

Thèse d'exercice

Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 16/09/2022

Par

FILLALI Wasfi

Né(e) le 22 décembre 1993 à Aire sur Adour (40)

ANALYSE PROSPECTIVE PAR SEQUENÇAGE HAUT DEBIT DE SOUCHES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* D'ORIGINE RESPIRATOIRE ISOLEES AU SERVICE DE REANIMATION POLYVALENTE DU CHU DE LIMOGES

Thèse dirigée par Monsieur le Docteur Sylvain MEYER

Examineurs :

Mme Le Professeur Sylvie ROGEZ, PU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Limoges

Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY, PU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Limoges

Mr le Docteur Olivier BARRAUD, MCU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Limoges

Mr le Docteur Maxime PICHON, MCU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Poitiers

Mme le Docteur Anne-Laure FEDOU, PH service de Réanimation polyvalente du CHU de Limoges

Thèse d'exercice

Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 16/09/2022

Par

FILLALI Wasfi

Né(e) le 22 décembre 1993 à Aire sur Adour (40)

ANALYSE PROSPECTIVE PAR SEQUENÇAGE HAUT DEBIT DE SOUCHES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* D'ORIGINE RESPIRATOIRE ISOLEES AU SERVICE DE REANIMATION POLYVALENTE DU CHU DE LIMOGES

Thèse dirigée par Monsieur le Docteur Sylvain MEYER

Examineurs :

Mme Le Professeur Sylvie ROGEZ, PU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Limoges

Mme le Professeur Marie-Cécile PLOY, PU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Limoges

Mr le Docteur Olivier BARRAUD, MCU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Limoges

Mr le Docteur Maxime PICHON, MCU-PH laboratoire de Microbiologie du CHU de Poitiers

Mme le Docteur Anne-Laure FEDOU, PH service de Réanimation polyvalente du CHU de Limoges

Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2021

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*) Microbiologie, parasitologie, immunologie et
hématologie

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et
hématologie

M. JOST Jérémy Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme COOK-MOREAU Jeanne Microbiologie, parasitologie, immunologie et
hématologie

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et
hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*) Pharmacologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. FROISSARD Didier Botanique et cryptogamie

Mme JAMBUT Anne-Catherine (*) Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l’Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Attaché Temporaire d’Enseignement et de Recherche

Mme AUDITEAU Émilie Épidémiologie, statistique, santé publique

Enseignants d’anglais

M. HEGARTY Andrew Chargé de cours

Mme VERCELLIN Karen Professeur certifié

Remerciements

A **Madame le Professeur Sylvie ROGEZ**, vous me faites l'honneur de juger et de présider ce travail de thèse. Vous m'avez soutenu dans les différents choix professionnels lors de mon internat. Veuillez recevoir l'expression de tout mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A **Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY**, vous avoir aujourd'hui dans ce jury de thèse est un honneur. Je vous remercie de m'avoir prodigué de nombreux conseils au début et durant mon troisième cycle universitaire, en me donnant la chance de travailler dans votre service. Soyez assurée de mon éternelle gratitude.

A **Monsieur le Maître de Conférence Olivier BARRAUD**, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que vos conseils avec un intérêt majeur à l'avancée de mes travaux sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail. Acceptez mes plus sincères remerciements

A **Monsieur le Maître de Conférence Maxime PICHON**, je vous remercie d'avoir accepté la charge d'examiner ce travail et d'apporter toute votre expérience de microbiologiste. Pour l'attention que vous porterez à mon travail, recevez mes sincères remerciements.

A **Madame le Docteur Anne-Laure FEDOU**, vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience et votre point de vue clinique sur ce sujet. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Croyez en mes plus sincères remerciements.

A **Monsieur le Docteur Sylvain MEYER**, directeur de ce travail de thèse. Tu as su m'encadrer avec brio, m'apportant toute ton expérience et de brillantes intuitions pour réaliser ce travail. Toujours très motivé, travailler avec toi fut un réel plaisir. Je te suis énormément reconnaissant pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta bienveillance.

Je profite de cette thèse pour dire ce que je dis rarement à haute voix mais que je pense tout au fond de moi ...

Il me semble essentiel de commencer ces remerciements en les adressant à mes parents. Merci pour tout, si j'en suis là aujourd'hui, si je suis l'adulte que je suis devenue, c'est grâce à vous, remplis de ces belles valeurs que vous m'avez transmises. L'amour que vous m'avez apporté tout au long de mon enfance ne pourra jamais être remercié en quelques lignes mais sachez que celui que je vous porte pourrait anéantir impitoyablement tout ce qui se trouve sur son chemin.

A toi, Maman, merci de faire tout ce qui est imaginable pour me rendre heureux. Je suis tellement chanceux de t'avoir auprès de moi.

A toi, Papa, le plus grand homme que j'ai connu. Tu m'as appris des leçons durant toute mon enfance et ses moments passés avec toi au cabinet que je n'oublierai jamais.

De plus loin que je me souviens, mes souvenirs à vos côtés ont toujours été heureux et resteront à jamais gravés. A votre générosité, votre aide, votre tendresse, votre amour.

A mes sœurs, Myriam et Nadya et à mon frère, Karim ! C'est grâce à vous que je me dis que rien n'est impossible car je ne serai jamais seule. Vous êtes le fil conducteur de ma vie, ce fameux fil qui me fait devenir meilleur pour vous rendre fier. Les coups de fils ne sont pas fréquents mais nous savons tous, que nous pouvons compter les uns sur les autres et que votre bonheur me tient à cœur, définissant la beauté de notre famille. Une bise à Anna et Mickael, il est toujours agréable de passer des moments avec vous et de vous avoir dans cette famille.

A mes adorables grands-parents, merci mamie, papi, pour toutes ces vacances passées à vos côtés. Je sais qu'un accueil chaleureux et rempli de sourire m'attend toujours. Vous avez été de réels exemples d'humanité.

A mes tantes et à mes oncles, ainsi que toute la famille du Maroc, pour ceux que vous m'apportez. L'esprit familiale est une signature que vous avez pu me transmettre à travers ces nombreux repas familiaux. Merci à tous pour votre affection et votre bonne humeur à chacune de nos retrouvailles.

A mes nièces, j'espère pouvoir être là un peu plus souvent pour vous et d'arrêter d'être surpris de votre croissance à chaque fois que je vous revois.

Vous savez très bien que je ne suis pas un grand sentimental, et qu'il est très rare que vous m'entendiez dire que je tiens énormément à vous, mais je n'en pense pas moins et si vous êtes dans cette thèse c'est que vous comptez grandement pour moi et que si j'en suis arrivé là c'est en partie grâce à vous.

A mes amis de la Ville Rose : Victor, un bon petit gars de Lannemezan, dire que c'est notre niveau d'anglais qui a permis cette belle rencontre, nous avons fait de nombreuses aventures dans la moitié des bars nationaux ou dans tes montagnes pyrénéennes, mais j'espère que les plus belles sont encore à venir ; Coco le bringueur du groupe, merci pour toutes ces folies nocturnes et heureux d'avoir vécu l'enterrement de cette brave Toyota qui nous baladait dans tout Toulouse ; Thomas le plus Marseillais d'entre nous, tellement heureux de boire son pastis Chez Tonton qu'il decida de s'exciler dans la ville natale du Ricard, mais toujours là pour les copains ; Léo, grand amateur de vidéo humoristique, grand amateur de la langue française associé à un esprit décalé qui lui permet d'amener de la bonne humeur partout où il passe ; Jb et Jordi le binome choc de la série B, un fin aventurier associé à un fin campagnard, le mixte des deux n'en sort que du positif ; Manu et Polo en espérant pouvoir refaire des soirées comme on savait les faire ; Laurie et Adri le couple gold, toujours la pêche et le sourire au lèvres, méfiez-vous ils n'ont en pas l'air mais ce sont de sacrés bringeurs.

Merci les poulets pour ces années folles passées à Toulouse remplies de rugby, plutôt maladroit, mais bravement rattrapper sur les troisième mi-temps.

Paul, je t'ai laissé un petit en paix pour que tu puisses bosser et réaliser ton rêve de toujours. Je me rappelle encore toutes ces nuits de travail la veille des examens, qui nous permettait de faire des pauses de nos longues parties de play (mode Zombie).

Ma petite Cheg toujours là pour moi, un petit bout de femme avec un très grand cœur, faisant toujours passé le bonheur des autres avant le sien. Très heureux d'avoir partagé cette aventure à La Réunion avec toi.

Une dédicace spéciale pour mes deux blondasses préférées, Eloïse et Sophie, toujours partante pour une virée avec un magnifique sourire. On a pu créer de nombreux souvenirs ensemble, instaurant ce petit lien particulier entre nous qui durera sûrement toute une vie. Merci kiki pour ces braves animations de soirée et Soso la prochaine faut que je reviens à Hossegor je veux te voir dans des tubes de trois mètres.

Il y en a tellement d'autres que je ne pourrais tous les citer mais je terminerai par Judi : ce grand gaillard rugbyman rempli de gentillesse. Aussi agile de ces mains pour vous remettre d'une entorse, que pour s'envoyer des grands godets. Merci pour tout.

Aux 9 fantastiques, un petit groupe de princesses et de chevaliers venant des quatre coins du pays s'étant formé dans le monde obscur de l'internat, dont certains ont poursuivi l'aventure à mes côtés dans une belle collocation. Merci pour tous ces moments de partage et de franche rigolade pendant toutes ces années d'internat : Alexis, Anne-Claire, Augustin, Hortense, Madeleine, Marine, Rodolphe et Victoria. Nos chemins se séparent pour certains, mais on se retrouvera de plus belle pour nous remémorer toutes ces histoires de notre internat.

A mes amis Limougeauds, une très très belle découverte, bien plus nombreux que je ne l'aurais cru en arrivant ici il y a 4 ans, de réelles amitiés se sont formées et persisteront j'en suis sûr pendant encore de longues années. Enormement de bons moments passés ici et ailleurs mais surtout dans cette brave Pink's flame. Un grand Merci pour ces magnifiques années passées à vos côtés à Limoges : Benoit et Florence, Arthur et Sarah, Léa, Caro, la triplète Marwan, Ernest et Adri, Victor, Pucheu, Robin, Anissa, Julien, Charlotte et Seb, Clovis, Kentin, Jeremy, Lulu et Victor, Evan et Charlotte, Théo, Célia (ma petite maman de Limoges, toujours au petit soin avec moi) et tant d'autres ...

A mes collocs Max, Raph et Alexis/Walter (je ne sais pas lequel dort le plus souvent à la maison), merci de m'avoir laissé la maison calme pour travailler ma thèse. Une très bonne coloc hétéroclite avec notre nouveau marathonien, notre grand gamer du soir, de l'après-midi et à ces heures libres anesthésiste, notre fin gourmet alternant McDo/pizza et merci Alexis pour ces nombreuses heures perdues sur le canapé enrichissant ma culture cinématographique.

A mes cointernes, nombreux pendant toutes ces années en biologie : Sarah, Etienne, Benjamin, Nicolas, Emilien, Alice, Alix, Marie-Sarah ou en Maladie Infectieuse : Constance, Manuella, Mo. Avec qui j'ai pu partagé de très nombreux fous rire dans le bureau des internes, nous permettant de décompresser et de lâcher prise. J'éviterais de sortir les dossiers de ceux qui ont lâché prise avec un peu trop d'envie (tirage de langue, bataille d'eaux, les choristes...). D'autres ont eu la chance de partager ces deux mondes à mes côtés Cyrielle et Léna, heureusement que j'étais là pour entendre tous vos dramas entre deux boîtes de Petri ou entre deux patients.

A mes amis gersois Keke, Maxime, Geoffrey, Camille, Antho, Flo, Micka, Axel, Paul, Alba ... depuis toutes ces années accoudées au bar, on avait commencé sur des passes de football quand on ne mesurait pas grand-chose, et nous voilà déjà presque à la trentaine.

Mon petit chir ped qui a été mon allié d'internat pendant ces dernières années, m'a aussi permis de faire de belle rencontre pour trouver un compagnon de triathlon, et ces nombreux cadeaux envoyés depuis le bloc chirurgical qui ont animé mes gardes. Merci Quentin, une bise à toute la famille Ballouhey.

A la famille Coutet et plus particulièrement à Simon. On se connaît depuis l'âge de la maternelle, je me rappelle encore nos nombreux goûters dans l'agence préparé par Elyanne. Une amitié d'enfance qui restera encore pour de très longue année.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Table des illustrations	13
Table des tableaux	16
Table des annexes	17
Liste des abréviations	18
Introduction	20
I.Première partie : Etude Bibliographique	21
I.1. L'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
I.1.1. Caractères généraux	21
I.1.1.1. Taxonomie	21
I.1.1.2. Caractéristiques et culture	22
I.1.2. Structure et évolution génomique	22
I.1.3. Séquence type	23
I.1.4. Habitat et pouvoir pathogène	24
I.1.4.1. Réservoir et pathogénicité	24
I.1.4.2. Incidence au niveau hospitalier	24
I.2. Problématique de la résistance chez <i>P. aeruginosa</i>	26
I.2.1. Evolution de la résistance	26
I.2.2. Différents types de résistances	28
I.3. Mécanismes de résistance chez <i>P.aeruginosa</i>	29
I.3.1. Les gènes de résistances naturels	29
I.3.2. Résistance médiée par AmpC	30
I.3.2.1. Régulation d'AmpC	30
I.3.2.2. Variants d'ampC	31
I.3.3. Résistance par modification des porines	33
I.3.4. Autres mécanismes de résistances aux bêta-lactamines	34
I.3.5. Principales résistances aux fluoroquinolones :	34
I.3.6. Principales résistances aux aminosides	35
I.4. Les facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i>	36
I.4.1. Définition	37
I.4.2. Facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité	37
I.4.2.1. Le flagelle	37
I.4.2.2. Les pili de type IV	40
I.4.2.3. Pili de type fimbrae (ou cup)	41
	10

I.4.2.4.	Le lipopolysaccharide (LPS)	42
I.4.3.	La formation de biofilm	45
I.4.3.1.	Les alginates	46
I.4.3.2.	Pel	47
I.4.3.3.	Psl	48
I.4.3.4.	Les rhamnolipides	50
I.4.3.5.	Rôle des systèmes à deux composantes	52
I.4.4.	Facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte	53
I.4.4.1.	Les quorum sensing indépendants	53
I.4.4.1.1.	Les systèmes de sécrétion	53
I.4.4.1.2.	Le système de sécrétion de type III (T3SS) et ses toxines	54
I.4.4.2.	Les quorum sensing dépendants	55
I.4.4.2.1.	Exotoxine A	57
I.4.4.2.2.	Les lectines solubles	59
I.4.4.2.3.	Elastase	60
I.4.4.2.4.	Phospholipases C	61
I.4.4.2.5.	Les chromophores : la pyocyanine et les sidérophores (pyoverdine et pyocheline)	62
I.4.4.2.5.1.	La pyocyanine	62
I.4.4.2.5.2.	Les sidérophores	63
I.4.4.2.6.	Protéase alcaline	66
I.4.4.2.7.	Protéase IV	66
I.5.	La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)	67
I.5.1.	Définition et épidémiologie :	67
I.5.2.	Physiopathologie de la PAVM	68
I.5.3.	Rôle de <i>P. aeruginosa</i> dans la PAVM	72
I.5.4.	Intérêt de l'étude génomique des souches de <i>P. aeruginosa</i> en service de réanimation	73
II.	Matériels et Méthodes	74
II.1.	Isolement et extraction des isolats de <i>P. aeruginosa</i>	74
II.1.1.	Sélection des isolats	74
II.1.2.	Recueil des informations cliniques	75
II.1.3.	Extraction de l'ADN	75
II.1.4.	Dosage de l'ADN	75
II.2.	Le séquençage haut débit	75
II.2.1.	Préparation des bibliothèques	76
		11

II.2.2.	Contrôle et quantification des librairies	77
II.2.3.	PCR émulsion	79
II.2.4.	Séquençage	79
II.2.5.	Deux paramètres clés du NGS : couverture et profondeur	81
II.3.	Analyse bioinformatique	82
II.3.1.	Création des contigs	82
II.3.2.	Analyse MLST à partir des données de séquençage	82
II.3.3.	Analyse phylogénétique	83
II.3.4.	Analyse des gènes de résistance	83
II.3.5.	Analyse des gènes de virulence	83
II.4.	Associations des données génomiques aux données cliniques	84
III.	Résultats	85
III.1.	Nombre d'échantillons inclus, caractéristiques clinique et microbiologiques	85
III.2.	Typage et phylogénie des isolats séquencés	88
III.2.1.	Qualité de séquençage	88
III.2.2.	Typage MLST des isolats de <i>P. aeruginosa</i>	88
III.2.3.	Phylogénie des isolats de <i>P. aeruginosa</i>	88
III.3.	Analyse génomique des gènes de résistance	93
III.3.1.	Les bêta-lactamines	93
III.3.1.1.	Gènes de résistance acquis	93
III.3.1.2.	Analyse des mutations des gènes impliqués dans la résistance aux bêta-lactamines	93
III.3.1.3.	Comparaison avec les données phénotypiques de l'antibiogramme	94
III.3.2.	Fluoroquinolones	95
III.3.2.1.	Gènes de résistance acquis	95
III.3.2.2.	Analyse des mutations des gènes impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones	95
III.3.2.3.	Comparaison avec les données phénotypiques de l'antibiogramme	95
III.3.3.	Les aminosides	96
III.4.	Analyse génomique des facteurs de virulence	104
III.5.	Impact de la virulence dans la survenue de PAVM	107
III.	Discussion	111
Conclusion		119

Table des illustrations

Figure 1: Culture de <i>P. aeruginosa</i> sur gélose au sang; aspect microscopique à la coloration de gram de <i>P. aeruginosa</i> avec une morphologie de petits bacilles Gram négatif.	21
Figure 2: Répartition des espèces bactériennes retrouvées dans les infections nosocomiales	25
Figure 3: Répartition des micro-organismes selon les différents sites surveillés	26
Figure 4 : Nombre total d'isolats invasifs testés et pourcentage d'isolats de phénotype résistant, par espèce bactérienne et groupe d'antimicrobiens, moyenne UE/EEE pondérée en fonction de la population, 2015-2019	27
Figure 5 : Schéma récapitulatif de l'hyperproduction d'AmpC par inhibition de la répression d'AmpR	30
Figure 6 : Exemple de mutation retrouvé sur les 4 domaines des ESAC identifié dans le rapport d'activité 2019-2020 Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques	32
Figure 7 : Profil de résistance d'une souche de <i>P. aeruginosa</i> , délétée de la bêta-lactamase AmpC et complétée avec des gènes mutés de ampC donnant lieu à différents types de PDC.	33
Figure 8: Schéma regroupant les principaux mécanismes de virulence retrouvés chez <i>P. aeruginosa</i>	36
Figure 9 : Organisation des loci de gènes impliqués dans la biogénèse du flagelle et dans sa régulation	38
Figure 10 : Structure d'un flagelle de <i>P. aeruginosa</i>	39
Figure 11: Structure du pili de type IV	40
Figure 12 : Organisation génétique et composition du système d'assemblage de pili de type IV	41
Figure 13: Organisation génétique des gènes codant pour les cinq systèmes Cup (A-E)	42
Figure 14: le polymère OSA du sérotype O5 est présenté comme un polymère représentatif avec la présence de tous les gènes présents même si cela ne correspond pas à l'AgO le plus long	43
Figure 15: Représentations de la diversité des LPS glycoformes présentes à la surface d'une seule cellule de <i>P. aeruginosa</i> .	44
Figure 16 : Modèle du complexe biosynthétique d'alginate de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
Figure 17 : Modélisation de biosynthèse du Pel	48
Figure 18 : Formation du Psl de ses précurseurs dans le cytoplasme jusqu'à sa mise en place sur la membrane externe.	49
Figure 19 : Représentation de l'implication des rhamnolipides dans les différentes étapes du développement du biofilm	51
Figure 20 : Divers systèmes à deux composants permettent de réguler la synthèse du biofilm.	52
Figure 21 : Les systèmes de sécrétion du <i>P. aeruginosa</i>	53
Figure 22 : Rôle des protéines effectrices de type III dans la pathogénèse de la pneumonie aiguë	55
	13

Figure 23 : Schématisation hiérarchique de signalisation du quorum sensing en fonction des conditions environnementales et des facteurs de l'hôte	56
Figure 24 : Représentation schématique des domaines structuraux et fonctionnels de l'exotoxine A de <i>Pseudomonas</i>	58
Figure 25 : Fonctions d'action des lectines de <i>P. aeruginosa</i>	59
Figure 26 : Modèle schématique des effets de <i>P. aeruginosa</i> sur l'intégrité épithéliale.	61
Figure 27 : Acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i> par les sidérophores.	63
Figure 28 : Organisation génomique du locus PVD chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1	64
Figure 29 : Voie d'import du fer par la pyoverdine	65
Figure 30 : Évolution des taux de pneumopathies de 2004 à 2016 selon différents indicateurs	68
Figure 31 : Critères de diagnostic d'une pneumonie liée aux soins intensifs Protocole HELICS Belgique Avril, 2004	69
Figure 32 : Représentation de la physiopathologie lors d'une intubation endotrachéale	71
Figure 33 : Organigramme de l'étude	74
Figure 34 : Étapes de préparation de la bibliothèque d'ADN génomique ionique et d'amplicons	77
Figure 35 : Puce Agilent High Sensitivity DNA	78
Figure 36 : Exemple d'électrophorèse d'une souche de <i>P. aeruginosa</i>	78
Figure 37 : Etape de la PCR émulsion préalable au séquençage haut débit	79
Figure 38 : Principe de séquençage par technologie Ion Torrent	80
Figure 39 : Exemple d'un chargement d'une puce de séquençage	81
Figure 40 : Notion de couverture et de profondeur de séquençage	82
Figure 41 : Chronologie d'hospitalisation de nos patients inclus dans l'étude	86
Figure 42 : Arbre phylogénétique	92
Figure 43 : Phénotype de résistance de nos différentes souches	97
Figure 44 : Représentation des mutations d'ampC en fonction de la phylogénie des souches	98
Figure 45 : Représentation des mutations d'ampD en fonction de la phylogénie des souches	99
Figure 46 : Représentation des mutations d'ampD2 et D3 en fonction de la phylogénie des souches	100
Figure 47 : Représentation des mutations d'ampR en fonction de la phylogénie des souches	101
Figure 48 : Représentation des mutations de dacB en fonction de la phylogénie des souches	102
Figure 49 : Représentation des mutations de <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parE</i> et <i>parC</i> en fonction de la phylogénie des souches	103
	14

Figure 50 : Shade plot des gènes codant les principaux facteurs de virulence retrouvé chez <i>P. aeruginosa</i>	105
Figure 51 : L'analyse en coordonnées principales (PCoA) des facteurs de virulences de toutes nos souches	106
Figure 52 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) des facteurs de virulences de nos souches provoquant une PAVM ou non	108
Figure 53 : Carte de chaleur représentant la présence des facteurs de virulence sur le groupe PAVM et non PAVM	109
Figure 54 : Distribution des gènes des exotoxines, de <i>pldA</i> et de <i>algP</i> dans les groupes PAVM et non PAVM	110

