durée d'antibiothérapie totale

En cas d'infection à *P. aeruginosa*, il est recommandé de suivre les durées de traitement habituellement préconisées (grade B). Raccourcir la durée de traitement au maximum est une des mesures de bon usage des antibiotiques (AE).

d) Associations ceftazidime-avibactam et ceftolozane-tazobactam

Il est recommandé de ne pas utiliser l'association ceftazidime/avibactam, une des rares molécules actuelles actives sur certaines entérobactéries productrices de carbapénémases, pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* (AE).

En l'absence de donnée écologique comparative et compte tenu de la nécessité de préserver son efficacité, il est recommandé de ne pas utiliser le ceftolozane-tazobactam dans une stratégie d'épargne des carbapénèmes. Son utilisation peut être envisagée après avis spécialisé en antibiothérapie, sur des souches avec un profil de résistance particulier (souches sensibles uniquement aux carbapénèmes et au ceftolozane-tazobactam) (AE).

e) Choix du carbapénème en l'absence d'alternative

Les données de la littérature ne permettent pas de recommander préférentiellement le méropénème ou l'imipénème en termes d'efficacité (grade C).

Le méropénème peut être administré avec une posologie élevée et en perfusion prolongée avec une bonne tolérance. Son utilisation doit être préférée dans les infections nécessitant des posologies élevées ou chez des patients à risque de toxicité neurologique (grade C).

Vu, le Président du jury,

Signature ⇨

Vu, le Directeur de thèse,

Signature ⇨

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénoms : LAVIGNE--QUILICHINI Vincent, Paul, Jean-Pierre, Rémi

Titre de la thèse : Etude de la diversité génomique de populations de *Pseudomonas aeruginosa* responsables de pneumopathies chez les patients hospitalisés en Réanimation

Résumé de la thèse : *P. aeruginosa* est le pathogène respiratoire le plus fréquemment retrouvé dans les PAVM chez les patients hospitalisés en Réanimation et est associé à une mortalité proche des 40 %. Sa forte capacité d'adaptation et de mutations sont des éléments majeurs de sa virulence. Cependant les phénomènes adaptatifs ont rarement été explorés dans un contexte aigu chez cette espèce. En étudiant des populations préalablement sélectionnées chez 9 patients atteints de PAVM à *P. aeruginosa*, nous avons montré que 2/3 d'entre-elles étaient hétérogènes. La majorité des mutations identifiées au sein de ces populations étaient liées à une déficience en quorum sensing et à une résistance aux antibiotiques. Les souches déficientes en quorum sensing étaient toutes mutées *lasR* qui est le principal régulateur du quorum sensing lors de la phase d'infection. Les principales mutations responsables de résistance aux antibiotiques affectaient *ampD*, *dacB*, *ftsI* et *mpl* entraînant la dérégulation d'AmpC, la céphalosporinase naturelle de *P. aeruginosa*. De plus, différentes mutations ont été détectées dans le gène *oprD*, entraînant très certainement une perte de la porine OprD.

MOTS CLÉS *Pseudomonas aeruginosa*, pneumopathie acquise sous ventilation mécanique, populations, polymorphisme, antibiorésistance, déficiences, QS,

JURY

**PRÉSIDENT : Mme Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie,
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS : Dr Lise CREMET, Maître de Conférences Universitaire de
Bactériologie,
Dr Jocelyne CAILLON, Maître de Conférence
Universitaire de Bactériologie,
Dr. Ronan LE FLOCH, Praticien Hospitaliser en
réanimation chirurgicale,
Dr Elise PERSYN, Praticien attaché de Bactériologie**

Adresse de l'auteur : 6 rue Deshoulières 44000 Nantes