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractérisation cliniques et microbiologiques	87
Tableau 2 : Profondeur moyenne obtenue pour chaque isolat après séquençage haut débit	90
Tableau 3 : Représentation des sérogroupes et des ST de nos 69 souches	91
Tableau 4 : Sérotypes de l'antigène LPS O et phénotypes des toxines TTS3 dans les isolats cliniques de <i>P. aeruginosa</i>	107
Tableau 5 : Distribution des différents sérogroupes retrouvés dans le groupe PAVM et non PAVM	107

Table des annexes

Annexe 1 : Résultats bactériologiques des différents prélèvements pulmonaires	135
Annexe 2 : Présence des gène de résistance après analyse de CARD	136
Annexe 3 : Gène de virulence analysé dans nos souches de <i>P. aeruginosa</i> à partir de VFDB	138

Liste des abréviations

AAC : Aminoglycosides N-acétyltransférases
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AET : Aspiration endotrachéale
AHL : N-acyl-homosérine lactone
AHQ : 2-alkyl-4(1-H)-quinolone
anhNAM : 1,6- anhydro- *N* -acétylmuramyl
ANT : Aminoglycosides O-adényltransférases
APH : Aminoglycosides O-phosphoryltransférases
BGN : Bacille Gram Négatif
BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Etendue
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive
C1G : Céphalosporine de première génération
C2G : Céphalosporine de deuxième génération
C3G : Céphalosporine de troisième génération
C4G : Céphalosporine de quatrième génération
c-di-GMP : 3-5 monophosphate de guanosine dimère cyclique
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CPIS : Clinical Pulmonary Infection Score
DRM : Detergent resistant membrane
ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control
ESAC : Extended Spectrum AmpC
EPS : Substance polymérique extracellulaire
IATS : International Antigenic Typing Scheme
IMP : Protéine membranaire intégrale
LPS : Lipopolysaccharide
LRP : Low density lipoprotein receptor-related protein
MDR : Multi-résistant

MLST : MultiLocus Sequence Typing

NagZ : N-acetylglucosaminidase

NAG-anhNAM : *N*-acetylglucosamine-1,6- anhydro- *N*-acétylmuramyl

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OSA : Antigène O spécifique

PAVM : Pneumopathie Acquisée sous Ventilation Mécanique

PBP4 : Protéine de liaison à la pénicilline de type 4

PCH : Pyocheline

PFGE : Pulse Field Electrophoresis

PDC : Pseudomonas Derived Cephalosporinase

PVD : Pyoverdine

QRDR : Quinolone Resistance Determining Regions

QS : Quorum sensing

SNP : Single nucleotide polymorphism

ST : Sequence Type

T3SS/SST3 : Système de sécrétion de type 3

TBTD : Transporteurs TonB-dépendant

TLR : Récepteur Toll-like

UDP-NAM-P5 : Uridine 5'-pyrophosphoryl- *N*-acetylmuramic acid-pentapeptide

WGS : Whole Genome Sequencing

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est l'un des agents pathogènes opportunistes le plus courant en pathologie humaine. En effet, il provoque des infections nosocomiales graves souvent mortelles, telles que les bactériémies et les pneumonies, essentiellement chez des patients immunodéprimés ou atteints d'une pathologie chronique. En raison de sa multi-résistance, de sa virulence importante, et de sa propagation mondiale, *P. aeruginosa* constitue une menace pour la santé publique mondiale. Elle est ainsi classée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017 parmi les trois bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. Depuis toujours la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques s'est suivie de l'apparition de nouvelles résistances à ces antibiotiques, suite à l'utilisation excessive ou au mésusage des antibiotiques. La prévalence de souches multi-résistantes (MDR), définie par la résistance à plus de trois familles d'antibiotiques, a ainsi augmenté au cours de ces dernières décennies. Cette menace nécessite une majoration des efforts par les chercheurs dans le but de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes. Plusieurs théories rapportant ces résistances ont pu être mises en évidence au fur et à mesure des avancées scientifiques avec l'implication de mutations chromosomique ou encore du génome transférable, mais de nombreux mécanismes restent encore inconnus.

Pseudomonas aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence, lui donnant tous les atouts pour optimiser les différentes étapes d'une infection, de l'adhésion jusqu'à la cytotoxicité. L'analyse génomique de ces différents gènes de virulence a permis une meilleure compréhension de l'adaptation de la bactérie à son hôte.

L'utilisation de dispositifs médicaux importants dans les services de réanimation en fait un lieu idéal de contamination pour le *P. aeruginosa* de par son pouvoir d'adaptation à cet environnement et sa capacité de former un biofilm. Les patients intubés ont ainsi un risque plus élevé de faire une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM).

C'est pourquoi, la compréhension des mécanismes génotypiques et phénotypiques d'invasion et d'échappement aux réponses de l'hôte, est devenue essentielle pour poursuivre la lutte antibactérienne et mieux comprendre la physiopathologie des différentes infections. La mise en évidence des mécanismes de résistance demeure également primordiale pour préserver et mieux cibler l'utilisation des antibiotiques. En combinant cette analyse de virulence et de résistance, la compréhension de l'infection bactérienne chez le patient sera améliorée tout en essayant de mieux comprendre la physiopathologie de la PAVM à *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps, nous détaillerons la bibliographie concernant l'épidémiologie du *P. aeruginosa*, ses facteurs de résistances, sa pathogénicité et son impact clinique plus précisément lors d'une PAVM. Dans un second temps, nous présenterons et discuterons les résultats de notre étude concernant l'analyse des gènes de virulence et de résistance grâce au séquençage haut débit des souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges.

I. Première partie : Etude Bibliographique

I.1. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

I.1.1. Caractères généraux

I.1.1.1. Taxonomie

L'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille gram négatif, également appelé bacille pyocyanique. D'un point de vue taxonomique, l'espèce *P. aeruginosa* appartient au règne des Bactéries, au phylum des Proteobacterie, à la classe des Gammaproteobacterie, à l'ordre des Pseudomonadales, à la famille des Pseudomonadaceae, au genre *Pseudomonas* et à l'espèce du groupe *aeruginosa*. Le groupe *aeruginosa* comprend les espèces fluorescentes : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. mosselii* et les espèces non fluorescentes : *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans*.

L'espèce *P. aeruginosa* a été découverte pour la première fois en 1862 par monsieur Luke qui a prouvé son implication dans des infections cutanées chez l'homme produisant un pus de coloration bleu-vert. Il a ensuite été isolé en 1882 par Gessard, qui décrit sa morphologie en bâtonnet et sa capacité à produire des pigments (pyocyanine et pyoverdine). Lors de la Première Guerre Mondiale, il fût responsable de nombreuses surinfections de plaies des soldats laissant place à la dénomination de « pus bleu ».

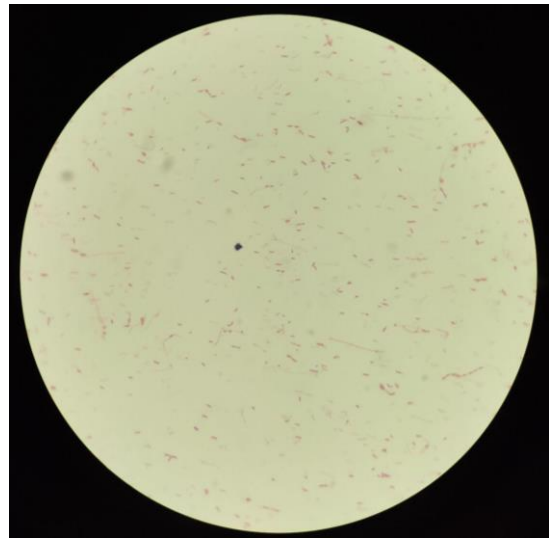
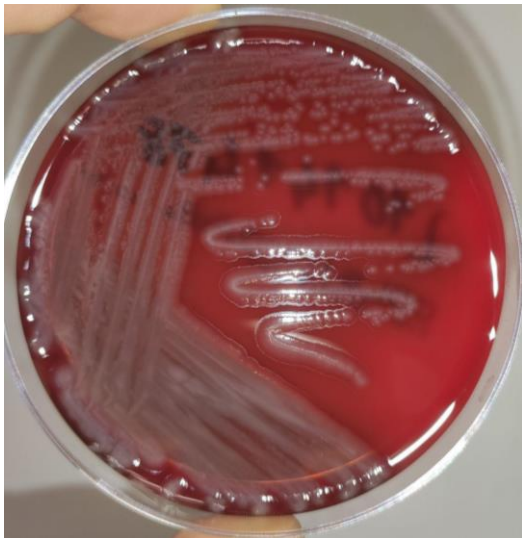


Figure 1: Culture de *P. aeruginosa* sur gélose au sang (à noter l'aspect métallique typique de cette espèce) ; aspect microscopique à la coloration de gram de *P. aeruginosa* avec une morphologie de petits bacilles Gram négatif.

I.1.1.2. Caractéristiques et culture

P. aeruginosa est un BGN non fermentaire, aérobic stricte, oxydase positive, et possède une forte mobilité par ciliature polaire monotriche au vu de son seul flagelle. Sa croissance reste difficile en anaérobiose mais possible au vu de sa capacité à réduire les nitrates en utilisant NO₃⁻ comme accepteur final d'électron par la voie des pentoses phosphate.

P. aeruginosa se cultive facilement sur milieux ordinaire à 30° C (sa température optimale de croissance) avec la possibilité de visualiser trois types de colonies de manières simultanées ou isolées :

- des colonies large de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques (Figure 1)
- des colonies plus petites lisses bombées à bord régulier
- des colonies muqueuses, bombées, filantes, rencontrées chez des souches produisant un slime composé d'un polymère exopolysaccharidique appelé alginate.

Pour les souches pigmentées (95% des isolats), les milieux de King A et King B permettent une identification de *P. aeruginosa* par la mise en évidence de la production de deux pigments : la pyocyanine (hydrosoluble, donnant une coloration bleue) et la pyoverdine (soluble dans le chloroforme, donnant une coloration verte). Nous retrouvons également d'autres pigments hydrosolubles pouvant parfois être produits de manière transitoire : la pyorubine rouge et la pyomélanine brune. Par ailleurs cette espèce développe une odeur caractéristique d'acacia/seringas (fleur de la famille des Philadelphacées) après culture. A partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide (ammonium quaternaire dont l'espèce est naturellement résistante) associé ou non à de l'acide nalidixique. (1)

I.1.2. Structure et évolution génomique

Le génome du *P. aeruginosa* est l'un des plus grands parmi les bactéries usuelles. Sa taille est de l'ordre de 5,5 à 7 Mpb, avec une teneur en G / C élevée de 66.6%, par comparaison la teneur moyenne en G / C dans le génome humain est proche de 41 % (2) Cette composition en base est liée à l'espèce, ainsi on retrouve un pourcentage constant entre les individus d'une même espèce. (3)

Pour rappel, le pan-génome décrit l'ensemble des gènes d'une espèce bactérienne qui incluent ceux dits du « core-génome » et ceux dits « accessoires ». Le core génome est constitué de gènes chromosomiques, correspondant à l'ensemble des gènes communs à toutes les souches d'une même espèce. Le génome accessoire correspond, quant-à-lui, aux gènes retrouvés uniquement dans certaines souches, il comprend notamment les éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les intégrons ou les transposons.

Le génome de *P. aeruginosa* est composé d'un seul chromosome circulaire et d'un nombre variable de plasmides. Son core-génome est très conservé avec une très faible diversité de séquences intra clonale de 0,5 à 0,7%. La diversité du génome est principalement liée aux éléments d'ADN accessoires situés dans 79 régions du génome. (4)

Le premier séquençage complet du génome a été réalisé sur la souche PAO1 par Stover dans les années 2000. Cette souche est depuis considérée comme la référence majeure lors des études génétiques. (5)

La répartition génétique de *P. aeruginosa* reflète son caractère adaptatif à l'environnement. Sa polyvalence métabolique est fournie par des gènes codant de nombreuses enzymes participant aux voies métaboliques, aux régulateurs transcriptionnels, ou encore aux systèmes de régulation.

I.1.3. Séquence type

Le typage des séquences à haute résolution est important pour évaluer les liens épidémiologiques et utile pour identifier les sources de transmission lors d'une épidémie. Deux techniques principales de typage ont été développées pour identifier les relations clonales entre les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* : l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et le typage de séquences multilocus (MLST). La PFGE a pour principe la comparaison des fragments du génome bactérien après digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose en fonction de leur taille. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la grande difficulté de comparaison de résultats inter-laboratoire. Le MLST quant à lui est basé sur le séquençage et l'analyse de la variation allélique de 7 "gènes de ménage" présentant des polymorphismes stables dans le temps codant pour des protéines essentielles de la bactérie. Le séquençage du génome entier permet de retrouver ces gènes et ainsi la position de ces sept gènes de ménage permet de définir un "sequence type" (ST), il existe actuellement 3309 ST différents. (6) Concernant *Pseudomonas aeruginosa*, ces sept gènes sont choisis:

- *acsA* : gène codant l'enzyme acétyl-coenzyme A synthétase, qui permet la lyse de l'acétate en acétyl-CoA
- *aroE* : gène codant l'enzyme shikimate-déshydrogénase, impliquée dans la biosynthèse du chorismate, qui participe à la biosynthèse des acides aminés aromatiques. (phénylalanine, tryptophane, tyrosine).
- *guaA* : gène codant l'enzyme GMP synthase, qui participe à la transformation de la guanosine monophosphate en xanthosine monophosphate
- *mutL* : gène codant une protéine impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN
- *nuoD* : gène codant la NADH-déshydrogénase
- *ppsA* : gène codant la phosphoénolpyruvate synthase
- *trpE* : gène codant l'enzyme anthranilate synthase, qui permet la biosynthèse de l'anthranilate (intermédiaire du L-tryptophane)

L'analyse MLST est une bonne technique de typage pour les analyses phylogénétiques, permettant d'identifier des clones et d'obtenir une meilleure compréhension de la population bactérienne. De plus, c'est une analyse hautement reproductible et transférable entre laboratoire, permettant d'identifier des clones internationaux à haut risque ayant des multi-résistances tels que les ST111, ST175 ou encore ST235. (7)

I.1.4. Habitat et pouvoir pathogène

I.1.4.1. Réservoir et pathogénicité

Son réservoir est dit "ubiquitaire", en étroite relation avec les environnements hydriques riches en matière organique où on le retrouve (piscines, jacuzzi, égouts, lacs, estuaires...). De ce fait l'hôpital constitue une niche écologique favorable à son développement (siphons, douches, toilettes, endoscopes, nébulisateurs, humidificateurs, respirateurs...), d'où l'observation d'une recrudescence d'infections dans les années 1960-70, parallèlement au développement de l'hospitalisation et des techniques invasives d'exploration. C'est à partir de ce moment-là que cette bactérie à Gram négatif est reconnue comme un agent pathogène majeur de l'Homme.

P. aeruginosa est un germe opportuniste responsable d'infections communautaires et hospitalières parfois incurables voir même mortelles. L'Organisation Mondiale de la Santé a réunie sous un même groupe dénommé "ESKAPE" les six pathogènes les plus responsables d'infections nosocomiales, comprenant *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*. Une des problématiques majeures est l'importante résistance aux antibiotiques prioritaires retrouvés chez ces germes.

P. aeruginosa est responsable de très nombreuses pathologies dont les plus fréquentes sont les infections respiratoires (surinfections de bronchopneumopathie chroniques obstructives, surinfections chez le patient atteint de mucoviscidose), les infections oculaires (kératite ulcéreuse lors de port de lentilles), les otites ou les infections cutanées. A l'hôpital, elle peut également être responsable d'infections respiratoires de type pneumonies nosocomiales ou pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, de bactériémies, d'infections de plaies (particulièrement chez le grand brûlé, en post-chirurgie ou sur escarres), d'infections urinaires (le plus souvent sur sonde) ou encore de méningites post chirurgicale.

Ces infections nosocomiales peuvent être d'origine exogène : infections manuportées, infections sur matériel implanté et d'origine endogène : retrouvé chez des patients le plus souvent âgés, immunodéprimés ou présentant des infections intercurrentes (brûlure, insuffisance respiratoire).

I.1.4.2. Incidence au niveau hospitalier

P. aeruginosa provoque des infections opportunistes avec un réservoir aquatique très présent au niveau de l'environnement hospitalier ce qui pose de véritables problèmes de santé publique.

Pour rappel une infection nosocomiale correspond à toute maladie contractée à l'hôpital, due à des micro-organismes, cliniquement et/ou biologiquement reconnaissables, qui affectent soit le malade du fait de son admission à l'hôpital ou des soins qu'il a reçu, soit le personnel hospitalier, du fait de son activité, que les symptômes de la maladie apparaissent ou non pendant que l'intéressé se trouve à l'hôpital. (8)

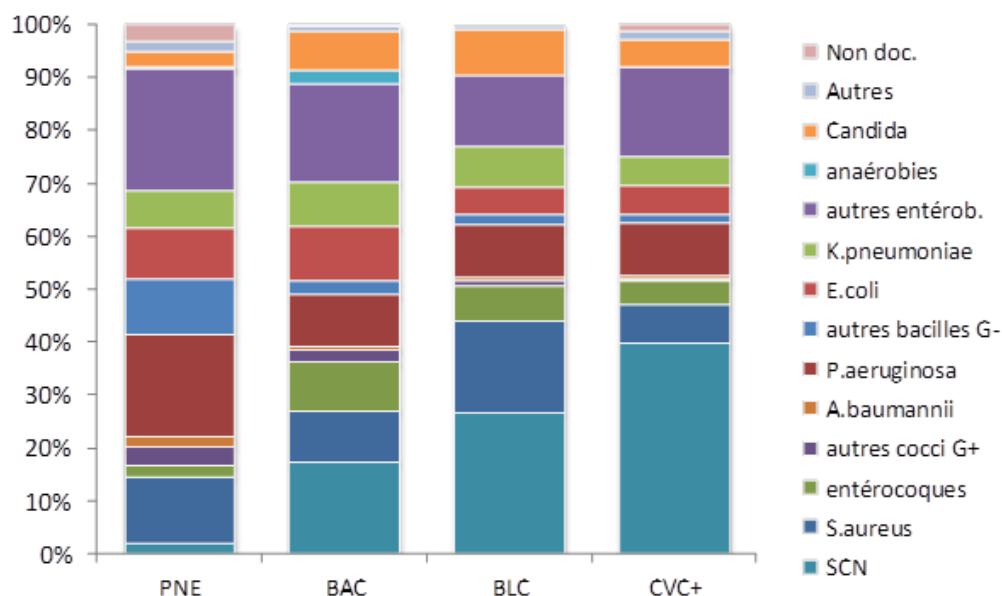
Les quatre principales localisations d'infections nosocomiales sont dans l'ordre décroissant : les infections urinaires (28.47%), les infections du site opératoire (15.92%), les pneumonies (15.63%) puis les bactériémies (11.43%). (9)

La moitié de ces infections sont causées par quatre micro-organismes : *Escherichia coli*, *Staphylocoque aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce dernier a été isolé dans 6.28% des infections nosocomiales en 2017 lors de l'enquête nationale de prévalences des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé (Figure 2). Ce chiffre est en légère diminution par rapport à 2012, où il était retrouvé dans 8.4% des infections nosocomiales devant *l'Enterococcus faecalis*. En effet, la dernière enquête de prévalence des infections associées aux soins organisée par Santé publique France en 2012, a classé le *P. aeruginosa* au 3ème rang (8,4%) des espèces nosocomiales, derrière *E. coli* (26,0%) et *S. aureus* (15,9%).(9)

Micro-organisme	PART RELATIVE			PRÉVALENCE DES PATIENTS INFECTÉS IC95 %	
	n	%	IC95 %	%	
<i>Escherichia coli</i>	904	23,59	[21,89-25,37]	1,08	[0,98-1,19]
<i>Staphylococcus aureus</i>	601	13,83	[12,39-15,41]	0,64	[0,56-0,71]
<i>Enterococcus faecalis</i>	288	6,50	[5,61-7,52]	0,30	[0,24-0,35]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	285	6,28	[5,24-7,51]	0,29	[0,22-0,35]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	266	5,60	[4,80-6,52]	0,26	[0,21-0,30]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	251	5,39	[4,48-6,47]	0,25	[0,20-0,30]
<i>Enterobacter cloacae</i>	185	3,78	[3,02-4,72]	0,17	[0,13-0,22]
<i>Proteus mirabilis</i>	130	2,92	[2,37-3,58]	0,13	[0,10-0,16]
<i>Clostridium difficile</i>	83	2,31	[1,77-3,00]	0,11	[0,08-0,13]
<i>Candida albicans</i>	67	1,53	[1,13-2,07]	0,07	[0,05-0,09]
<i>Enterococcus faecium</i>	66	1,51	[1,15-2,00]	0,07	[0,05-0,09]
Streptocoques, autre espèce	51	1,39	[0,98-1,96]	0,06	[0,04-0,09]
<i>Citrobacter koseri</i> (ex. <i>diversus</i>)	49	1,34	[0,92-1,94]	0,06	[0,04-0,09]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	44	1,22	[0,73-2,03]	0,06	[0,03-0,08]
Staphylocoque coagulase négative, autre	66	1,11	[0,76-1,60]	0,05	[0,03-0,07]
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	52	1,02	[0,72-1,45]	0,05	[0,03-0,07]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	42	0,96	[0,61-1,49]	0,04	[0,02-0,07]
Autre <i>Pseudomonas</i> spp. et apparentés	35	0,92	[0,61-1,37]	0,04	[0,03-0,06]
<i>Morganella</i> spp.	48	0,83	[0,60-1,16]	0,04	[0,03-0,05]
Autres	709	16,30			
TOTAL	4 232	100,00			

Figure 2: Répartition des espèces bactériennes retrouvées dans les infections nosocomiales (9)

Au vu de l'état critique des patients en réanimation et de leur exposition aux dispositifs invasifs, la surveillance des infections nosocomiales doit être une priorité. De ce fait depuis 2004 le Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales coordonne la surveillance nationale REA-Raisin. Ce réseau a observé en 2015 la présence de *P. aeruginosa* dans 15.1 % des infections nosocomiales en réanimation, devant le *S. aureus* (10.6%) et le *S. epidermidis* (9.6%).



PNE : pneumopathies BAC : bactériémies BLC : bactériémies liées au CVC CVC+ : cultures de CVC positives (COL, ILC ou BLC)

Figure 3: Répartition des micro-organismes selon les différents sites surveillés ; Enquête de santé publique des infections nosocomiales en réanimation adulte, réseau rea-raisin 2016 (10)

L'enquête REA-Raisin de 2016 a démontré la présence majoritaire de *P. aeruginosa* dans les pneumopathies (19.4%) surclassant tous les autres germes pathogènes. Et il est isolé dans 10% des cas de bactériémies liées ou non à un cathéter veineux central. Cela justifie son importance particulièrement dans les services de réanimation (Figure 3).

I.2. Problématique de la résistance chez *P. aeruginosa*

I.2.1. Evolution de la résistance

P. aeruginosa est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques par la présence d'un gène inductible *ampC* codant pour une céphalosporinase et, par la présence de système d'efflux et d'imperméabilité donnant lieu de manière phénotypique une résistance aux aminopénicillines, à l'amoxicilline et acide clavulanique, aux céphalosporines de première, deuxième et troisième génération (sauf ceftazidime), au cotrimoxazole, à l'ertapénème, aux tétracyclines, et aux macrolides.

Peu d'antibiotiques restent actifs parmi lesquels sont habituellement utilisés les uréidopénicillines associées ou non à un inhibiteur de pénicillinase (pipéracilline +/-

tazobactam), les céphalosporines +/- inhibiteurs (ceftazidime, céfépime, ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam), les carbapénèmes (imipénème, méropénème), les aminoglycosides (gentamicine, tobramycine ...), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine).

De nos jours, les souches de *P. aeruginosa* sauvage restent fréquentes mais le nombre de souches ayant acquis des résistances reste important malgré une diminution ces dernières années. D'après le Centre Européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), on observe une diminution de résistance de toutes les familles d'antibiotiques actifs sur le *P.aeruginosa* entre 2015 et 2019 (Figure 4). (11)

Bacterial species	Antimicrobial group	2015		2016		2017		2018		2019		2019 EU/EEA country range*	Trend 2015-2019**
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacillin + tazobactam resistance	12 498	18.1	15 125	17.5	16 428	16.7	18 607	16.8	19 355	16.9	2.3-52.8	↓
	Ceftazidime resistance	12 498	15.4	15 219	14.4	16 512	14.7	18 960	14.1	19 849	14.3	3.5-52.2	↓#
	Carbapenem (imipenem/meropenem) resistance	12 840	19.3	15 573	18.2	17 109	17.4	19 233	17.2	20 127	16.5	0.0-55.4	↓
	Fluoroquinolone (ciprofloxacin/levofloxacin) resistance	12 803	20.9	15 504	18.8	16 951	20.2	19 211	19.7	20 273	18.9	4.5-52.2	↓#
	Aminoglycoside (gentamicin/netilmicin/tobramycin) resistance	12 825	15.3	15 525	14.0	16 979	13.2	19 186	11.8	20 109	11.5	0.3-48.9	↓
	Combined resistance to ≥3 antimicrobial groups (among piperacillin + tazobactam, ceftazidime, carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides)	12 863	14.6	15 628	13.4	17 129	13.0	19 306	12.6	20 296	12.1	0.0-49.7	↓

Figure 4 : Nombre total d'isolats invasifs testés (N) et pourcentage d'isolats de phénotype résistant (%), par espèce bactérienne et groupe d'antimicrobiens, moyenne UE/EEE pondérée en fonction de la population, 2015-2019

L'exposition constante des bactéries aux antibiotiques favorise la sélection de souches porteuses de gènes de résistances et favorise ainsi le transfert de gènes de résistance. Cette exposition aux antibiotiques peut être directement liée à une sur-prescription d'antibiotiques de large spectre aux patients ou de manière indirecte par une forte utilisation d'antibiotiques dans les élevages animaliers (essentiellement dans les pays en voie de développement) ou dans l'environnement végétal. Les données de Santé Publique France concernant la consommation d'antibiotique en établissement de santé entre 2019 et 2020, dans un contexte de réduction de l'activité de 8 % en nombre de journées d'hospitalisation, observe une augmentation de la consommation d'antibiotiques de 2,1 % en 2020, alors qu'elle était stable les années précédentes. Nous observons également une augmentation de l'utilisation des antibiotiques de large spectre avec une progression de 17% pour les carbapénèmes et de 13% pour l'association pipéracilline-tazobactam. L'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé de 2017 observait déjà une résistance aux carbapénèmes chez 13,46 % de *P. aeruginosa*. Ces évolutions pourraient être liées au Sars-Cov-2 et à une plus grande fréquence de surinfections aux bactéries multi-résistantes mais elles témoignent surtout d'un recours souvent abusif aux antibiotiques à large spectre.

La plasticité du génome bactérien, par mutations chromosomiques spontanées ou induites, ou encore par transfert horizontal de gènes ou de plasmides sont les principaux facteurs d'acquisition de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. Cette dernière peut également sur-exprimer certaines protéines d'efflux ou des porines, qui peuvent éjecter l'antibiotique dès sa pénétration cellulaire, réduisant considérablement l'efficacité de ces

antibiotiques. Il en résulte une sélection continue de souches résistantes conduisant à termes vers des impasses thérapeutiques.

I.2.2. Différents types de résistances

Comme nous venons de le voir, l'espèce *P. aeruginosa* possède de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ils peuvent être classés en résistance intrinsèque, acquise et adaptative. (12) Plus de 20% des isolats résistants aux pénicillines et aux céphalosporines anti-Pseudomonas, contre 30% à 40 % d'isolats résistants aux fluoroquinolones. La prévalence de résistance aux polymyxines (colistine et polymyxine B) reste quant-à-elle très faible (< 5%). (13)

a) La résistance intrinsèque

Elle est représentée par les caractéristiques structurelles ou fonctionnelles du *P. aeruginosa*, qui présente une perméabilité de sa membrane externe moindre que les autres BGN. Ceci est lié à la présence de phospholipides et de lipopolysaccharides empêchant la pénétration des antibiotiques.(14) L'entrée des nutriments se fait à travers les porines, protéines de structure en tonneau formées de feuilletts beta créant des canaux de diffusion dans la membrane.

Il existe quatre classes de porines :

- les porines spécifiques : OprB, OprD, OprE, OprO et OprP
- les porines non spécifiques représentée par OprF
- les porines fermées TonB-dependantes, comme OprC et OprH qui sont responsable de l'absorption de complexes ioniques
- les porines d'efflux de types "résistance-nodulation-division" (RND) qui sont les plus répandues : MexAB-OprM, MesXY-OprM, MexEF-OprN et MexCD-OprJ (15)

b) La résistance acquise

La résistance acquise est la conséquence d'une exposition aux antibiotiques avec une sélection de mutation chromosomique ou bien suite à l'acquisition horizontale de gènes par transformation, transduction ou conjugaison. Ces mutations peuvent, par exemple :

- Modifier la cible de l'antibiotique. C'est le cas par exemple des mutations sur certaines positions des gènes *gyrA* et *parC* codant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui donne lieu à une résistance aux quinolones.
- Entraîner la perte ou la diminution de production des porines OprD (voie d'entrée principale des carbapénèmes dans la bactérie) causée par une mutation du gène *oprD* ou l'une de ses protéines régulatrices comme *mexT*. Ce mécanisme provoque une résistance aux carbapénèmes. La mutation du gène *mexT* augmente également l'expression de MexEF-OprN qui entraîne une plus grande résistance à l'imipénème et aux autres antibiotiques substrats de cette pompe.
- Participer à la surexpression d'enzymes inactivant certains antibiotiques. Une mutation spontanée du gène *ampD* est à l'origine d'une surproduction de la

céphalosporinase ampC par levée d'inhibition du gène *ampC*. Un phénomène similaire est retrouvé avec ampR. (16)

L'accumulation des mutations chromosomiques peut être responsable de l'apparition de souches multirésistantes (MDR), qui comme tous germes nosocomiaux pourrait conduire à la création d'épidémies en milieu hospitalier. Le développement de ces souches pan-résistantes aux antibiotiques est le fruit de traitements d'infections graves et prolongées à *P. aeruginosa* survenant fréquemment chez les patients de réanimation ou d'unité de soins intensifs.

La résistance acquise peut également être consécutive à l'acquisition horizontale de gènes par transformation, transduction ou conjugaison comme cela a déjà été décrit pour les aminosides, les quinolones ou la colistine (gène *mcr-1*). (17)

c) La résistance adaptative

Enfin la résistance adaptative dépend des différentes modalités de croissance déclenchant des événements régulateurs dans la cellule, notamment chez *P. aeruginosa* avec la formation de biofilm donnant lieu à une diminution de sensibilité aux aminoglycosides, aux polymyxines mais également à la réponse immunitaire. Par exemple, l'ADN extracellulaire représenté par des exopolymères bactériens sécrétés par les bactéries, est un composant majeur de la matrice du biofilm, ayant la capacité d'acidifier l'environnement cellulaire, de modifier la perméabilité membranaire et la structure du lipide A dans le lipopolysaccharide, modifiant ainsi la réponse aux polymyxines.

I.3. Mécanismes de résistance chez *P. aeruginosa*

I.3.1. Les gènes de résistances naturels

Les résistances naturelles décrites sont documentées par la présence de plusieurs gènes chromosomiques (Annexe 2):

- *aph(3')*-IIb code une enzymes modifiant les aminoglycosides et induit une résistance naturelle à la kanamycine, streptomycine et néomycine (18)
- *blaOXA-50* code une oxacillinase (classe D dans la classification d'Ambler) induisant une résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline et au méropénème. (19) (la résistance à l'ertapénème est due à sa masse moléculaire et sa lipophilie très élevée). (20)
- *ampC* code une céphalosporinase inductible (classe C dans la classification d'Ambler) induisant la résistance à l'amoxicilline et acide clavulanique, aux céphalosporines de première génération (C1G), de deuxième (C2G) et troisième (C3G) génération (sauf la ceftazidime) (19)
- *NfxB* induit une résistance à l'ofloxacine et à l'érythromycine à travers la machinerie de pompe à efflux (21)

I.3.2. Résistance médiée par AmpC

I.3.2.1. Régulation d'AmpC

Plusieurs gènes sont impliqués dans la régulation du gène *ampC*, qui pourrait donner lieu à une hyperproduction d'AmpC avec une résistance à toutes les bêta-lactamines (sauf les carbapénèmes). Ces gènes de régulation sont : (13)

- *ampR* qui code un régulateur transcriptionnel de la famille LysR nécessaire à l'induction de la céphalosporinase
- *ampG* qui code une protéine transmembranaire, une perméase dans la membrane interne transportant les 1,6 anhydromuropeptides dans le cytoplasme
- *ampD* qui code pour l'enzyme N-acétyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase cytosolique qui hydrolyse le 1,6 anhydromuropeptides (récepteur de l'AmpC)
- *ampE* qui forme un opéron bicistronique *ampDE*, codant une protéine membranaire cytoplasmique censé agir comme une molécule de transducteur sensoriel nécessaire à l'induction
- *dacB* qui code une protéine de liaison à la pénicilline de type 4 (PBP4), son inhibition modifie l'équilibre du renouvellement des peptidoglycanes en faveur de l'autolyse

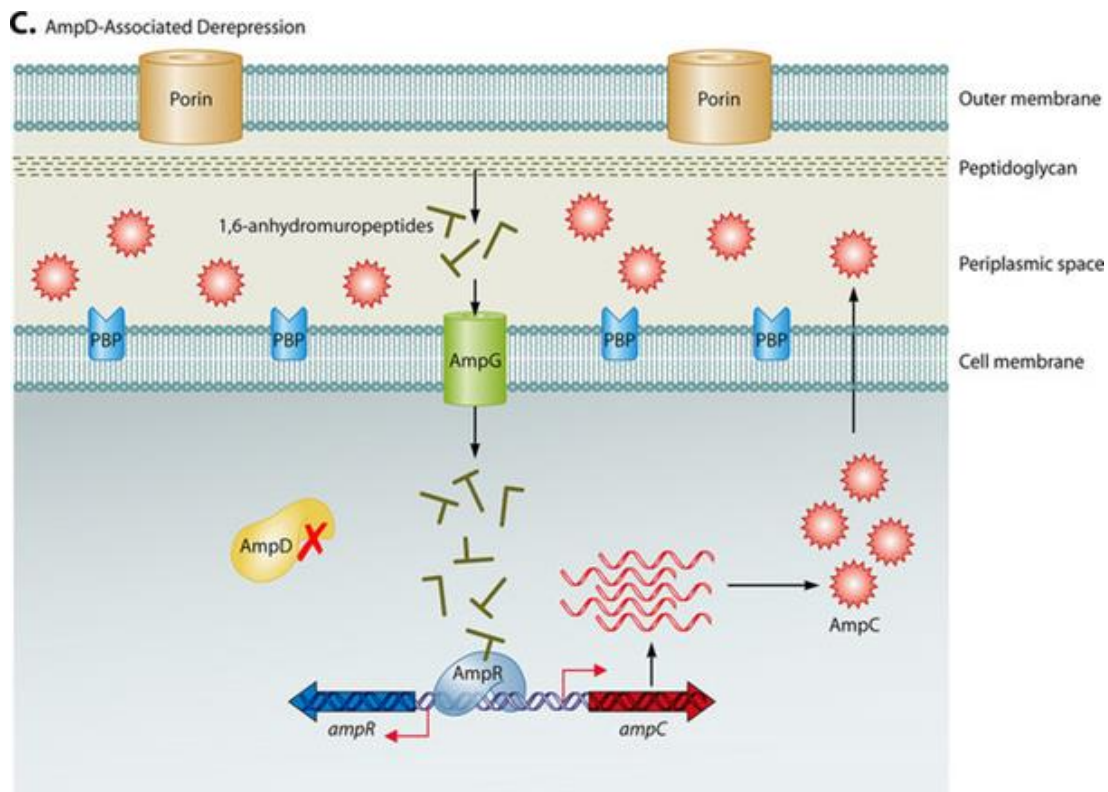


Figure 5 : Schéma récapitulatif de l'hyperproduction d'AmpC par inhibition de la répression d'AmpR (22)

Parmi les différentes mutations permettant l'hyperproduction d'AmpC dépendante d'AmpR, les plus fréquemment rapportées chez *P. aeruginosa* sont présentes sur *ampD* et *dacB*. L'action de la protéine DacB permet une augmentation de la quantité de muropeptides atteignant le cytosol, qui saturent les activités NagZ (N-acetylglucosaminidase) et AmpD,

fournissant une quantité accrue de peptides NAG-anhNAM (*N*-acétylglucosamine-1,6-anhydro-*N*-acétylmuramyl) et/ou de peptides anhNAM(1,6-anhydro-*N*-acétylmuramyl). Ces derniers déplacent le répresseur UDP-NAM-P5 (uridine 5'-pyrophosphoryl-*N*-acétylmuramic acid-pentapeptide) d'AmpR. AmpR est alors "verrouillé" dans une conformation d'activation transcriptionnelle d'*ampC*. L'hyperexpression du gène *ampC* entraîne une résistance aux β-lactamines hydrolysables telles que la céfoxitine. Ce phénomène est également possible lorsqu'il y a une mutation sur AmpD qui ne clive pas les mucopeptides (Figure5).(23) (24) (25)

En plus d'*ampD*, il existerait deux autres homologues dans l'espèce de *P. aeruginosa*, *ampDh2* codant une protéase située dans le périplasma et *ampDh3* codant une enzyme dont la localisation reste inconnue, ayant également une activité de clivage bien que moindre par rapport à AmpD sur les mucopeptides.

Ainsi des résistances plus ou moins importantes seront possibles lors de l'hyperproduction d'*ampC* par : (26)

- inactivation d'*ampD* seule qui augmente les CMI de 2 à 8 fois de toutes les bêta-lactamines (par exemple la mutation C->T sur le nucléotide 463 du gène *ampD*, créant un codon stop prématuré)
- inactivation seule de *dacB* qui provoque une résistance clinique à la ceftazidime, au céfépime, et à l'aztréonam (+/- pipéracilline/tazobactam)
- inactivation double d'*ampC* et *dacB* qui provoque la résistance de haut niveau à la pipéracilline/tazobactam, la ceftazidime, au céfépime, et à l'aztréonam.

On retrouve également des expressions hyper inducibles du gène *ampC* de haut niveau avec la présence de double mutant *ampD/ampDh2* augmentant fortement la CMI de la céfépime, de l'aztréonam, de la ticarcilline et légèrement de la ceftazidime ou encore *ampD/ampDh3* qui augmente fortement toutes les CMI des bêta-lactamines.

L'antibiotique ceftolozane/tazobactam fait partie des indications de dernière intention lors d'une impossibilité d'utiliser les carbapénèmes, des fluoroquinolones ou d'autres bêta-lactamines. Mais récemment, de premières mutations ont été décrites notamment la substitution D135N transformant AmpR en un activateur transcriptionnel constitutif d'*ampC*,(27) ou encore les variations R86C et G154R qui transforment MexR en un puissant activateur de l'expression d'*ampC*. (28)

I.3.2.2. Variants d'*ampC*

Comme nous l'avons vu le *P. aeruginosa* abrite un gène chromosomique inducible *blaAmpC* codant une céphalosporinase, avec un système de régulation plus complexe que ceux retrouvés chez les membres de la famille des Enterobacteriaceae. La surproduction mutation-dépendante de la bêta-lactamase intrinsèque AmpC (également appelé PDC pour Pseudomonas Derived Cephalosporinase) est considérée comme la principale cause de résistance des isolats de *P. aeruginosa* aux pénicillines et céphalosporines avec notamment l'acquisition de résistance à la ticarcilline, à la pipéracilline, au ceftazidime et au céfépime (C4G). Il existe également de nombreux variants de PDC nommé ESAC (Extended Spectrum AmpC) qui donnent lieu à des profils de résistance particuliers concernant toutes les bêta-lactamines même les carbapénèmes. Ces derniers ne sont pas hydrolysés par AmpC donc il n'y a pas de résistance lors de surproduction d'AmpC mais lors d'AmpC modifié (ESAC) celles-ci peuvent avoir une sensibilité diminuée.(29)

La difficulté majeure une fois le séquençage de l'entièreté du gène AmpC, est de déterminer le réel impact des mutations modifiant l'activité enzymatique d'AmpC. En effet, il est possible d'observer plusieurs mutations qui confèrent des modifications phénotypiques uniquement lorsqu'elles sont associées.

Parmi les variants notables de PDC, nous retrouvons PDC-1 correspondant à la céphalosporinase AmpC de type sauvage décrite chez PAO1 et d'autres enzymes qui diffèrent de PDC-1 par des substitutions ou insertions d'acides aminés dans quatre régions à proximité du site actif hydrolysant les céphalosporines naturellement résistantes : la boucle Ω , l'hélice H-10, l'hélice H-2 et l'extrémité C-terminale de la protéine. Ces modifications donnent lieu à une extension du spectre d'hydrolyse, facilitant l'attaque de composés comme la ceftazidime ou le céfépime. Les mutations sur la boucle Ω ont été décrites comme étant le site présentant le plus grand nombre de mutations impliquées dans l'extension du spectre d'activité de la β -lactamase. (30)

La substitution d'acide aminé unique de la thréonine à l'alanine de PDC-1, résulte à PDC-3 qui est la substitution la plus courante d'AmpC. L'addition d'autres mutations ont permis de décrire d'autres phénotype de PDC telle que décrit sur la Figure 6, notamment PDC 2, 4 et 5 ont montré une sensibilité diminuée pour toutes les bêta-lactamines (ceftazidime, céfépime, aztreonam sauf les carbapénèmes).

Motif/domaine	Mutations	Nb souches 2019	Nb souches 2020
Hélice H2	T70I	3	3
Entre H3 et H4	Q120K	1	2
Entre H3 et H4	F121L	3	3
Hélice H5	P154L	1	2
Hélice H5	G157D	0	5
Boucle Ω	G203S	3	4
Boucle Ω	G203D	0	2
Boucle Ω	Δ R212-L218	2	3
Boucle Ω	V213A	4	6
Boucle Ω	V213G	0	1
Boucle Ω	G216S	2	1
Boucle Ω	G216R	0	1
Boucle Ω	P217S	0	1
Boucle Ω	P217R	0	1
Boucle Ω	L218R	2	0
Boucle Ω	Δ A220-G224	0	1
Boucle Ω	E221G	3	2
Boucle Ω	E221K	3	4
Domaine R2 (H10)	Δ T290-P291	0	1
Domaine R2	Q295P	1	0
Entre R2 et H11	N321NN	0	1
Hélice H11	N347I	0	2
H2 + boucle Ω	T70I + E221K	1	1
H3/H4 + boucle Ω	Q120K + E221K	0	1
H3/H4 + boucle Ω	F121L + E221K	0	1
Hélice H6	F171L + E172K	1	0
Boucle Ω + R2/H11	D208N + N321S	1	0
R2 +R2/H11	L294P + N321S	1	0
TOTAL		32	49

Figure 6 : Exemple de mutation retrouvé sur les 4 domaines des ESAC identifié dans le rapport d'activité 2019-2020 Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques

PDC-producing strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a					
	TIC	TZP	ATM	CAZ	FEP	CZ/T
4098(pUCP24)	16 (8)	4 (≤ 2)	4 (2)	1 (1)	1 (≤ 0.5)	0.5 (≤ 0.25)
4098(pPDC-1) ^c	64 (16)	64 (≤ 2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)
Group 0						
4098(pPDC-3)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	16 (2)	8 (1)	1 (0.5)
4098(pPDC-8)	64 (16)	32 (4)	16 (2)	8 (1)	4 (1)	1 (0.5)
4098(pPDC-24)	64 (8)	64 (≤ 2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)
4098(pPDC-34)	64 (16)	64 (≤ 2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)
4098(pPDC-35)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	8 (1)	8 (1)	1 (0.5)
Group I						
4098(pPDC-50)	128 (16)	64 (4)	32 (4)	64 (2)	8 (1)	4 (0.5)
4098(pPDC-74)	256 (128)	8 (4)	128 (32)	>64 (32)	8 (4)	8 (4)
4098(pPDC-75)	256 (128)	16 (8)	128 (32)	>64 (64)	8 (4)	8 (4)
4098(pPDC-78)	>512 (512)	32 (16)	>128 (128)	>64 (>64)	16 (16)	16 (16)
4098(pPDC-79)	256 (128)	16 (16)	32 (16)	>64 (64)	16 (8)	64 (32)
4098(pPDC-80)	128 (64)	32 (16)	16 (8)	64 (16)	4 (2)	32 (8)
4098(pPDC-85)	256 (64)	16 (4)	32 (8)	32 (8)	8 (2)	4 (4)
4098(pPDC-86)	256 (128)	16 (16)	32 (32)	>64 (>64)	16 (8)	>64 (64)
Group II						
4098(pPDC-44)	32 (16)	16 (4)	8 (2)	64 (4)	>64 (4)	2 (0.5)
4098(pPDC-88)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	64 (2)	>64 (4)	4 (0.5)
4098(pPDC-89)	32 (16)	32 (8)	16 (4)	>64 (16)	>64 (32)	8 (2)
4098(pPDC-90)	16 (16)	16 (4)	8 (2)	>64 (8)	>64 (16)	4 (1)
4098(pPDC-91)	32 (16)	64 (8)	32 (8)	>64 (16)	>64 (64)	16 (2)
4098(pPDC-92)	32 (16)	32 (4)	16 (4)	64 (8)	>64 (16)	4 (1)
Group III						
4098(pPDC-73)	128 (16)	64 (≤ 2)	32 (2)	64 (2)	16 (1)	8 (1)
4098(pPDC-81)	128 (16)	64 (≤ 2)	16 (2)	64 (2)	16 (2)	8 (1)
4098(pPDC-82)	128 (32)	32 (8)	16 (4)	64 (8)	8 (2)	16 (8)
Group IV						
4098(pPDC-76)	32 (16)	16 (4)	16 (4)	>64 (16)	16 (2)	4 (1)
4098(pPDC-87)	64 (16)	32 (8)	32 (4)	>64 (32)	32 (8)	8 (2)
Groups I + IV						
4098(pPDC-84)	32 (16)	16 (4)	64 (16)	>64 (64)	32 (8)	16 (4)

Figure 7: Profil de résistance d'une souche de *P. aeruginosa*, délétée de la bêta-lactamase AmpC et complétée avec des gènes mutés de ampC donnant lieu à différents types de PDC. (30)

Les différents variants d'AmpC sont associés à différents types de séquences donnant lieu à des CMI d'antibiotiques pouvant être différentes (Figure 7). Par exemple, blaPDC-35 est toujours associée au ST235. Par ailleurs, cette dernière est presque toujours associée dans la littérature à une résistance au ceftolozane/tazobactam.(31)

I.3.3. Résistance par modification des porines

La résistance à l'imipénème est principalement due à des modifications structurales ou la perte de la protéine de membrane externe OprD donnant lieu à une imperméabilité des porines D2. Cette imperméabilité est rarement présente de manière isolée et elle est souvent associée à d'autres phénomènes de résistances telle qu'une hyperproduction de céphalosporine AmpC ou des pompes à efflux.

I.3.4. Autres mécanismes de résistances aux bêta-lactamines

D'autres enzymes acquises peuvent être retrouvées chez *P. aeruginosa* tels que des : (32)

- bêta-lactamases à spectre étendue (BLSE) de type
 - VEB-1a associée à une résistance de haut niveau à la ceftazidime et à l'aztreonam
 - SHV-2a associée à la résistance à la ticarcilline, à la pipéracilline et au céfépime. La ceftazidime n'est pas impactée par cette enzyme
 - PER-1 associée à la résistance de haut niveau à la ceftazidime et à l'aztreonam
 - GES-1 associée à la résistance à toutes les bêta-lactamines, à l'exception de l'imipénème, du méropénème et de l'aztreonam.

- carbapénémases :
 - De type B de la classification d'Ambler (métallobêta-lactamase) telles que VIM-2 ou NDM-1 associée à une résistance à toutes les bêta-lactamines, à l'exception de l'aztreonam. La métalloenzyme VIM-2 confère une multirésistance notamment à l'imipénème. Elle est codée par un gène situé sur un transposon favorisant et facilitant son transfert aux bactéries expliquant son émergence et sa place de carbapénémase la plus répandue au niveau international.
 - De type A de la classification d'Ambler telle que GES-5, qui est associée à une résistance de haut niveau à l'imipénème et au méropénème (si porine OprD altérée). La ceftazidime n'est pas impactée par cette enzyme.

Il existe également chez certains isolats une surexpression des systèmes d'efflux notamment la surproduction de système d'efflux MexAB-OprM conduisant à une baisse de la sensibilité voire à une résistance à la ticarcilline +/- acide clavulanique, au méropénème, à l'aztreonam et à la ciprofloxacine.

La résistance au céfépime avec une diminution de sensibilité à la ceftazidime sont liées à la surexpression de la pompe à efflux MexXY-OprM ou à la production de bêta-lactamase de type OXA-30. (33)

Enfin, il existe de nombreuses combinaisons de résistances aux bêta-lactamines qui rendent compte de toute la complexité phénotypique de résistance de l'espèce *P. aeruginosa*.

I.3.5. Principales résistances aux fluoroquinolones :

Les infections à *P. aeruginosa* peuvent être difficile à traiter au vu de l'acquisition de résistance aux antibiotiques de premier intention, ainsi les fluoroquinolones peuvent être une alternative thérapeutique d'autant plus que son utilisation peut être administrée par voie orale. La principale fluoroquinolone utilisée est la ciprofloxacine.

Leur mécanisme d'action est une inhibition enzymatique de l'ADN gyrase (topoisomérase II) et de la topoisomérase IV, jouant un rôle majeur de la réplication de l'ADN. Elles sont composées de deux sous-unités chacune, gyrA et gyrB pour l'ADN gyrase et parC et parE pour la topoisomérase IV. (34)

La résistance aux fluoroquinolones peut être causé par trois mécanismes :

- la mutation des gènes codant les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV, correspondant au plus fréquent des mécanismes de résistance. Cette résistance est également de haut niveau, avec une possibilité d'avoir des mutations concomitantes sur les deux enzymes.
- la surexpression des systèmes de pompe à efflux, qui diminuent la concentration intracellulaire de quinolones, dues à une mutation des gènes régulateurs *mexR* et *nfxB* (35)
- une imperméabilité de la membrane

Des régions spécifiques déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) ont été identifiées au niveau du gène *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Des mutations telles que T83I et D87N au niveau de *gyrA*, ou S87L et A88P au niveau de *parC*, confèrent un haut niveau de résistance. (34)

En effet, l'altération de la thréonine polaire en isoleucine non polaire et hautement hydrophobe, modifie l'interaction gyrase-quinolone par la perte partielle ou totale de l'interaction enzyme-médicament ou par des modifications conformationnelles pouvant provoquer une résistance aux antibiotiques. Ces régions sont donc essentielles au fonctionnement de cette famille d'antibiotiques sur *P. aeruginosa*.

I.3.6. Principales résistances aux aminosides

Les aminosides possèdent un spectre large sur les bactéries à métabolisme aérobie et un effet bactéricide rapide et puissant, ils occupent donc une place importante dans le traitement des infections. L'utilisation de la kanamycine et de néomycine lors d'infection à *P. aeruginosa* est inefficace de par la présence naturelle de son gène chromosomique *aph(3')-IIb*. L'utilisation des aminosides sur le *P. aeruginosa* reste faible de par la capacité d'acquérir des mécanismes de résistances additionnels : diminution de la pénétration des aminosides par modification des lipopolysaccharides ou altération du transport actif, hyper-expression d'une pompe à efflux, inactivation enzymatique ou altération de la cible ribosomale. (36)

L'inactivation enzymatique des aminosides est le principal mécanisme de résistance à cette famille d'antibiotique, il existe 3 classes d'enzymes (37) :

- les aminoglycosides O-phosphoryltransférases (APH) , codées par le gène *aph (3')-VI*
- les aminoglycosides O-adenyltransférases (ANT) codées par le gène *ant (2'')-I*
- les aminoglycosides N-acétyltransférases (AAC) codées par les gènes *aac (6')-I* et *aac(6'')-II*

Les enzymes peuvent être cumulatives est ainsi donner des phénotypes de résistance plus ou moins importants aux différents aminosides.

I.4. Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*

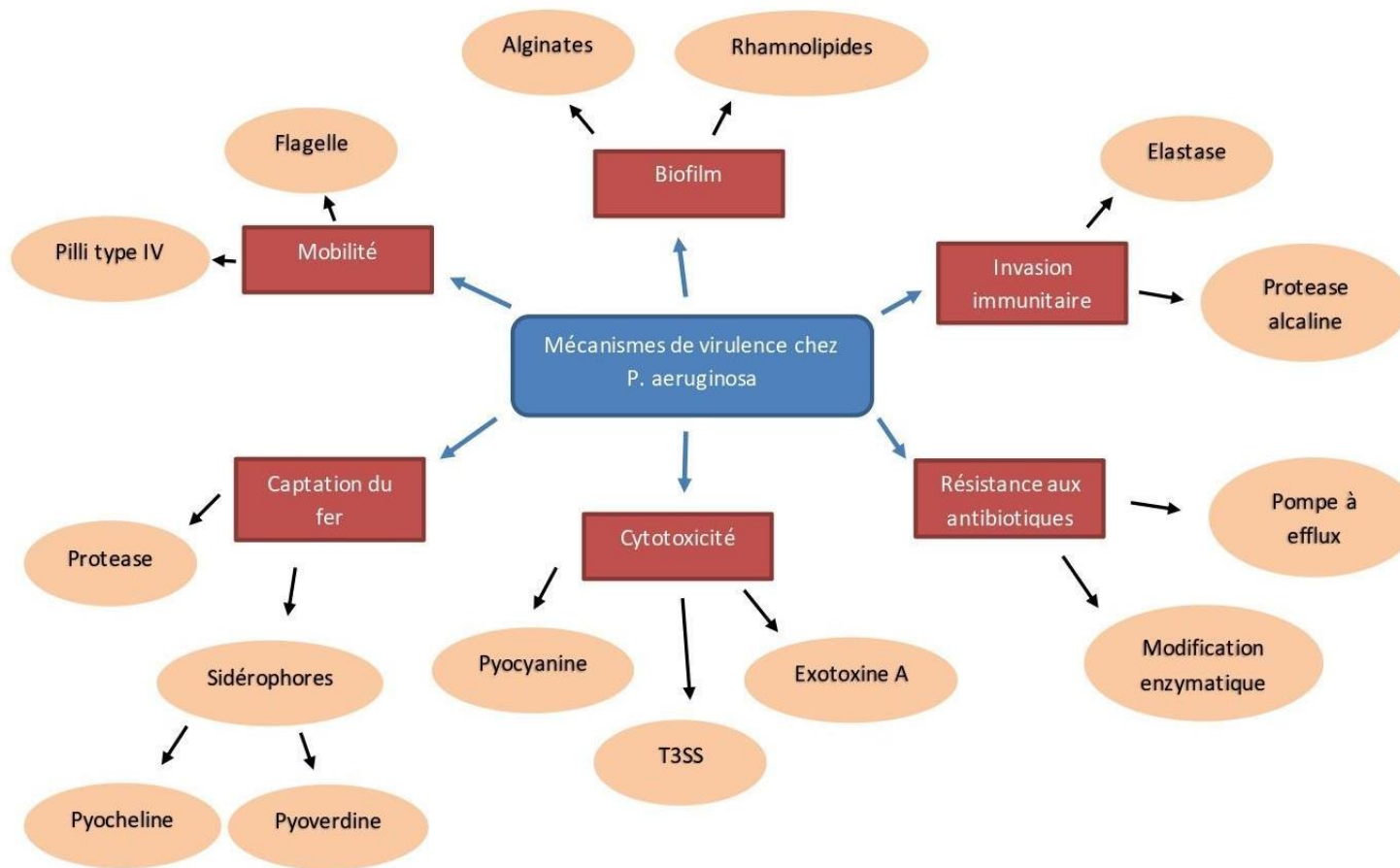


Figure 8: Schéma regroupant les principaux mécanismes de virulence retrouvés chez *P. aeruginosa*

I.4.1. Définition

L'espèce *P. aeruginosa* possède de nombreux gènes codant différents facteurs de virulence lui permettant ainsi de s'adapter à son environnement tout en persistant dans certains milieux hostiles ou encore au sein de son hôte (Figure 8). Ces facteurs sont impliqués dans les différentes étapes d'invasion des tissus que ça soit au cours d'une infection ou d'une colonisation. Ils jouent également un rôle dans la survie de la bactérie notamment en inhibant les défenses immunitaires de l'hôte. On retrouve des facteurs de virulence exprimés de manière précoce tandis que d'autres facteurs seront exprimés plus tardivement (lors d'une infection chronique par exemple). Ces facteurs sont reconnus pour avoir une pathogénicité différente :

- Les facteurs d'adhérence et de motilité permettant une progression rapide dans les tissus et une adhésion aux épithéliums, couplé aux facteurs impliqués dans les systèmes de sécrétion permettant l'injection de toxines et de protéases responsables de l'inflammation, de lésions cellulaires et tissulaires. Ces facteurs de virulence sont typiquement impliqués dans l'infection aiguë et l'invasion des tissus.
- Les facteurs de virulence impliqués dans les infections chroniques : une fois l'hôte infecté, la bactérie devra survivre et lutter contre les défenses acquises et innées de l'hôte, les éventuels traitements anti-infectieux et l'environnement. Cela passe notamment par la présence d'une pseudocapsule d'alginate. L'espèce *P. aeruginosa* a une forte capacité d'adaptation avec la possibilité d'inhiber l'expression de certains de ces facteurs très immunogènes grâce aux pili et la présence du système du quorum-sensing permettant une modification phénotypique de sa mucosité et la formation de biofilm

I.4.2. Facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité

Premièrement, les facteurs de virulence permettant le déplacement (flagelle) ou l'adhérence de la bactérie à un support sont primordiaux pour la colonisation des épithéliums et des muqueuses de l'hôte. Cette étape est essentielle pour initier un processus infectieux.

I.4.2.1. Le flagelle

Le flagelle est un constituant principal de l'espèce *P. aeruginosa*. Sa longueur est de 15 à 20 μm et il est constitué d'une vingtaine de protéines codées par une cinquantaine de gènes répartis en 17 structures opéroniques (Figure 9). Une similitude de structure avec le système de sécrétion de type 3 (T3SS) existe (Figure 10A). Trois parties distinctes assemblées en cascade peuvent être différenciées : le corps basal et le moteur sont tout d'abord assemblés, suivis du crochet puis du filament. Plusieurs protéines composent chacune de ces structures : (38)

- Le corps basal est implanté dans la paroi bactérienne et traverse la membrane externe et interne intercalé par le périplasme, il est formé des anneaux C, L, MS et P, d'une tige centrale, FliF, et contient un appareil d'export des protéines sécrétées comme la flagelline qui formera le filament.

- Le moteur contrôle le sens de rotation du flagelle. Il est composé des protéines MotAB ou MotCD, qui forment un canal ionique permettant le passage des ions H⁺ apportant de l'énergie pour la rotation du flagelle. Cette énergie est également apportée en hydrolysant l'ATP en ADP. La structure de cette partie est observable sur la Figure 10B par microscopie électronique.
- Le crochet joue le rôle de transmission du mouvement rotatoire, c'est un tube creux permettant à la flagelline de rejoindre l'extrémité distale.
- Le filament (composé des protéines FliC et FliD) n'est créé qu'une fois le corps basal et le crochet entièrement constitués. Il a une structure hélicoïdale constituée d'environ 20 000 sous-unités de flagelline FliC et permet à la bactérie un déplacement par un mouvement d'hélice actionné par le moteur du corps basal.

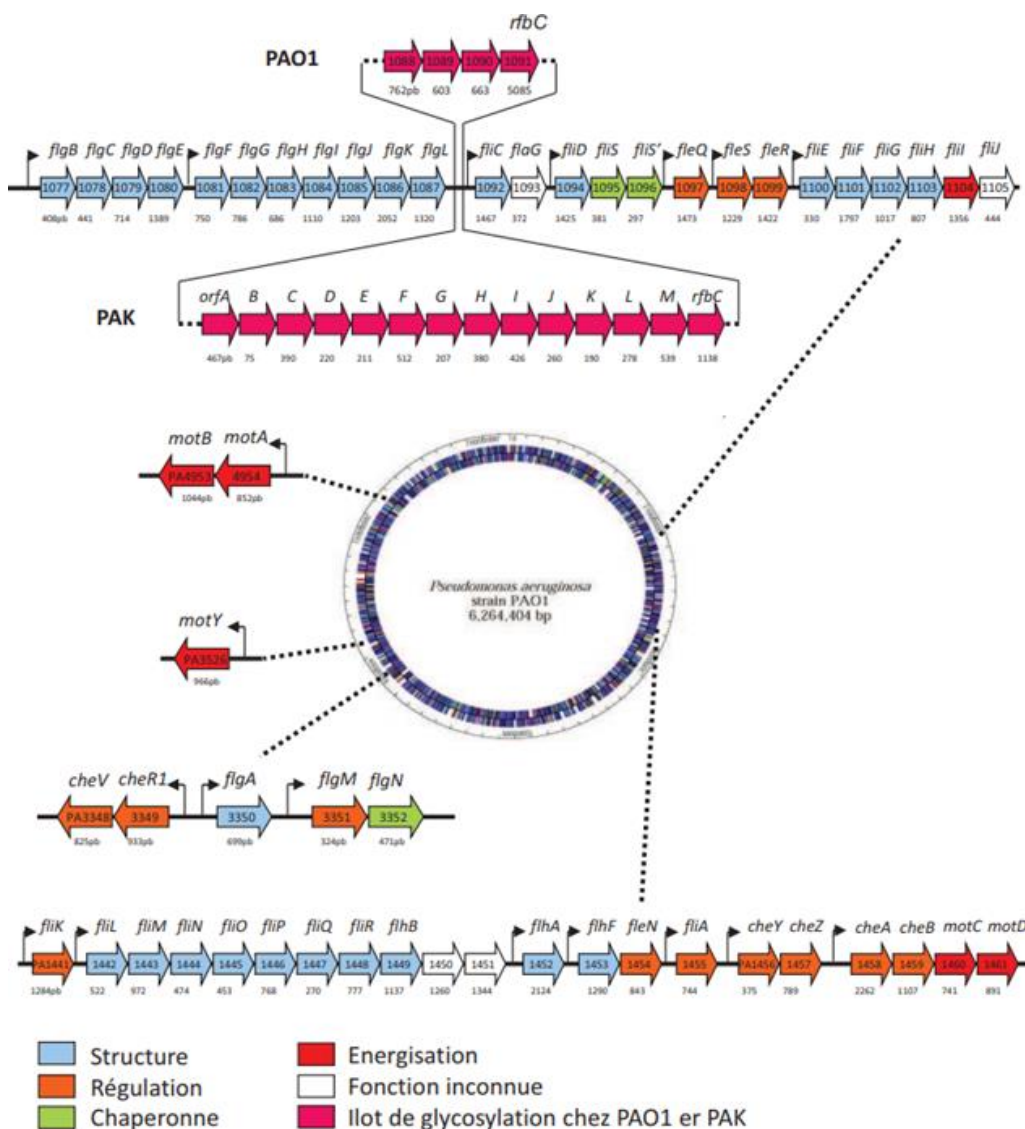


Figure 9 : Organisation des loci de gènes impliqués dans la biogénèse du flagelle et dans sa régulation (38)

Le flagelle unique polaire de *P. aeruginosa* confère à la bactérie une mobilité de type «swimming». Cette dernière est unidirectionnelle et caractéristique de l'espèce. Au microscope, la bactérie traverse le champ telle une étoile filante en milieu liquide ou de faible viscosité ($\leq 0,3\%$ de concentration en gélose). (39) Nous retrouvons également une mobilité de type «swarming» permettant cette fois-ci un déplacement sur une surface semi-solide (milieu composé de 0,4 à 1 % d'agar). (40) Ce type de mobilité est possible grâce à la présence combinée du pili de type IV (codés par les gènes *pilR* et *pilA* sauvages), d'une synthèse adéquate de rhamnolipides et de la présence de certains acides aminés fournissant une source suffisante d'azote (glutamate, aspartate, histidine ou proline). (41)

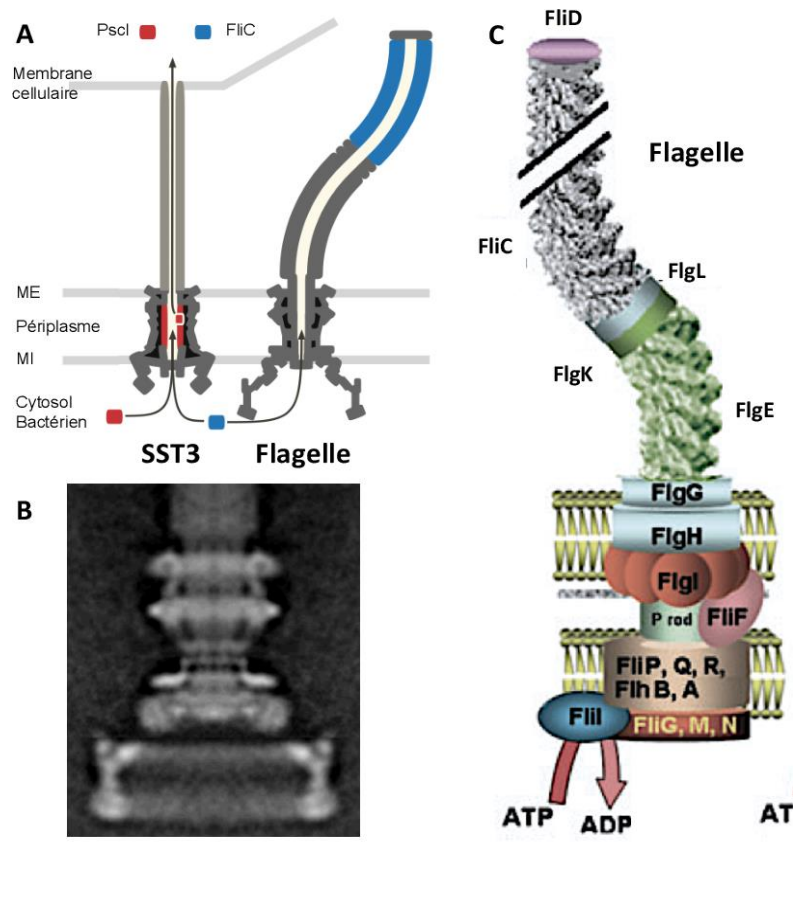


Figure 10 : Structure d'un flagelle de *P. aeruginosa*

Le flagelle est un élément essentiel de la virulence de la bactérie lors d'une infection, en plus de la diffusion bactérienne avec sa fonction de motilité, il est capable d'initier une adhésion notamment sur les cellules épithéliales respiratoires par interaction des sous-unités FliC à des glycolipides des cellules épithéliales (les asialo-GM1) et la formation d'un biofilm. Sa virulence est aussi causée par l'induction d'une réponse inflammatoire par l'interaction des récepteurs Toll, TLR5 et TLR2, avec les sous-unités de la flagelline FliC provoquant la sécrétion de cytokines, IL-8 et IL-6, et de mucines. (42) Pour contrer cet effet très immunogène du flagelle le *P. aeruginosa* est capable d'inhiber sa synthèse afin d'échapper à la réponse immune de l'hôte lors d'infection chronique particulièrement dans le cas de la mucoviscidose. (43) Cette capacité d'adaptation est régulée par le système de transduction Wsp, produisant du di-GMP cyclique(c-di-GMP), messenger intracellulaire stimulant la formation de biofilm par

effet de cascade en permettant l'expression des gènes *pel* nécessaire à la synthèse des exopolysaccharides composant majoritairement le biofilm. (44)

I.4.2.2. Les pili de type IV

Les pili de type IV sont des polymères constitués de nombreuses sous-unités protéiques de 10 à 20 kDa, appelées pilines codées par le gène *pilA*, formant des filaments de plusieurs micromètres de long à la surface de la bactérie. La forme hélicoïdale de ces filaments permet une certaine extension et flexibilité. La présence de la protéine membranaire intégrale (IMP) associée à une ATPase donne lieu à un mouvement de rétraction/extension appelée motilité de « twitching ». Cette motilité est retrouvée chez de nombreuses espèces bactériennes. Elle est initiée par le pili de type IV qui va s'étendre en se liant et en se rétractant à la surface solide, permettant à la bactérie de se tirer en avant tel un treuil de traction (Figure 11). Les pili participent aussi à la mobilité de type « swarming » comme décrit précédemment. En plus de la fonction de motilité, les pili permettent la formation de microcolonies, l'adhésion aux cellules, et la sécrétion de protéases. (45)

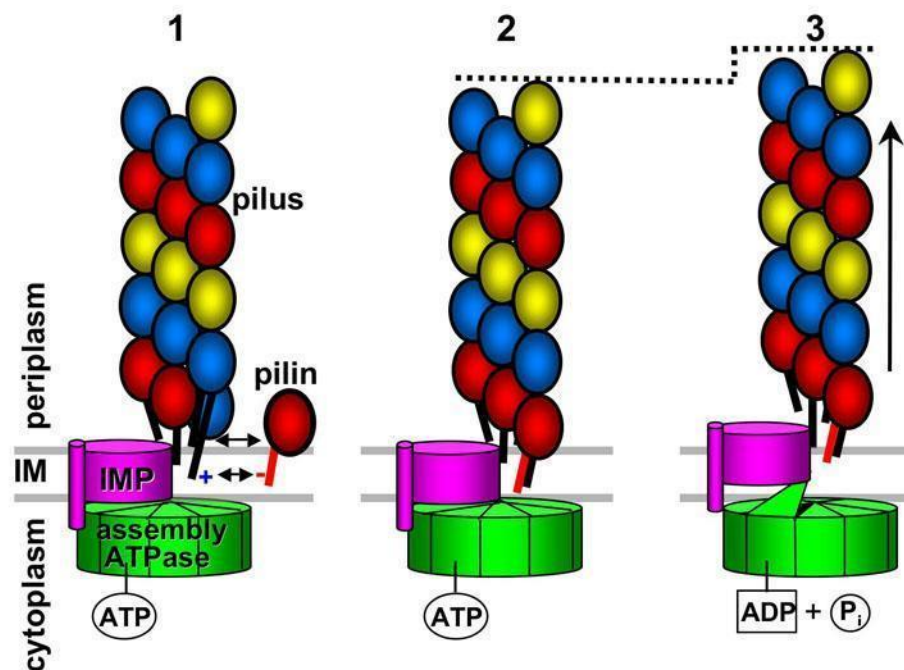


Figure 11: Structure du pili de type IV

Le pili de type IV joue un rôle majeur dans l'adhésion aux cellules épithéliales en interagissant avec les glycolipides asialo-GM1 et GM2 présents à la surface des cellules épithéliales. Lors d'atteintes pulmonaires notamment dans la mucoviscidose, la régénération des cellules épithéliales pulmonaires provoque une forte exposition d'asialo GM1 qui favorise l'adhérence du *P. aeruginosa*. (46)

Ce facteur de virulence majeur chez l'espèce *P. aeruginosa* est codée principalement par 13 gènes répartis en trois groupes présentés sur la Figure 12.

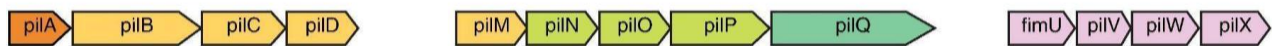


Figure 12 : Organisation génétique et composition du système d'assemblage de pili de type IV

En orange foncé *pilA* codant pour la sous unité principale de la piline

En orange clair : gènes *pilB*, *pilC*, *pilD* et *pilM* codant pour l'ATPase

En rose les gènes piline mineurs

En vert clair les gènes codant pour le module de connexion à la bactérie

En vert foncé : gène de la sécrétine

I.4.2.3. Pili de type fimbriae (ou cup)

En plus du flagelle et des pili de type IV, la formation et la maturation du biofilm implique des structures fimbriales appelées CUP pour "chaperone-usher pathway". Ces dernières ont un rôle dans l'adhésion de la bactérie aux surfaces biotiques et abiotiques. Ce sont des appendices filamenteux non flagellaires mesurant jusqu'à 2µm de longueur, composés d'un assemblage de pilines pouvant aller d'une centaine à plusieurs milliers de sous-unités polymérisées dont leur apex présente une adhésine. (47) (48)

Tous les éléments des pili de type fimbriae sont codés par un cluster de gènes sur un même opéron (Figure 13). Trois systèmes principaux de Cup ont été identifiés chez PAO1 : CupA, CupB et CupC. Il a été démontré dans la bibliographie que le gène *cupA* était indispensable à la formation d'un biofilm contrairement à *cupB* et *cupC* qui ne semblent pas jouer un rôle dans la formation de biofilm mais plutôt dans l'interaction cellulaire lors de la maturation du biofilm. (49) D'autres systèmes de Cup ont été identifiés plus récemment : CupD (très proche phylogénétiquement de CupA) et CupE, qui interviennent dans la formation et la structuration du biofilm. CupD a été identifié au sein d'un îlot génomique de pathogénicité PAPI-1 des isolats PA14, sa présence pourrait contribuer à une virulence plus importante de la souche. (50)

Les pili du système CupA comprennent 5 gènes : une protéine chaperonne (*cupA2* et *cupA5*) se liant aux sous unités fimbriae sécrétées dans le périplasme par le système Sec. Les sous unités fimbriales codées par *cupA1* sont produites en grande quantité pour former la tige du pilus. Le gène *cupA4* code une adhésine à l'extrémité du pilus qui intervient dans l'attachement de la bactérie aux surfaces abiotiques. Ce complexe piline-protéine chaperonne est ensuite amené au niveau de la protéine oligomérique usher CupA3 qui forme un pore au niveau de la membrane externe permettant l'assemblage du pili et sa présentation à la surface externe de la bactérie.

La régulation de l'expression du gène CupA est complexe et réalisé selon deux voies (51) :

- le régulateur transcriptionnel Anr détecte l'anaérobiose ce qui déclenche la transcription du gène *cgrABC*, activant ainsi l'expression du gène *cupA*
- un messenger intracellulaire c-di-GMP, dont une forte concentration entraîne un niveau élevé d'expression du gène *cupA* (également de *cupC* et *cupD*)

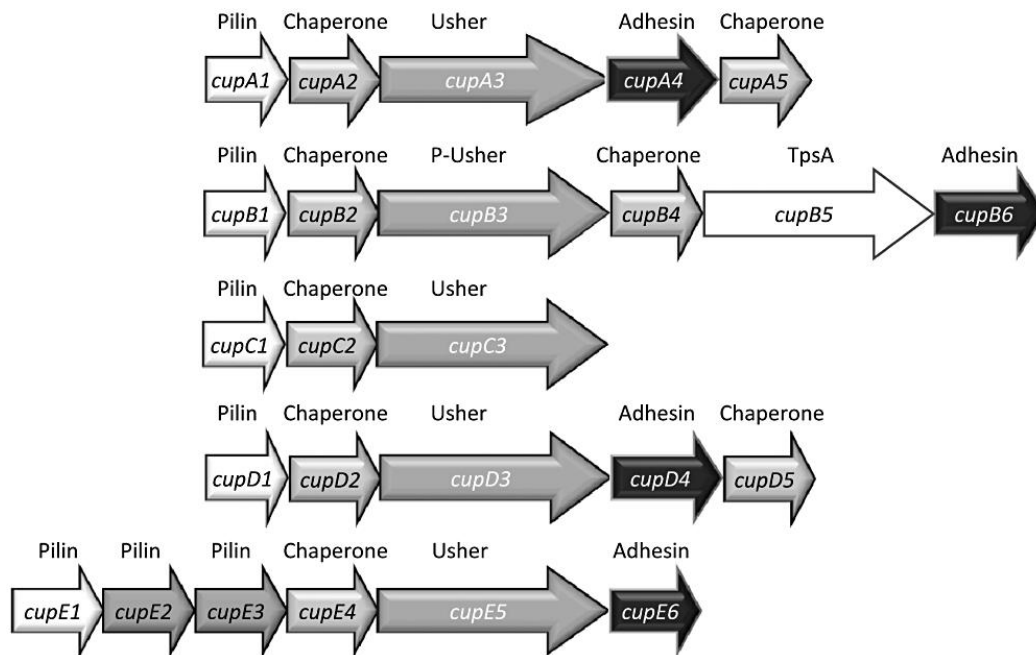


Figure 13: Organisation génétique des gènes codant pour les cinq systèmes Cup (A-E)

I.4.2.4. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS) est un déterminant essentiel des bactéries Gram négatif localisé dans la membrane externe. Il permet une protection contre les défenses immunitaires et les antibiotiques. Il n'est pas spécifique à *P. aeruginosa*. Plusieurs gènes, également regroupés en opéron, permettent de coder le LPS. Les principaux gènes sont *wbpA*, *wbpC*, *wbpF*, *wbpG*, *wbpP*, *wzy* et *wzz* (Figure 14). En fonction de l'expression de ces gènes une diversité de LPS est présente sur la bactérie (Figure15)

Le LPS est constitué de trois parties principales :

- Le lipide A ou endotoxine, molécule hydrophobe de 6 à 7 chaînes d'acides gras qui ancre le LPS au niveau de la couche externe de la membrane externe.
- La queue hydrophile composée d'un cœur polysaccharidique et de deux résidus de L-glycero-D-manno-heptose (Hep) servant de site de phosphorylation. Le cœur polysaccharidique est lui-même composé du core externe avec 3 types d'hexoses (D-glucose, L-rhamnose et D-galactosamine) et du core interne avec deux résidus d'acide 3-desoxy-D-manno-octulosonic (Kdo).
- L'antigène O ou Ag-O, également dénommé antigène somatique, est composé d'une chaîne formée d'un nombre variable d'oligosaccharide, correspondant à la partie la plus longue du LPS et la plus externe. La plupart des souches produisent deux formes distinctes d'Ag-O : un homopolymère de D-rhamnose qui est un antigène polysaccharidique commun à toutes les souches (CPA) et un hétéropolymère de trois à cinq sucres distincts dans les unités de répétition appelés antigène O spécifique (OSA). Les différences de composition dans les unités O d'OSA permettent la différenciation de 20 sérotypes différents de *P. aeruginosa*. (52)

P. aeruginosa est capable de synthétiser deux formes de LPS en fonction de la présence ou non de l'antigène O donnant un phénotype dit "lisse" en présence d'AgO ou un phénotype dit "rugueux" en absence d'AgO. Le phénotype lisse est décrit comme le plus virulent, de par sa résistance au sérum et à la phagocytose. Alors que les phénotypes rugueux sont facilement lysés dans le sérum.(53) Le système de sérotypage le plus complet pour *P. aeruginosa*, l'International Antigenic Typing Scheme (IATS) se compose de 20 sérotypes O standard. Les sérogroupes O les plus fréquents sont O1, O5, O6 et O11, responsables de 70 % des infections à *P. aeruginosa*. O1 est le sérotype le plus présent lors des décès, avec un taux de résolution clinique très faible. O6 et O11 sont les sérotypes les plus répandus dans les pneumonies nosocomiales causée par *P. aeruginosa*, avec une virulence plus importante pour O11 pouvant être expliquée par le fait qu'il soit souvent associé à l'expression de la toxine ExoU contrairement à O6 qui retrouve plus fréquemment des isolats ExoU négatif. (54,55)

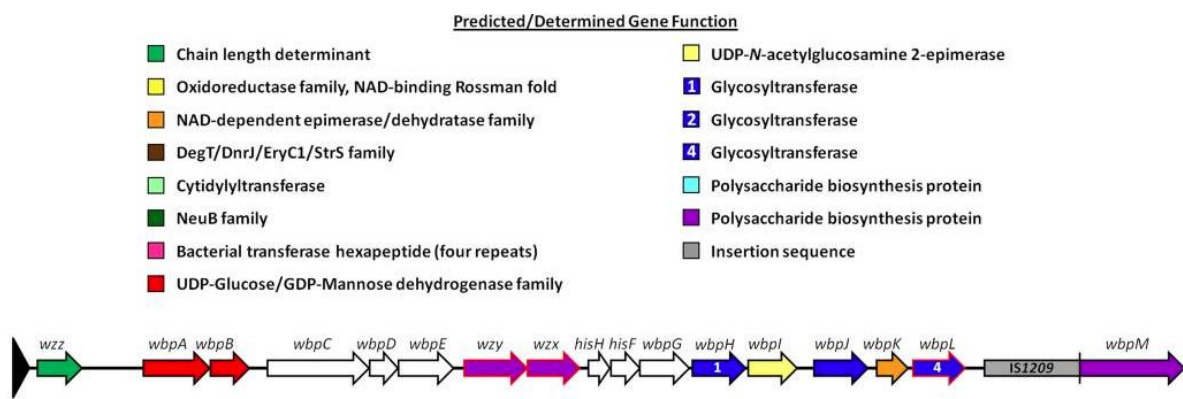


Figure 14: le polymère OSA du sérotype O5 est présenté comme un polymère représentatif avec la présence de tous les gènes présents même si cela ne correspond pas à l'AgO le plus long (52)

DIVERSITY OF SURFACE LPS GLYCOFORMS IN A SINGLE CELL

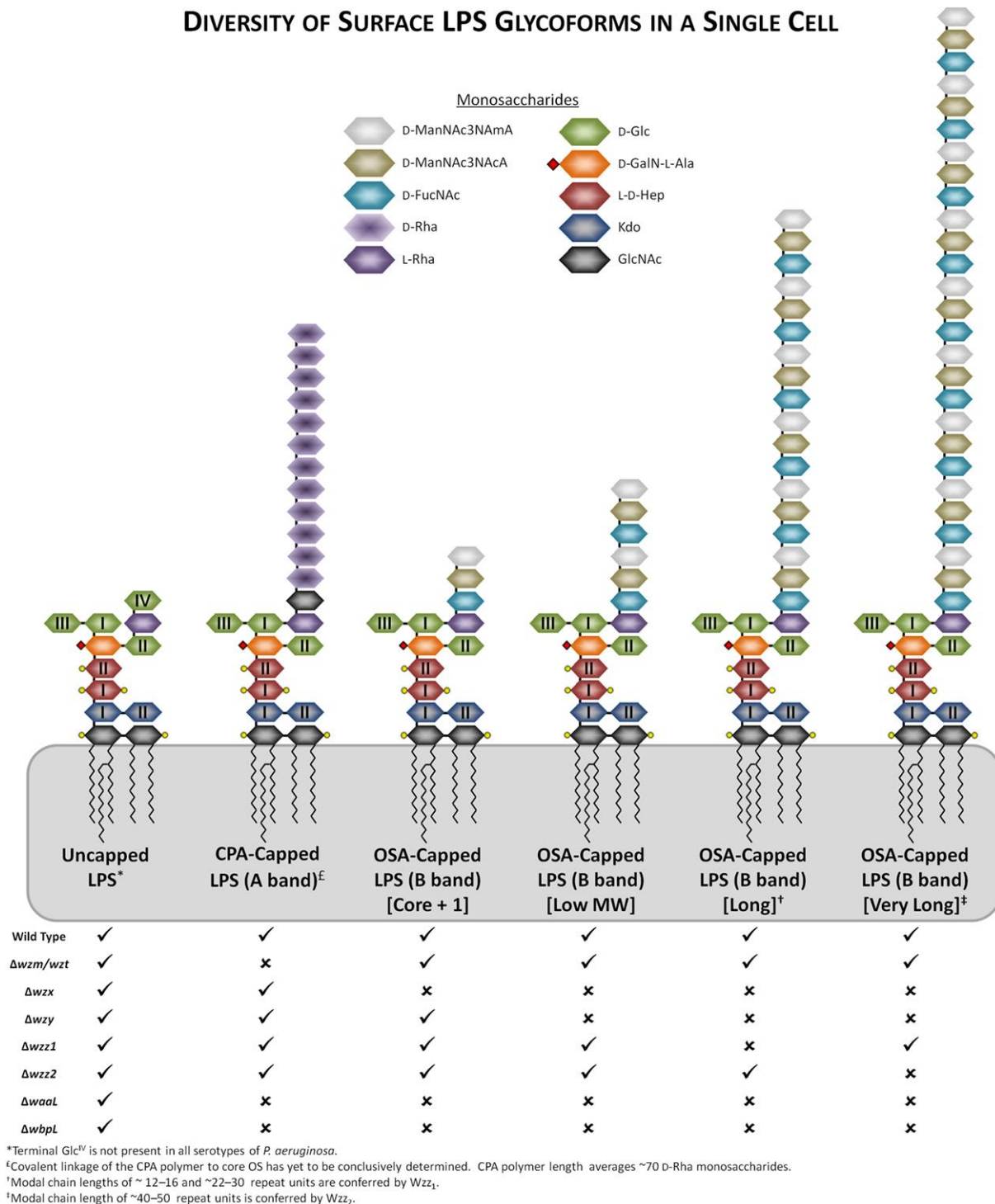


Figure 15: Représentations de la diversité des LPS glycoformes présentes à la surface d'une seule cellule de *P. aeruginosa*.

Les défauts génétiques des divers gènes de la voie d'assemblage et les changements qui en résultent dans la variété des glycoformes de LPS présents ont été indiqués, avec "v" ou "x" représentant respectivement leur présence ou leur absence. Les cercles jaunes et les losanges rouges indiquent les substitutions des différents lipides A et des sucres du noyau par des groupes phosphates et l-Ala. Le polymère OSA du sérotype O5 a été affiché comme polymère représentatif. (52)

Le LPS est considéré comme un puissant facteur de virulence notamment par son rôle principal dans l'activation immunitaire de la cascade du complément. Par exemple, le LPS peut se fixer sur les récepteurs TLR4, des macrophages et des cellules épithéliales, donnant lieu à une activation des voies dépendantes de MyD88 et de TICAM-1 permettant une réponse rapide du système immunitaire avec production de cytokines. (56) Le LPS peut également se lier à la protéine CFTR normal provoquant une internalisation dans les cellules épithéliales activant une réponse inflammatoire via la translocation nucléaire de NF- κ B. S'il y a une anomalie de CFTR, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose, la clairance des bactéries au sein des poumons sera moindre. De plus cette pathologie rend les patients déficients en protéine tensioactive A, en protéine tensioactive D et en lectines qui habituellement permettent de cibler le LPS par opsonisation. (53)

I.4.3. La formation de biofilm

Le *P.aeruginosa* est retrouvé dans l'environnement ou lors d'infections sous deux types de mode de vie :

- mode planctonique où la bactérie se déplace de manière libre dans un milieu liquide
- mode sessile, sous forme de biofilm. Les bactéries favorisent ce dernier mode de vie car elle donne lieu à une meilleure stratégie de survie.

P.aeruginosa a la capacité de s'adapter à son environnement en développant un biofilm. Le biofilm est représenté à 90 % par la matrice extracellulaire agissant comme un échafaudage pour l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques, et jouant le rôle d'abri pour les bactéries, qui ne représentent seulement 10 % de la biomasse du biofilm. Il est composé de microcolonies bactériennes enchevêtrées dans une substance polymérique extracellulaire (EPS) principalement composé de polysaccharides tels que les alginates ou les exopolysaccharides Pel ou Psl, des protéines, des lipides et de l'ADN extracellulaire. (57) Cette couche rend la pénétration des antibiotiques plus difficile et permet une résistance à la phagocytose et aux anticorps. En plus de ce rôle important de protection, le biofilm crée une micro-communauté contenant des nutriments essentiels, des enzymes, des protéines cytosoliques et facilite la communication de cellule à cellule. (58,59)

La formation du biofilm se fait en 5 étapes simplifiées :

1 / les bactéries adhèrent à une surface bien spécifique via les appendices cellulaires tels que le flagelle et les pili de type IV, dont l'adhésion est réversible ; cette adhérence est précédée par la sécrétion de nombreux produits permettant de préparer au mieux l'adhésion

2 / le passage d'une attache réversible à une attache irréversible avec un aplatissage des bactéries pour avoir le moins de contrainte physique

3 / la propagation des bactéries structurée en microcolonies

4 / la formation de structures tridimensionnelles composées d'exopolysaccharides avec maturation du biofilm et convergence des microcolonies

5 / le conglomerat de microcolonies est perturbé par l'autolyse cellulaire permettant la libération des cellules dispersées avec un passage des bactéries en mode planctonique et

ainsi l'ensemencement des espaces non colonisés. Il a été récemment démontré que l'endonucléase EndA est nécessaire à la dispersion du biofilm existant via la dégradation de l'ADN.(60) La structure des biofilms formés est influencée par la motilité d'essaimage avec des biofilms plats résultant de bactéries hautement mobiles, tandis que les biofilms en forme de champignon sont générés par des cellules à faible motilité.

Les trois exopolysaccharides de charges différentes sont : l'alginate (charge anionique), le Psl (neutre) et le Pel (charge cationique), tous impliqués dans l'attachement, la formation et la stabilité du biofilm.

I.4.3.1. Les alginates

Les alginates sont des polysaccharides de haut poids moléculaires chargés négativement et composés de beta-D-mannuronique (M) et d'alpha-L-gulonate (G) liés entre eux par des liaisons beta-1,4. Le polymère s'organise de trois façons possibles : le bloc homopolymère polyM, le bloc homopolymère polyG, ou encore le bloc hétéropolymère polyM/G. Les différents types de liaisons influencent les propriétés viscoélastiques du biofilm. L'alginate est uniquement produit par un sous-ensemble de souches de *P. aeruginosa* appelées les souches mucoïdes, en raison de la présence d'une mutation codant pour un facteur anti-sigma transmembranaire de l'allèle mucA22 responsable du facteur sigma AlgU/T. Ces souches mucoïdes ont été majoritairement retrouvées dans la mucoviscidose, signe d'une conversion d'infection aiguë à une infection chronique. L'alginate est codé par douze gènes présents sur un opéron (Figure 16).

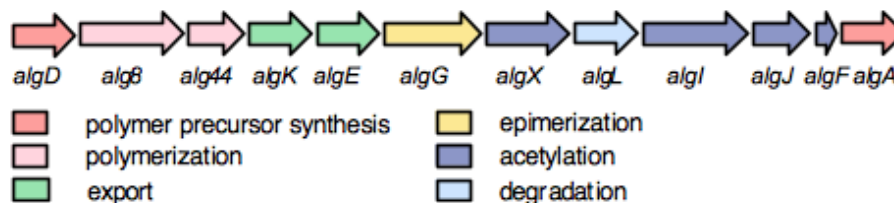


Figure 16 : Modèle du complexe biosynthétique d'alginate de *P. aeruginosa* (61)

En rouge : *algA* et *algD* codant les enzymes synthétisant le précurseur de l'alginate (GDP-mannuronate)

En rose : *algB* et *alg44* permettant la polymérisation et le transport de GDP-mannuronate dans le périplasme pour former ManA

En bleu foncé : *algF*, *algI*, *algJ* et *algX* permettant l'acétylation de ManA

En vert : *algK* et *algE* codant une porine exportant le polymère dans le milieu extracellulaire

En jaune : *algG* codant une enzyme d'épimerisation de l'alginate lui donnant une capacité de gélification et une capacité de se lier aux ions divalents tels que le calcium

En bleu ciel : *algL* codant une lyase dégradant des polymères d'alginate néo-synthétisés.(62)

Les souches non-mucoïdes forment des biofilms indépendamment de la biosynthèse d'alginate, notamment grâce à des exopolysaccharides alternatifs : le locus de synthèse des polysaccharides (Psl) et les polysaccharides pelliculaires Pel se substituant à l'alginate. (63)

I.4.3.2. Pel

Pel est un polymère polysaccharidique cationique de N-acétyl-D-glucosamine et de N-acétyl-D-galactosamine partiellement désacétylées, qui partagent certaines caractéristiques avec l'alginate et certaines protéines biosynthétiques. Nous ne connaissons pas encore clairement son rôle mais Pel est un composant matriciel essentiel du biofilm dans l'initiation de fixation à la surface, le maintien de l'intégrité du biofilm et une très bonne défense pour les bactéries. En effet, il a été démontré que Pel permettrait une résistance aux antibiotiques notamment aux aminoglycosides (64) et à la colistine qui pourrait mener à une impasse thérapeutique. (65)

Pel est chargé positivement permettant de réticuler l'ADN extracellulaire (= produit de la lyse cellulaire) dans la matrice du biofilm par le biais d'interactions électrostatiques et ainsi maintenir les interactions cellule-cellule. De plus cet ADN extracellulaire, source de nutriment pour les bactéries, est impliqué dans divers processus tels que la chélation de cations divalent (Mg^{2+} et Ca^{2+}) activant le système de sécrétion de type VI qui diffuse les facteurs de virulence au sein de l'hôte et l'acidification de l'environnement limitant la pénétration des agents antimicrobiens. (59)

Les sept gènes présents sur l'opéron *pel*/ABCDEFGF codent pour sept produits géniques nécessaires à la formation du biofilm (Figure 17)

Contrairement à l'alginate avec *algA* et *algD*, l'opéron *pel* ne semble pas porter de gènes pour la synthèse de son précurseur sucre-nucleotide, suggérant que cette synthèse est dérivé du métabolisme central du carbone en utilisant des enzymes d'autres voies de synthèse des glucides. (66)

On retrouve uniquement la protéine PelF dans le cytoplasme, une glycosyltransferase impliquée dans la polymérisation. Le polymère est ensuite transporté à travers la membrane interne par PelD, PelE et PelG. PelD localisé dans la membrane interne permet la fixation au c-di-GMP, messenger impliqué dans la transition entre les modes de vie planctoniques et sessile du *P. aeruginosa* et permet une régulation post-transcriptionnelle de la biosynthèse de Pel via la protéine FleQ. (67)

PelB est une porine localisée dans la membrane externe et le périplasma jouant un rôle d'échafaudage pour l'assemblage du complexe, la protection du polysaccharide contre une dégradation périplasmique (68) et permet son passage dans le milieu extracellulaire. La seconde protéine de membrane externe est la lipoprotéine PelC (69) formant un anneau dodecamérique chargé négativement créant un entonnoir électronégatif qui guide le Pel cationique vers un canal de sortie formé par PelB. (70) C'est sur PelC que se fait l'insertion du polymère dans la membrane externe pour former une couche autour de la bactérie.

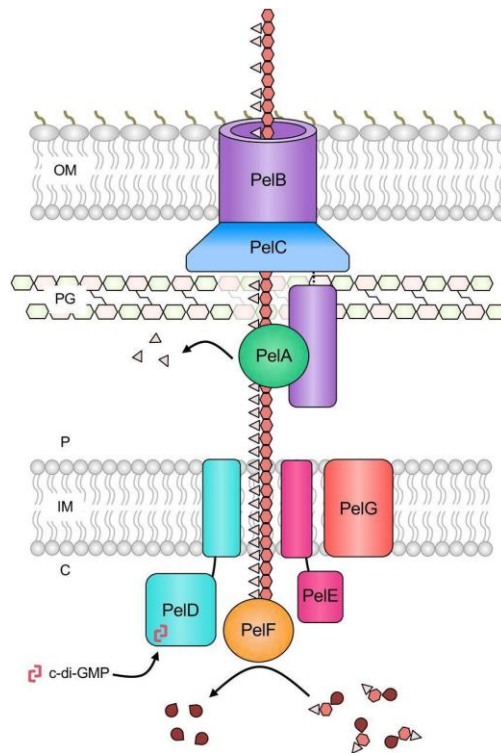


Figure 17 : Modélisation de biosynthèse du Pel

Triangle rose clair = groupes acétyles ; hexagone rouge = unités monosaccharide GalN/GlcN ; larme rouge foncé = UDP ; C = cytoplasme ; IM = membrane interne ; P = espace périplasmique ; PG = peptidoglycane ; OM = membrane externe

I.4.3.3. Psl

L'exopolysaccharide Psl est également un composant clé de la matrice du biofilm jouant de nombreux rôles : il initie la fixation, maintient l'architecture (71) et protège les bactéries dans le biofilm contre les antibiotiques et les cellules phagocytaires. (72) Le Psl est une répétition de pentasaccharide neutre contenant du D-mannose, du D-glucose et du L-rhamnose (Figure 18).

Nous retrouvons 15 gènes codant pour le Psl dont 11 sur l'opéron *psl*/ACDEFGHIJKL nécessaire à sa biosynthèse. Le fonctionnement et la régulation de cet opéron restent pour l'heure peu explorés.

L'expression de *psl* est régulée positivement :

- au niveau transcriptionnel par le facteur sigma RpoS, impliqué dans l'initiation de la transcription des gènes en phases stationnaires.
- par le régulateur LasR qui se fixe en amont du gène *pslA* (73)

Psl fonctionne comme une molécule de signalisation en activant deux diguanylate cyclases, SiaD et SadC, pour favoriser la production de c-di-GMP (3-5 monophosphate de guanosine dimère cyclique) dont le niveau une fois élevé se traduit par un biofilm plus épais et plus robuste. (74)

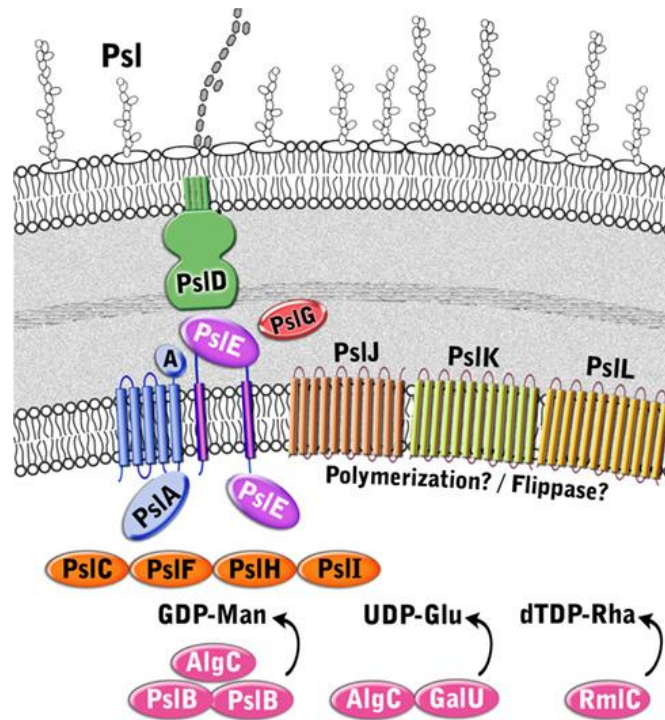


Figure 18 : Formation du Psl de ses précurseurs dans le cytoplasme jusqu'à sa mise en place sur la membrane externe.

PsIB est une enzyme impliquée dans la production de précurseurs de sucre-nucléotidiques de Psl (GDP-mannose).

PsIC, PsIF, PsIH, PsII sont des glycosyltransférases de la famille des CAZy responsables d'incorporation de sous-unités de sucre activées dans la structure de Psl et catalyse le transfert de glycosyle afin de former l'unité répétitive du polysaccharide Psl. (66)

Cinq protéines Psl (Psl A,E,J,K,L) ont des domaines couvrant la membrane interne et constitue le complexe de polymérisation de Psl. PsIA est le site d'assemblage de l'unité répétitive de l'oligosaccharide. PsIE a une fonction de tyrosine kinase et facilite le transport du polymère à travers le périplasme. (66)

PsIG dégrade le Psl dans périplasme (75)

PsID est un transporteur permettant l'externalisation du polymère.

I.4.3.4. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides tensioactifs extracellulaires thermostables, dont le gène *rhlAB* de biosynthèse est régulé par le système de quorum sensing. Ils sont sécrétés à travers le système de sécrétion de type 5.

Leur rôle de détergent biologique permet la solubilisation des phospholipides du surfactant pulmonaire, facilitant ainsi leur clivage par la phospholipase C, et favorisant une infection pulmonaire. De plus, les rhamnolipides perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain, empêchant l'élimination efficace des bactéries. Ils inhibent également la phagocytose et contribuent à l'invasion du tissu pulmonaire. (76)

La production de rhamnolipides dépend largement de l'absorption d'azote chez *P. aeruginosa*, ce qui montre encore le lien important de la virulence avec la privation de nutriment et l'adaptation au stress environnemental. (77) Les rhamnolipides jouent un rôle indispensable dans l'établissement d'un biofilm, en étant impliqué dans différentes étapes du développement du biofilm, de la première interaction à une cellule ou à une surface jusqu'au maintien et à la dispersion de l'architecture du biofilm. (78)

Lors de la phase d'adhérence, les rhamnolipides ont la capacité de modifier l'interaction cellule/surface. Une surproduction de rhamnolipide inhibe le développement de biofilm, notamment lors de carence en fer, par une augmentation de motilité. En revanche une faible concentration de rhamnolipides augmentera l'hydrophobie cellulaire en provoquant la libération de lipopolysaccharide de la surface cellulaire augmentant ainsi l'adhérence cellule/surface et la formation de micro-colonies.

Lors de la phase de prolifération du biofilm en forme de champignon. Les rhamnolipides maintiennent les canaux hydriques ouverts, permettant l'hydratation de toute la structure architecturale du biofilm. (79)

Lors de la phase de dispersion, au stade tardif du développement du biofilm les rhamnolipides induisent la formation de cavité au centre de la structure du biofilm donnant lieu à une dispersion cellulaire (Figure 19). (80)

Il a d'ailleurs été démontré de manière significative ($p=0.001$) que chez des patients intubés, la survenue d'une pneumonie associée à la ventilation était plus fréquente lorsque les patients sont colonisés par des isolats de *P. aeruginosa* produisant des niveaux élevés de rhamnolipides. (81)

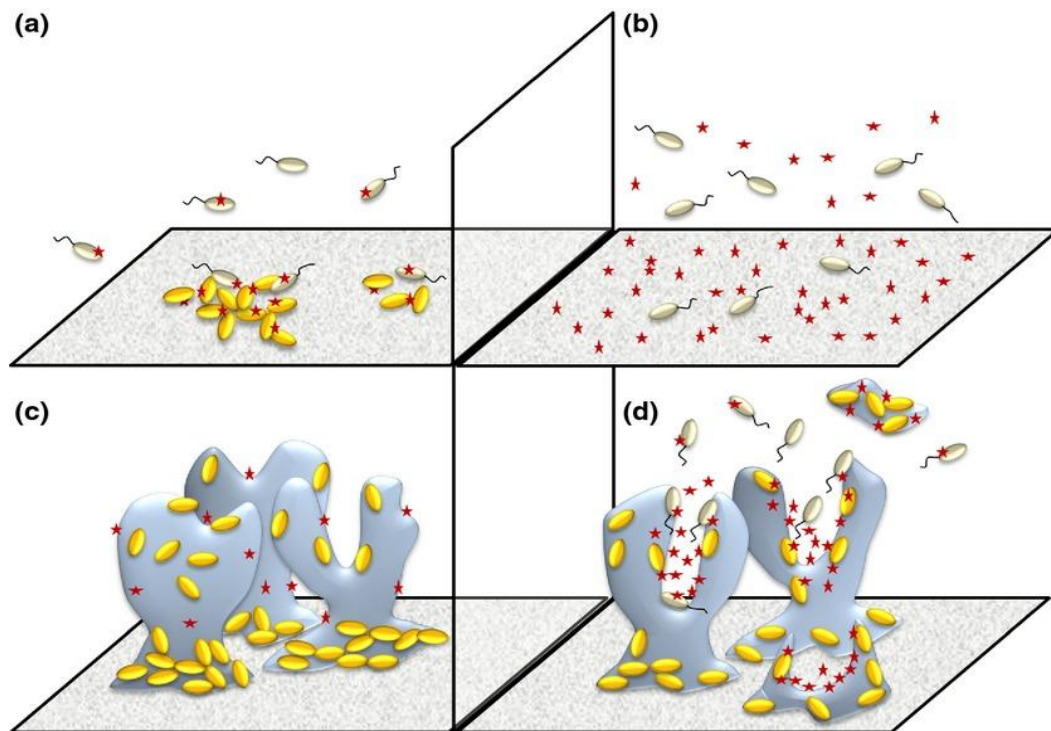


Figure 19 : Représentation de l'implication des rhamnolipides dans les différentes étapes du développement du biofilm ; Les étoiles rouges représentent les rhamnolipides.(80)

(a) Une faible concentration de rhamnolipides augmente l'affinité des cellules pour l'adhésion initiale aux surfaces en augmentant l'hydrophobicité de la surface des cellules ;

(b) La présence de fortes concentrations de rhamnolipides dans le milieu environnant empêche l'attachement des cellules et la formation de microcolonies ;

(c) Au stade de la prolifération, les rhamnolipides sont activement impliqués dans le maintien de l'architecture complexe-différenciée du biofilm ;

(d) Aux stades tardifs du développement du biofilm, les rhamnolipides favorisent la dispersion des cellules mobiles.

1.4.3.5. Rôle des systèmes à deux composants

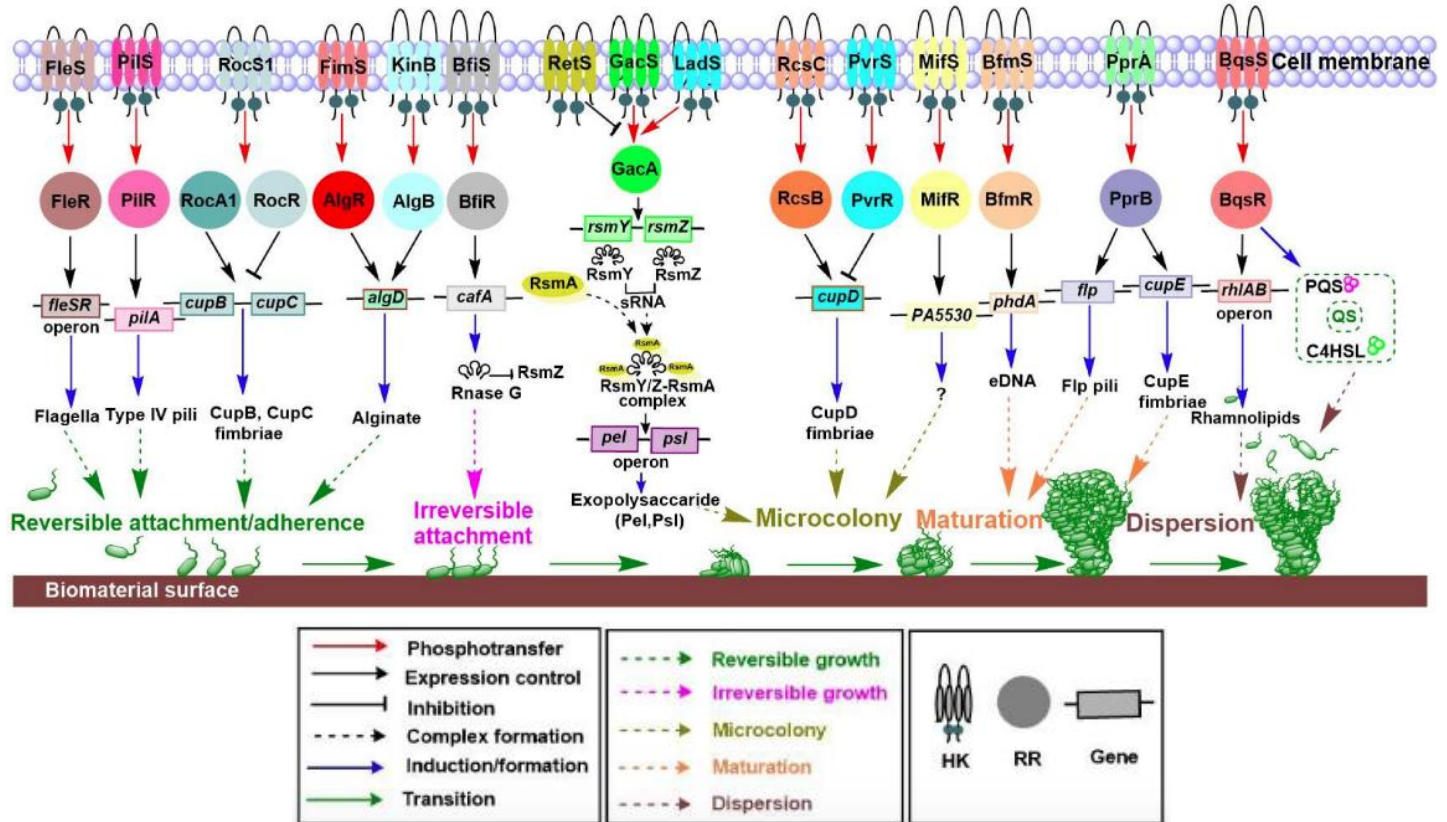


Figure 20 : Divers systèmes à deux composants permettent de réguler la synthèse du biofilm.

Les systèmes à deux composants sont un mécanisme essentiel des bactéries pour s'adapter à l'environnement. On retrouve un senseur appelé protéine histidine kinase ou HK qui s'auto-phosphoryle en réponse à un stimulus, puis transfère son groupement phosphate au deuxième composant le "reponse regulator" (ou RR). Ce dernier se comporte comme un régulateur transcriptionnel permettant une réponse physiologique adaptée. D'après Sultan et al, on les retrouve au niveau de chaque étape de la création du biofilm (Figure 20) (82) :

- l'adhérence : FleSR et PilSR responsables des structures de motilité des flagelles et des pili lors de la fixation initiale. RocS1-A1-R régule la production de la structure des fimbriae CupB et CupC. FimS-AlgR et KinB-AlgB responsable de la biosynthèse de l'alginate aidant à l'adhérence.
- l'attachement irréversible est médié par BfiSR
- la formation de microcolonies : GacS et LadS stimulent GacA pour permettre la production des exopolysaccharides Pel et Psl.
- le regroupement des microcolonies : RcsCB et PvrSR régulent la formation des fimbriae par cupD
- la maturation du biofilm : BfmSR régulant l'eDNA et PprAB régulant pili et fimbriae sont utile dans la maturation des microcolonies
- la dispersion du biofilm est en partie due aux rhamnolipides dont la production est régulé par BqsSR

I.4.4. Facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte

I.4.4.1. Les quorum sensing indépendants

I.4.4.1.1. Les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion (SST) de l'espèce *P. aeruginosa* permettent un transport de protéines du cytoplasme bactérien au milieu extracellulaire voir directement dans une autre cellule pour les SST de type 3 et 6. Ces systèmes jouent un rôle important dans de nombreux processus comme la virulence, l'adaptation à l'environnement. Cinq systèmes de sécrétions existent chez *P. aeruginosa* (Figure 21) (83) :

- SST1 permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la lipase LipA
- SST2 transporte les lectines LecA et LecB, l'exotoxine A et différentes lipases/phospholipases
- SST3 permet l'injection d'exotoxines directement dans le cytoplasme de la cellule cible
- SST5 est subdivisé en 3 catégories les SST5a (autotransporteurs classiques), les SST5b (« Two Partner Secretion ») et les SST5c (autotransporteurs trimériques). Ce système permet la sécrétion de l'estérase EstA, de la protéase LepA, de l'adhésine et d'une ou plusieurs CupB5 dans le milieu extracellulaire.
- SST6 : sécrète 3 toxines dont Tse2 dans le cytoplasme de la cellule cible conduisant à la dégradation du peptidoglycane et mettant en quiescence la cellule. *P. aeruginosa* est également capable de synthétiser des anti-toxines à Tse2 pour se protéger de ce système

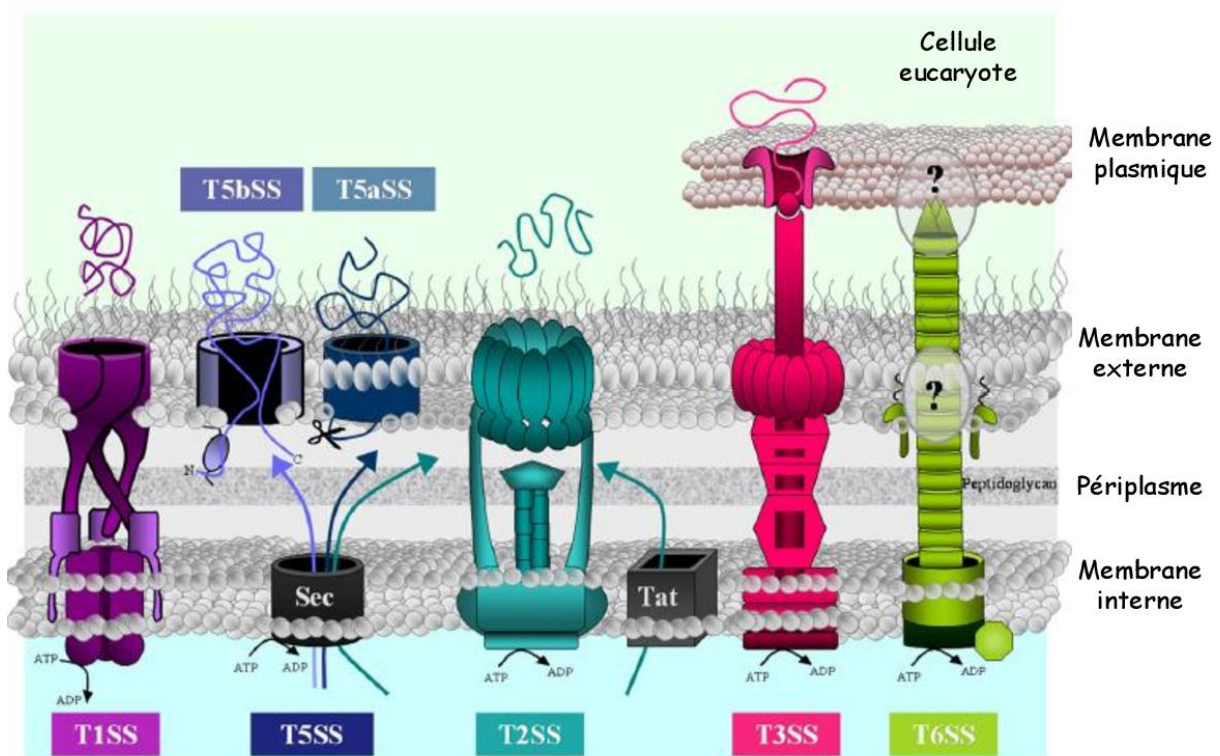


Figure 21 : Les systèmes de sécrétion du *P. aeruginosa* (83)

I.4.4.1.2. Le système de sécrétion de type III (T3SS) et ses toxines

Le SST3 est composé d'une vingtaine de protéines qui s'assemblent pour former une imitation de seringue pouvant traverser les deux membranes bactériennes et la membrane de la cellule cible. Il est codé par 36 gènes différents retrouvés sur 5 opérons associés à au moins six autres gènes codant pour des protéines effectrices et leurs chaperons.

Le SST3 est reconnu comme l'outil principal permettant au *P. aeruginosa* d'injecter les toxines dans la cellule cible en traversant les membranes grâce à un semblant d'aiguille, lui donnant ainsi un rôle de facteur de virulence majeur. Les principales toxines injectées sont les exotoxines U, S, Y et T synthétisés de manière variable en fonction des différentes souches. Ainsi pratiquement toutes les souches de *P. aeruginosa* possèdent les gènes codant pour le SST3 mais la plupart de ces souches n'abritent pas l'ensemble complet des gènes codant pour toutes les exotoxines. Dans les infections aiguës, il a été retrouvé des isolats possédant le gène *exoS* dans 58 à 78% des cas, le gène *exoU* dans 28 à 48%, le gène *exoY* dans 89% et le gène *exoT* dans 92 à 100%. (84)

ExoS et **ExoT** ont une similarité en acides aminés proche de 76%. Ce sont des toxines bifonctionnelles avec une activité de protéine activatrice de GTPase et une activité d'adénosine diphosphate-ribosyl-transférase, provoquant une mort cellulaire par apoptose et une perturbation du cytosquelette d'actine diminuant l'internalisation de *P. aeruginosa* par certains types de cellules.

ExoU est, quant-à-elle, une puissante phospholipase provoquant une lyse rapide (en 1 à 2 heures) et robuste des cellules hôtes. Ainsi une destruction dirigée par l'ExoU sur les cellules phagocytaires et les cellules de la barrière épithéliale favorise la persistance et la dissémination bactériennes.

Enfin, **ExoY** est une adénylate cyclase, qui une fois injectée dans la cellule provoque une élévation de la concentration intracellulaire en AMPc, donnant lieu à une perturbation du cytosquelette d'actine, à l'inhibition de l'absorption bactérienne et à une augmentation de la perméabilité endothéliale.

Plusieurs effets physiopathologiques de ces toxines ont été mis en évidence (Figure 22). Néanmoins, parmi ces quatre toxines, ExoU est la seule ayant un réel impact clinique au cours des pneumonies à *P. aeruginosa* avec un facteur de gravité important de par son pouvoir inflammatoire recrutant un nombre important de neutrophiles et de macrophages dans les poumons causant des dommages collatéraux aux tissus de l'hôte. (84)

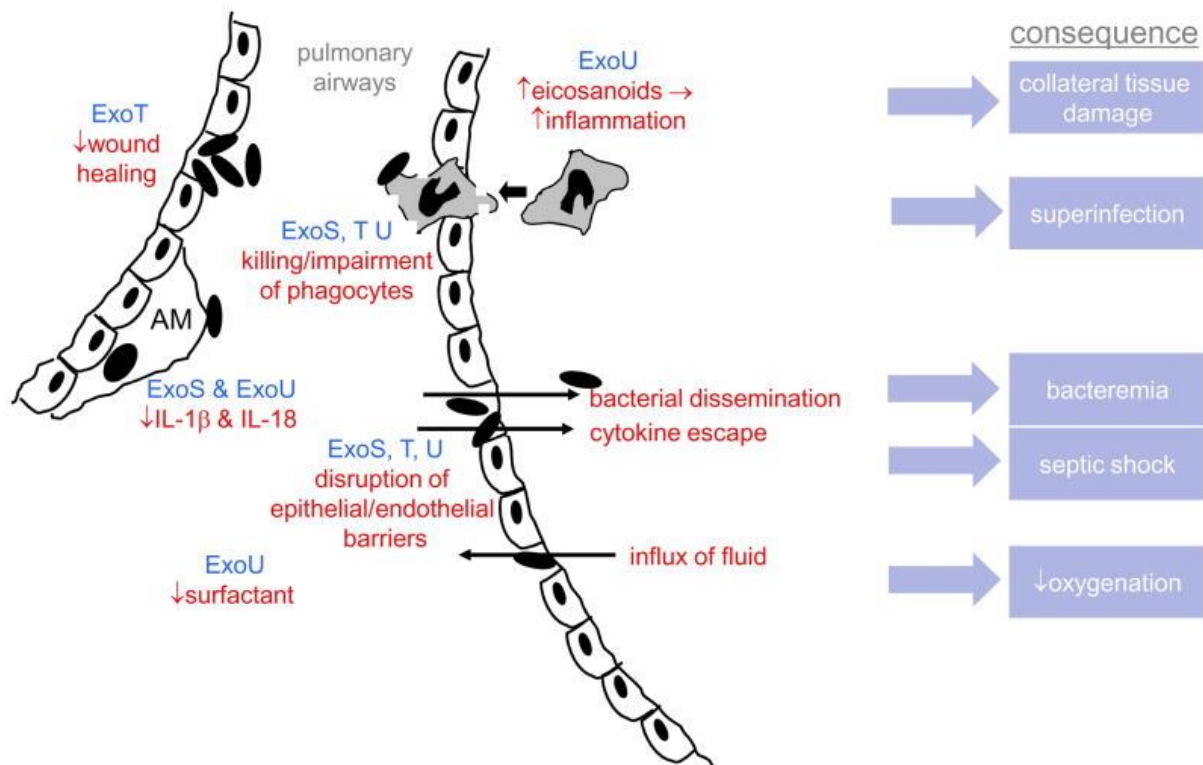


Figure 22 : Rôle des protéines effectrices de type III dans la pathogenèse de la pneumonie aiguë ; MA = macrophage alvéolaire (84)

Au début de l'infection, *P. aeruginosa* exploite les brèches dans la muqueuse épithéliale, facilité par l'inhibition de la cicatrisation par ExoT. Puis, une atténuation de la réponse immunitaire par ExoU et ExoS, bloque la production d'IL-1 β et d'IL-18 des macrophages alvéolaires. Lorsque le développement ultérieur d'une réponse inflammatoire se produit, il est excessivement amplifié par la libération d'eicosanoïdes induite par ExoU. Cependant les phagocytes recrutés voient leur fonctionnalité inhibée par ExoS, ExoT et ExoU et sont donc incapables d'éradiquer *P. aeruginosa* ; la rareté de phagocytes fonctionnels qui en résulte rend les poumons sujets à la surinfection par d'autres bactéries.

ExoS, ExoT et ExoU perturbent également les barrières épithéliales/endothéliales, permettant aux bactéries et aux cytokines pro-inflammatoires de s'échapper dans la circulation sanguine, favorisant une bactériémie ou un choc septique. Ces mêmes brèches permettent au fluide riche en protéines de s'écouler dans les espaces aériens du poumon, ce qui, associé à la diminution du surfactant pulmonaire induite par ExoU, entraîne une diminution de la compliance pulmonaire et de l'oxygénation.

La présence de SST3 n'est pas obligatoire pour infecter un patient mais son expression augmente la morbidité et la mortalité liées à la maladie, notamment chez les patients sous ventilation assistée. (85,86)

I.4.4.2. Les quorum sensing dépendants

Le quorum sensing est un système de communication de cellule à cellule utilisé par les bactéries grâce à la diffusion de peptides permettant une coordination afin de s'adapter à l'environnement. Cette communication est dépendante de la densité bactérienne et joue un

rôle important dans la régulation des gènes des facteurs de virulences et la formation du biofilm. Ainsi les bactéries sécrètent de faibles signaux chimiques, qui deviennent suffisamment importants pour induire l'expression transcriptionnelle de divers gènes cibles, lorsque la densité bactérienne est importante (87). Des recherches récentes ont également montrées que le quorum sensing était capable de répondre à des signaux de biostress externes. Ainsi les bactéries agissent comme une communauté pour effectuer ces différentes tâches de survie et de virulence, ce qui serait impossible pour des bactéries individualisées.

Les deux principaux systèmes de quorum sensing retrouvés chez l'espèce *P. aeruginosa* sont les systèmes Rhl et Las composés pour chacun d'une protéine régulatrice et d'une enzyme auto-inductrice : RhlR/RhlI et LasR/LasI. Ils permettent la régulation d'environ 10% du transcriptome(88). L'enzyme joue un rôle dans la synthèse des molécules signal appelées N-acyl-homosérine lactone (AHL), qui une fois en quantité suffisante vont se fixer sur la protéine régulatrice. Ce complexe permettra l'induction ou la répression des gènes cibles spécifiques et l'induction du gène "I" codant pour l'enzyme productrice d'AHL, d'où le terme d'enzyme auto-inductrice (Figure 23).

Il existe également deux autres systèmes de quorum sensing : *pqs* qui utilise des molécules signal de la famille des 2-alkyl-4(1-H)-quinolone (AHQ) et *iqs* activé lors d'une déplétion en phosphate dépendant de la molécule signal IQS dont le récepteur est encore inconnu, et dont la synthèse est contrôlé par la voie de synthèse de la pyochéline. Un cinquième système appartenant au quorum sensing de *P. aeruginosa* vient d'être découvert tout récemment : le système *ods* (oxylipins-dependent QS system), utilisant les oxylipines comme molécule auto-inductrice. (89)

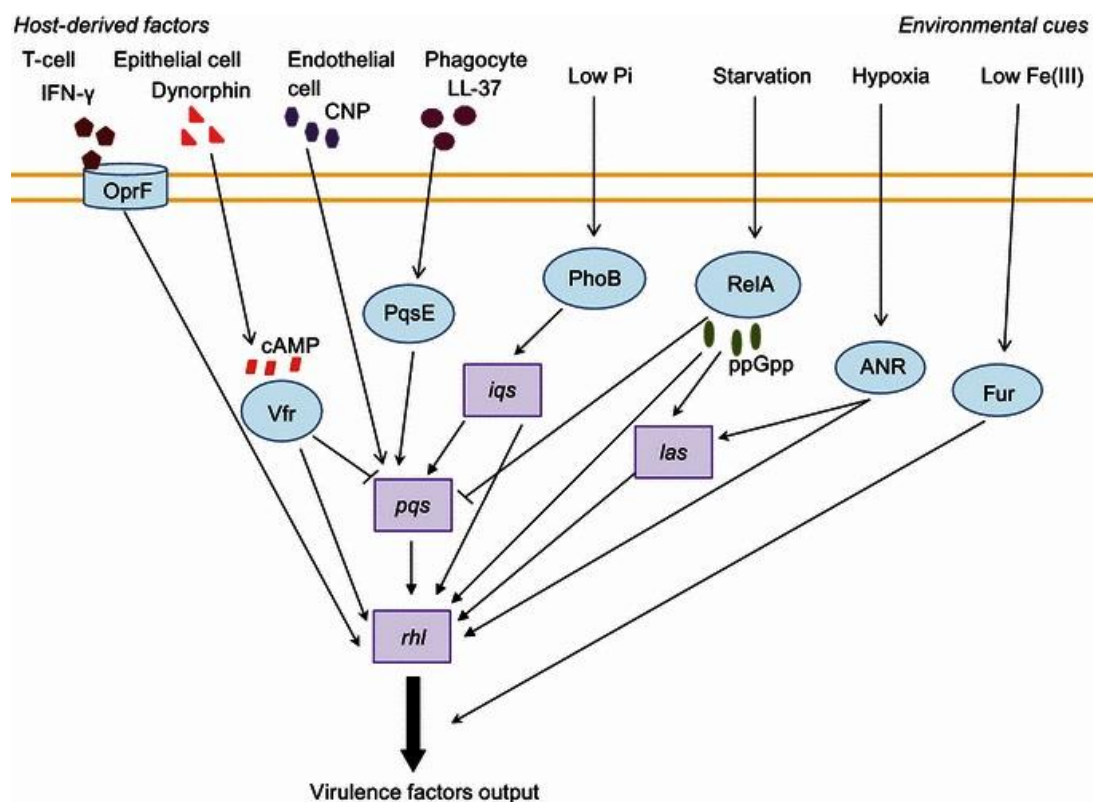


Figure 23 : Schématisation hiérarchique de signalisation du quorum sensing en fonction des conditions environnementales et des facteurs de l'hôte (87)

La figure 23 récapitule les différentes voies d'activation du quorum-sensing. Ces voies sont d'importance dans la virulence, la survie et le développement du biofilm des bactéries. Lors d'une infection systémique à *P. aeruginosa*, l'une des voies principales de régulation du quorum sensing est l'activation des lymphocytes T. Ces derniers une fois activés synthétisent l'interféron- γ qui se fixe sur OprF (pore membranaire) et un signal intracellulaire est transmis pour réguler de manière positive le système rhl. La protéine OprF est importante pour la virulence de *P. aeruginosa*. L'absence de cette protéine est à l'origine d'une atteinte de l'adhésion de la bactérie aux cellules eucaryotes, de la sécrétion des exotoxines du système de sécrétion de toxines, de la production de la pyocyanine, de l'élastase, de la lectine PA-1L et de la production de l'exotoxine A. (90)

I.4.4.2.1. Exotoxine A

L'exotoxine A appartient à la famille des toxines et reste à ce jour le facteur de virulence le plus toxique de *P. aeruginosa*. Cette toxine, codée par le gène *exoA* également appelé *toxA* présent dans la majorité des isolats, est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme de pro-toxine inactive de 71kDa via le système de sécrétion de type II. (83) Elle est composée de deux domaines :

- le domaine A possédant l'activité mono-ADP-ribosyltransférase inhibant le facteur d'élongation 2 (EF-2) et donc l'arrêt de la synthèse protéique entraînant la mort de la cellule par nécrose

- le domaine B qui permet la liaison aux récepteurs CD91 (appelés LRP : low density lipoprotein receptor-related protein) à la surface de la cellule cible

Après internalisation, l'exotoxine A va atteindre le réticulum endoplasmique par deux voies différentes selon liaison ou non à des microdomaines membranaires spécialisés résistants aux détergents et riche en cholestérol (DRM) (Figure 24) :

- la voie dépendante du lipide : l'exotoxine A se fixe à la surface de la cellule au récepteur CD91 (le récepteur alpha2-macroglobuline/LRP1) puis s'associe aux DRM pour être internalisé par la cavéoline, le complexe est transporté vers des endosomes précoces de manière dépendante de Rab5 (Ras related protein), où l'exotoxine subira un clivage par une protéase, la furine, pour obtenir un fragment de 37 kDa ayant une activité ADP-ribosyltransférase qui atteindra le trans-Golgi par une voie indépendante de la GTPase Rab9, puis sera transporté jusqu'au réticulum endoplasmique par le système Rab6. (91,92)
- la voie KDEL : l'exotoxine A se fixe à la surface de la cellule via le récepteur protéique CD91, puis est internalisée par la voie clathrine-dépendante jusqu'aux endosomes précoces. L'exotoxine subit ensuite une étape de clivage par la furine, donnant naissance à un fragment de 37 kDa possédant une séquence KDEL C-terminal. Une fois le fragment dans les endosomes tardifs, celui-ci atteint le trans golgi par une voie dépendante de GTPase Rab9 qui une fois fixé à la protéine KDEL pourra être transporté de manière rétrograde de l'appareil de Golgi au réticulum endoplasmique. (93,94)

D'un point de vue physiopathologique, l'exotoxine A inhibe la libération de certaines cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF-alpha, l'IL-10, l'IL-6 ou encore l'IL-8, provoquant l'affaiblissement de la réponse immunitaire de l'hôte et l'aggravation de l'infection. Il existe donc un double rôle de l'exotoxine A avec des dommages tissulaires par nécrose cellulaire et une activité immunosuppressive.

La régulation de l'exotoxine est très complexe, plusieurs équipes de recherche ont établi un lien entre l'expression de l'exotoxine A et le métabolisme du fer. La production de l'exotoxine A dépend de la quantité du fer dans le milieu. Dans un milieu pauvre en fer il a été retrouvé une importante synthèse de pyoverdine qui régule à la hausse la synthèse d'exotoxine A et de la protéase PrpL. (95,96)

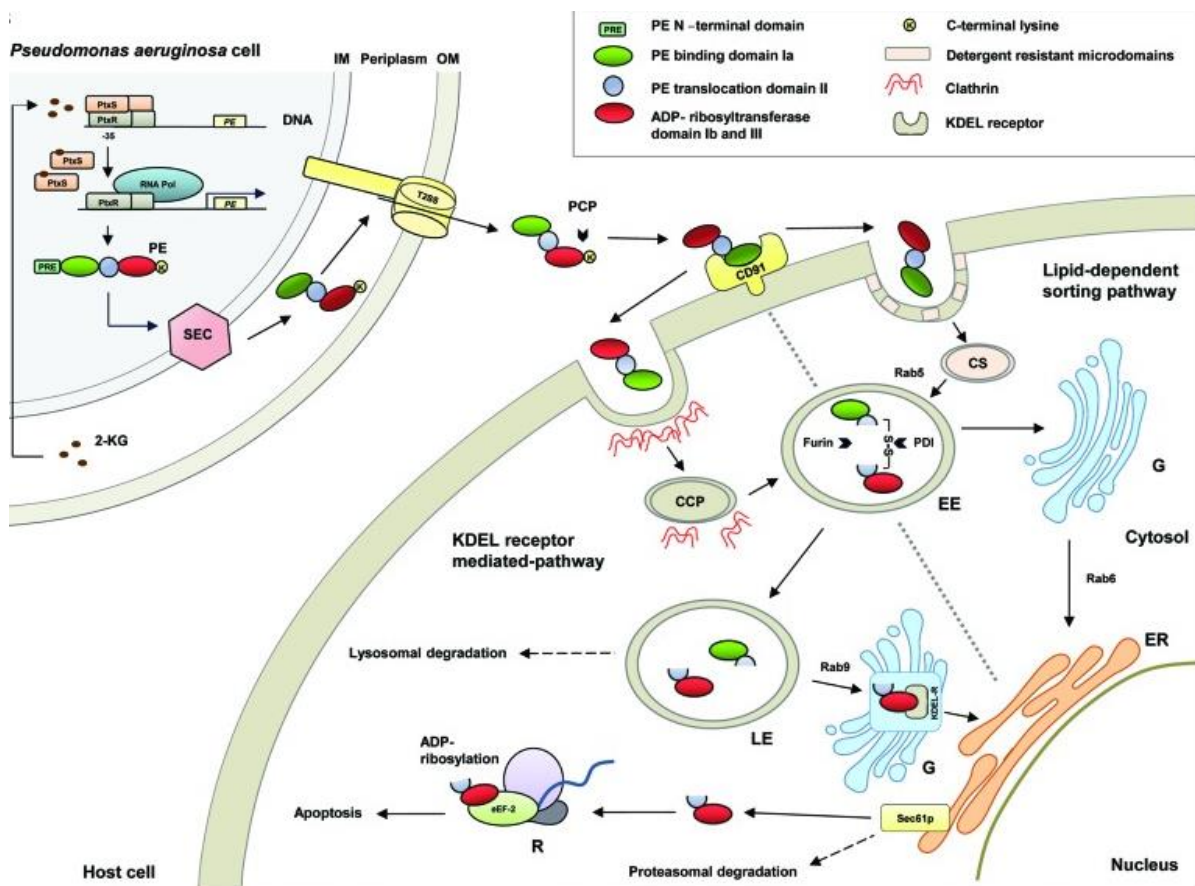


Figure 24 : Représentation schématique des domaines structurels et fonctionnels de l'exotoxine A de *Pseudomonas* (PE). (92)

2-KG = 2-cétogluconate ; CCP = fosse revêtue de clathrine ; CS = cavéosome ; EE = endosome précoce ; eEF-2 = facteur d'élongation eucaryote-2 ; ER = réticulum endoplasmique ; G = appareil de Golgi ; KDEL-R = récepteur KDEL ; PCP = carboxypeptidases plasmatiques ; PDI = protéine disulfure isomérase ; PtxR et PtxS = régulateurs de transcription ; R = ribosome ; ARN Pol = ARN polymérase ; T2SS, système de sécrétion de type II

I.4.4.2.2. Les lectines solubles

La reconnaissance et l'adhésion aux cellules hôtes par les oligosaccharides de surface est une étape clé dans la colonisation de l'hôte par *P. aeruginosa*. En plus des adhésines et des pili, *P. aeruginosa* produit des lectines solubles, LecA et LecB, sous la régulation du système de quorum sensing et du facteur sigma alternatif RpoS. Ces lectines agissent comme des facteurs de virulence grâce à leur capacité de liaison aux glucides.

LecA (ou PA-IL) a une spécificité de fixation sur le D-galactose avec une forte affinité pour les glycanes terminaux présentant un résidu alpha-galactose. Elle a un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales respiratoires en diminuant leur croissance, et induit un défaut de perméabilité de l'épithélium intestinal entraînant une absorption accrue de l'exotoxine A. (97)

LecB (ou PA-III) a une forte affinité pour le L-fucose. Elle est impliquée dans la biogenèse des pili, l'activité protéolytique de la protéase IV et dans la formation du biofilm au vu de sa présence dans la membrane externe des bactéries. (98)

LecA et LecB sont impliqués dans les lésions de la barrière capillaire alvéolaire. De plus, on observe une augmentation de la perméabilité et de la translocation sanguine, due à une capacité accrue de traverser la barrière endothéliale et d'adhérer aux cellules endothéliales de par la présence de structure glycanique à leur surface (Figure 25). (97)

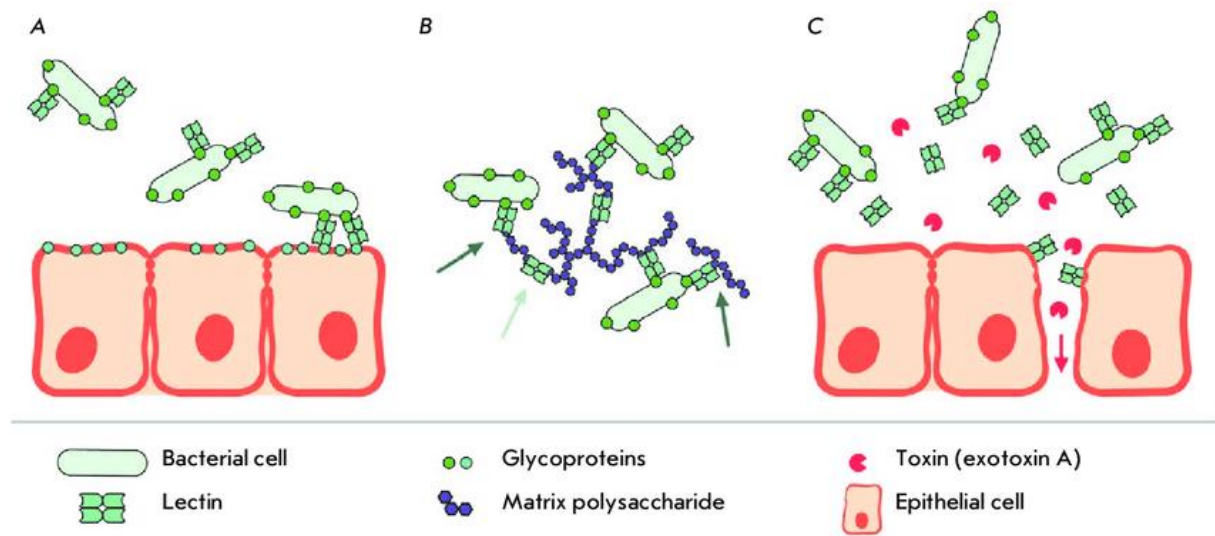


Figure 25 : Fonctions d'action des lectines de *P. aeruginosa* (99)

A : Adhésion aux cellules épithéliales hôtes : les lectines ont la capacité de réduire de manière significative la fréquence des battements ciliaires.

B : Attachement des cellules bactériennes aux polysaccharides de la matrice du biofilm et réticulation de ces polysaccharides : les lectines peuvent faciliter la liaison des polysaccharides de la matrice extracellulaire du biofilm aux cellules bactériennes et contribuer à la formation de biofilms plus denses et plus résistants aux impacts physiques. Il est intéressant de noter que le polysaccharide extracellulaire Psl qui est absolument nécessaire à

la formation des biofilms de *P. aeruginosa* contient du mannose et, selon certaines sources, du galactose, qui sont des ligands des lectines LecB et LecA, respectivement.

C : Perturbation de la barrière épithéliale et augmentation de la perméabilité aux autres facteurs de virulence comme l'exotoxine A.

I.4.4.2.3. Elastase

L'activité élastase du *P. aeruginosa* est dirigée par deux enzymes protéolytiques sécrétées par le système de sécrétion de type II (T2SS) : LasA et LasB, dont la synthèse est régulée par les systèmes de transcription de quorum sensing, *las* et *rhl*.

LasA ou staphylosine est une protéase à sérine agissant en synergie avec la pseudolysine pour dégrader l'élastine. Au vu de sa faible activité élastolytique, la LasA permet une facilitation de clivage pour LasB. LasA a la capacité de lyser le *Staphylococcus aureus* en clivant les liaisons pentapeptidiques de sa paroi bactérienne et relarguant ainsi tout son contenu intra-cellulaire (toxines, Fe²⁺, éléments nutritifs ...) pouvant majorer l'inflammation tissulaire et surtout permettre l'expansion bactérienne du *P.aeruginosa*.(100)

LasB ou pseudolysine est une protéase neutre de type métallo-protéase ayant pour cofacteur Zn²⁺/Ca²⁺. Il s'agit de la protéase la plus abondante du sécrétome notamment lors de la phase aiguë de l'infection. Sa capacité à dégrader un nombre important de composants de la matrice extracellulaire (élastine, lamine, fibronectine) provoque des lésions tissulaires et des hémorragies favorisant la propagation de l'infection par dissémination bactérienne (Figure 25). (101) LasB a également une action lors d'infections chroniques avec la capacité d'inhiber la réponse immunitaire en inactivant des composants du système du complément (C1, C3 ...), en dégradant les défenses immunitaires de type interleukines (IL-6) ou en diminuant la capacité des macrophages alvéolaires à éliminer les bactéries lors de surinfections de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou de mucoviscidose.(102) De plus, des travaux ont montré la capacité de LasB à réduire l'activité et l'expression du CFTR, provoquant une incapacité d'éradiquer une bactérie inhalée. (103) Enfin, LasB a un effet délétère majeur sur l'intégrité épithéliale avec une importante altération de la matrice extracellulaire des épithéliums cutanés, respiratoires et cornéens par dégradation des protéines de collagène de type I et de type IV. Il a été montré que cette dernière a une grande importance dans les infections oculaires. (103)

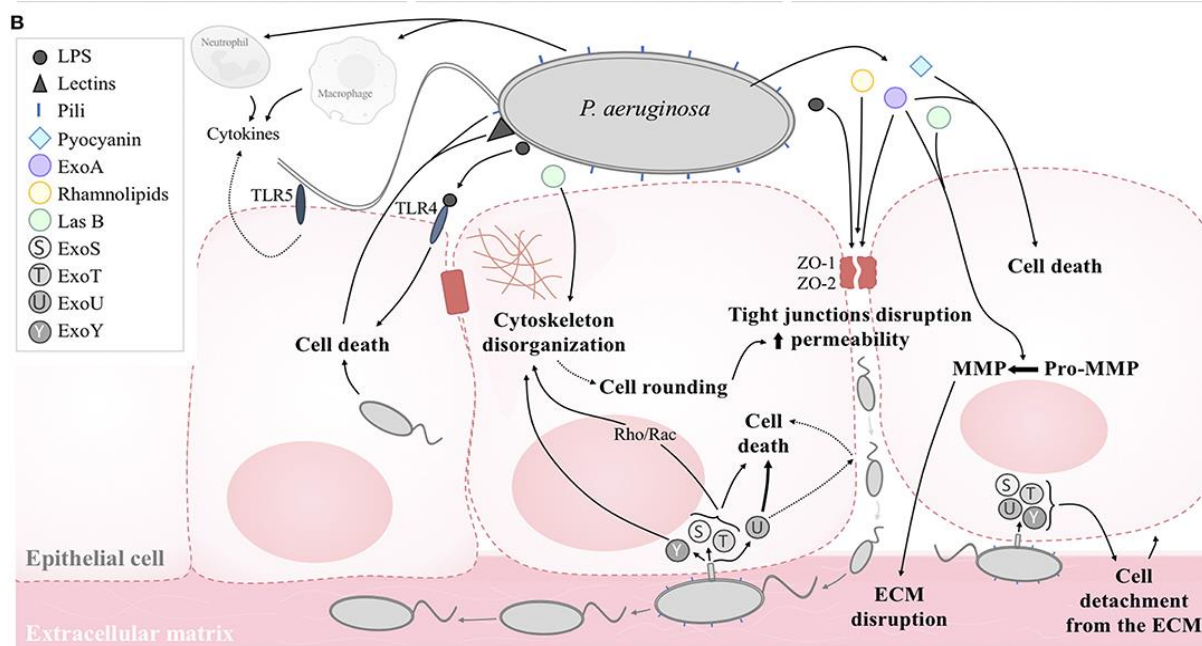


Figure 26 : Modèle schématique des effets de *P. aeruginosa* sur l'intégrité épithéliale.(53)

ECM = matrice extracellulaire ; MMP = métalloprotéase matricielle

Les constituants structurels (pili, LPS, lectines) et les facteurs sécrétés (pyocyanine, ExoA, LasB, rhamnolipides) contribuent à la mort cellulaire, à la désorganisation du cytosquelette ainsi qu'à la perturbation des jonctions serrées.

La perméabilité intercellulaire favorise alors la transmigration et l'infiltration des bactéries vers le compartiment basolatéral. La perturbation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases et le détachement des cellules de la matrice extracellulaire favorisent ensuite la propagation des bactéries. Les toxines T3SS injectées à travers la membrane basolatérale contribuent à la mort cellulaire et à l'altération de l'intégrité épithéliale. Les pili et le flagelle sont également impliqués dans l'adhésion des bactéries à la cellule hôte. Les cytokines, libérées par les cellules épithéliales, les macrophages et les neutrophiles infiltrés, contribuent également aux dommages épithéliaux (Figure 26).

I.4.4.2.4. Phospholipases C

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles d'environ 80kDa contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique. Elles sont particulièrement synthétisées lors d'une carence en phosphate. La phospholipase C est à l'origine de dommages tissulaires pulmonaires liés à la dégradation du surfactant pulmonaire composé majoritairement de phospholipides.

Trois phospholipases C de spécificité de substrat différents ont été identifiés :

- la phospholipase hémolytique, PlcH
- la phospholipase non hémolytique, PlcN
- la phospholipase PlcB

PlcH est un facteur de virulence important provoquant une perméabilité vasculaire et la nécrose cellulaire. De plus, PlcH a une action favorisant l'infection chronique en inhibant la réponse de poussée respiratoire des neutrophiles. (104) Ces substrats préférentiels sont la phosphatidylcholine et la sphingomyéline - des lipides constituant l'ensemble des membranes cellulaires et du surfactant pulmonaire. (105) Cette modification du surfactant a un effet délétère sur la fonction pulmonaire caractérisée par des diminutions significatives de la capacité pulmonaire totale, de la compliance statique, de la capacité de diffusion et de la PO₂ artérielle ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne. Des modifications anatomiques peuvent être également observées lors de pneumonie à *P. aeruginosa* sécrèteur de PlcH avec un œdème pulmonaire, une hémorragie ou une atélectasie. (106)

PlcN bien qu'ayant une similitude d'environ 40 % avec PlcH, possède une spécificité de substrat différente, en hydrolysant principalement la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine. Contrairement à PlcH, PlcN n'a pas d'activité pathogène démontrée. (107)

PlcB est la seule phospholipase active sur la phosphatidyléthanolamine, en plus d'être active sur la phosphatidylcholine. Elle est essentielle pour la motilité de contraction de type "twitching" dirigé vers le haut par un gradient de phospholipides. (108)

I.4.4.2.5. Les chromophores : la pyocyanine et les sidérophores (pyoverdine et pyocheline)

Les chromophores, responsable de la couleur caractéristique de chaque souche de *P. aeruginosa*, sont la pyocyanine de couleur bleu et les sidérophores qui permettent la chélation et le transport du fer : la pyoverdine (pigment vert) et la pyocheline.

I.4.4.2.5.1. La pyocyanine

La pyocyanine est un métabolite redox actif qui, en présence d'oxygène, induit la formation de molécule superoxyde. La pyocyanine est un pigment synthétisé par le *P. aeruginosa* responsable de la couleur bleu-vert qui lui vaut le nom de bacille pyocyanique. Elle devient incolore lorsqu'elle subit une réduction à deux électrons. Elle est impliquée dans de multiples mécanismes pathogènes parmi lesquels : (109–112)

- l'inhibition de la respiration cellulaire, de la fonction ciliaire, de la croissance des cellules épidermiques, et de la libération de prostacycline
- l'oxydation du glutathion dans les cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires inhibant la croissance microbienne et inhibant la catalase participant ainsi au stress oxydatif et entraînant une nécrose du tissu respiratoire
- le contrôle de la réponse immune : inhibe la libération d'interleukine 2 en limitant la croissance des lymphocytes T et inhibe la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B
- l'inactivation de l'ATPase vacuolaires des cellules épithéliales pulmonaires provoquant une détérioration des canaux chlorure au cours de la mucoviscidose
- elle ne chélate pas le fer contrairement aux sidérophores, mais elle réduit le fer ferrique en fer ferreux le rendant plus disponible
- elle contribue à perturber l'homéostasie du calcium et à favoriser le développement de la pneumonie en attirant puis créant l'apoptose des neutrophiles

I.4.4.2.5.2. Les sidérophores

a. Importance du fer chez *P. aeruginosa*

Le fer détient une place importante dans les infections. En effet, chez l'hôte, il est utile au bon fonctionnement immunitaire de l'organisme avec, par exemple, une modulation des lymphocytes T CD4+ Th1/Th2 pour l'immunité cellulaire et de la réponse humorale à travers les interleukines 2 et 6. Il a un rôle de nutriment indispensable au *P. aeruginosa* pour sa survie, sa multiplication et l'expression de ses facteurs de virulence. La bactérie peut satisfaire ce besoin soit par contact direct avec le fer soit par la synthèse de séquestreurs de fer c'est-à-dire les sidérophores exogènes ou propres au *P. aeruginosa* (pyoverdine et pyocheline) et les hémophores. Ce dernier mécanisme est résumé dans la Figure 27.

P. aeruginosa possède au sein de son génome un très grand nombre de gènes codant la voie d'acquisition du fer, notamment 35 transporteurs TonB-dépendant (TTBD) qui en plus d'être impliqué dans le transfert de fer sont aussi utilisés pour le cobalt et le zinc. Cela démontre bien l'importance du métabolisme du fer pour la bactérie.

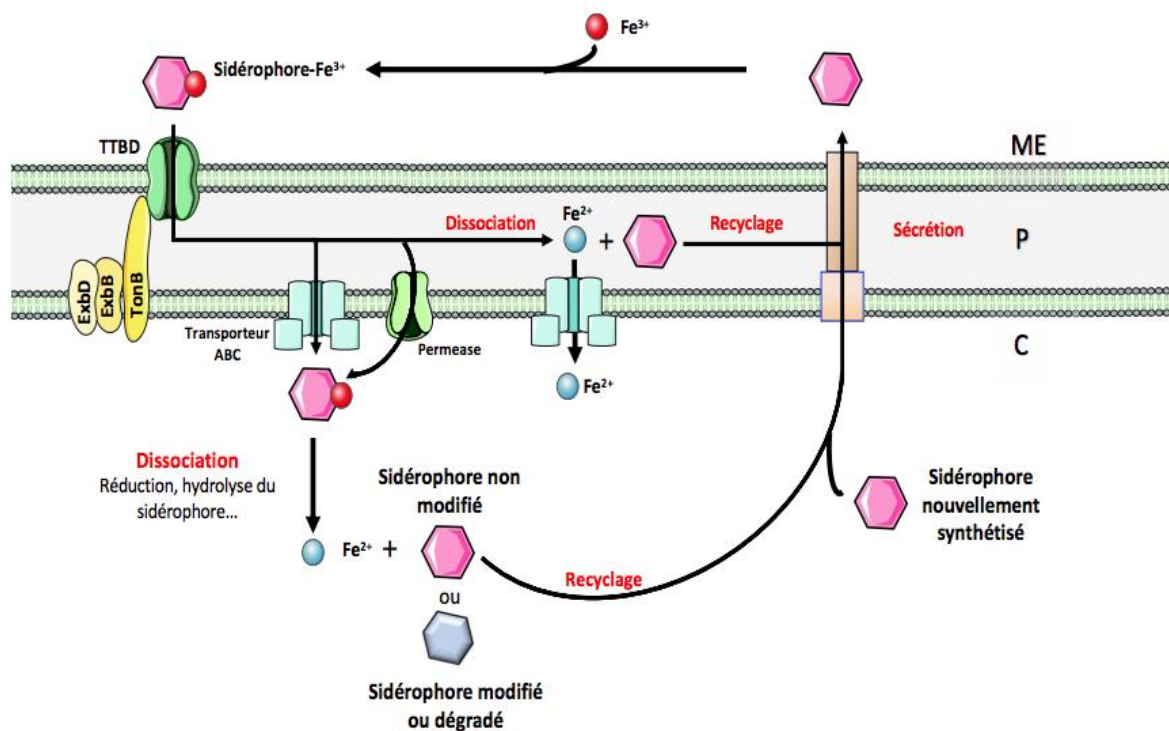


Figure 27 : Acquisition du fer chez *P. aeruginosa* par les sidérophores. ME : milieu extracellulaire ; P : périplasme ; C : cytoplasme. (113)

Le complexe sidérophore-fer traverse la membrane externe de la bactérie grâce au transporteur TonB-dépendant (TTBD) régulé par une protéine de la membrane interne TonB. Ce transport du complexe sidérophore-fer dans le périplasme est un transport actif qui requiert une force proton-motrice fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. (114) Une fois dans le périplasme ce complexe peut être dissocié ou être transféré jusqu'au cytoplasme par des transporteurs de membrane interne de type ABC (ATP Binding Cassette) par l'intermédiaire d'une protéine périplasmique PBP qui fixe le complexe fer-sidérophore au niveau du

périplasme (115) ou à travers une perméase qui ne nécessite pas de PBP. Le sidérophore va être recyclé et le fer sera utilisé ou stocké en fonction des besoins de la bactérie.

Les protéines TonB sont codées par trois gènes : *tonB1*, *tonB2* et *tonB3* (116). La mutation du gène *tonB1* empêche la captation du fer via les sidérophores. Le gène *tonB2* n'a pas de rôle majeur. *tonB3* est impliqué dans la motilité de type twitching.

b. La pyoverdine

Seuls les *Pseudomonas* fluorescents synthétisent le sidérophore pyoverdine (PVD), peptide de 11 acides aminés donnant lieu à une couleur jaune/vert des souches lors de la culture. Les PVD ont une structure commune composée :

- d'un chromophore de type 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline
- d'une chaîne latérale en C3 : composée soit d'un acide dicarboxylique soit de son amide correspondant
- d'une chaîne peptidique : de taille et de séquence variable spécifique de chaque souche, permettant la reconnaissance par le TBTD (117)

Le locus PVD regroupe les différents gènes codant les protéines nécessaires à la biosynthèse, au transfert et à la régulation de la PVD (Figure 28). La synthèse de la PVD commence au niveau du cytoplasme et requiert sept enzymes dont quatre NRPSs (Non Ribosomal Peptide Synthetase) : PvdL, PvdI, PvdD et PvdJ (118) puis se termine dans le périplasme grâce au transporteur de membrane interne PvdE où le sidérophore subira des étapes de maturation grâce à cinq enzymes : PvdM, PvdN, PvdO, PvdP, et PvdQ.

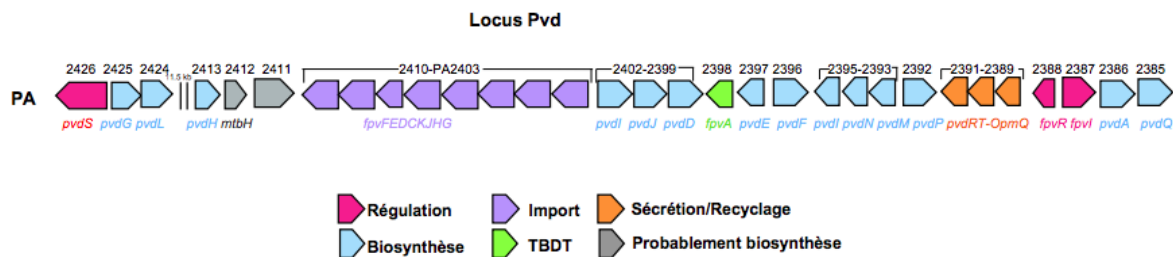


Figure 28 : Organisation génomique du locus PVD chez *P. aeruginosa* PAO1

Trois gènes *pvdRT-opmQ* codent une pompe à efflux excréant la PVD néosynthétisée dans le milieu extracellulaire. (119) Une fois cela réalisé, elle chélate le fer, formant ainsi un complexe ferri-pyoverdine reconnu par un des deux transporteurs TonB dépendant FpvA ou FpvB (Figure 29). Cette liaison induit un changement de conformation du domaine de signalisation du transporteur activant le régulateur sigma FpvR ancré dans la membrane interne. (120) FpvR libère ainsi deux facteurs sigma PvdS et Fpvl, qui se lie à l'ARN polymérase et induisent l'expression des gènes de l'opéron PVD, de la protéase IV et de l'exotoxine A. (121)

La PVD a un rôle important dans les infections aiguës mais son rôle décroît dans les infections chroniques. En effet, un tiers des souches présentes dans les mucoviscidoses perdent la capacité de synthétiser la pyoverdine et récupèrent le fer à travers l'hème oxygénase HemO. (122)

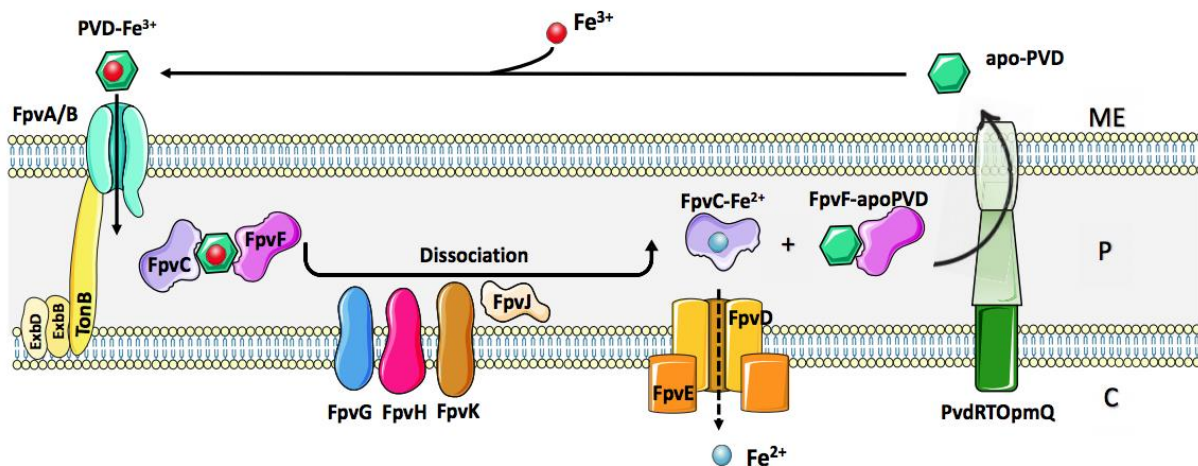


Figure 29 : Voie d'import du fer par la pyoverdine (113)

c. La pyocheline

La pyocheline (PCH) correspond au deuxième sidérophore synthétisé par *P. aeruginosa*. Il est également synthétisé par la bactérie *Burkholderia cepacia*. Quatre stéréoisomères de PCH sont répertoriés mais seul PCH1 est reconnu par le TBTD. (123) Il faut 2 PCH pour chélater un atome de fer. (124) Sa biosynthèse nécessite sept enzymes organisées en deux opérons distincts : *pchDCBA* et *pchEFGHI*, et à la différence de la pyoverdine sa synthèse se passe en intégralité dans le cytoplasme.

Une fois dans le cytoplasme, le complexe fer-pyocheline va se fixer au régulateur PchR et réguler la transcription des gènes de la voie PCH en activant la transcription des gènes de biosynthèse de PCH (opérons *pchDCBA* et *pchEFGHI*) et d'import du complexe 2PCH-1Fer (opéron *fptABCX*). De plus PchR réprime sa propre transcription. (125)

La PCH peut chélater également d'autres métaux comme le cobalt, le nickel et le gallium pour les importer dans le cytoplasme bactérien.

d. Import de l'hème et stockage du fer

Le fer est un nutriment essentiel et très répandu dans le corps humain représenté par plus de la moitié par l'hème, qui en plus de rentrer dans la composition de l'hémoglobine, est une source en fer importante pour les pathogènes lors d'infections. *P. aeruginosa* possède deux systèmes de captation de l'hème : le système Phu et le système Has. (126) Le système Phu composé du transporteur TonB dépendant PhuR qui est en compétition avec les hémoprotéines (hémoglobine ou hémopexine) pour fixer et transporter l'hème. Une fois dans le périplasm, l'hème se fixe à la protéine de liaison périplasmique PhuT puis est transférée dans le cytoplasme par le transporteur ABC où elle sera dégradée par l'oxygénase HemO en biliverdine et monoxyde de carbone libérant le fer 2+.

Le système d'assimilation de l'hème Has code pour un hémophore soluble (HasA) sécrété dans le milieu extracellulaire, retirant l'hème de l'hémoglobine pour l'envoyer à un récepteur de membrane externe dépendant de TonB (HasR). Une fois dans le périplasm il

utilisera le transporteur ABC codé par Phu pour rentrer dans le cytoplasme. (127) Une fois le fer internalisé dans le cytoplasme, celui-ci doit être stocké tout en évitant une trop forte concentration qui serait toxique pour la bactérie. Ce stockage est réalisé par deux protéines : la bacterioferritine BfrB et la ferritine FtnA. (128) Le glutathion présent en abondance dans le cytoplasme est également capable de fixer le Fe²⁺ et joue un rôle dans la dissociation du complexe 2PCH/1fer en tant que donneur d'électron.

I.4.4.2.6. Protéase alcaline

La protéase alcaline (AprA) est une métalloprotéase de 50kDa dépendante du zinc, sécrétée par le système de sécrétion de type I. Son action est principalement documentée à partir de la physiopathologie des pneumonies aiguës. Elle clive plusieurs composés tels que la lamine (composant actif de la lame basale), l'interféron γ humain, le facteur de nécrose tumorale alpha qui joue un rôle dans la régulation des cellules immunitaires ou encore l'interleukine 6. (129) Elle peut également dégrader la fibrine, or la formation de fibrine au début des infections pulmonaires semble importante pour limiter l'étendue de l'inflammation.

De plus, la protéase alcaline inhibe les polynucléaires neutrophiles permettant la survie des bactéries et interfère avec l'activation du complément médié par la voie classique comme la protéase IV et l'élastase (via le clivage de C2 et la dégradation des complément C1q et C3).

Enfin, la protéase alcaline empêche la reconnaissance de la bactérie par le récepteur TLR5 donc l'activation immunitaire (via le clivage de la flagelline monomère). (130)

I.4.4.2.7. Protéase IV

La protéase IV est une sérine protéase de 26kDa sous la régulation du facteur sigma PvdS contrôlée par lasR du quorum sensing. Elle a une activité sur le côté carboxyl des peptides contenant de la lysine et peut ainsi digérer de nombreuses protéines biologiques, notamment les immunoglobulines, les composants du complément, le fibrinogène et le plasminogène. Il a été démontré une virulence importante de la protéase IV au niveau de la cornée, pouvant entraîner une perte d'acuité visuelle voir une cécité à la suite d'une kératite à *P. aeruginosa* qui sont particulièrement fréquente lors du port de lentilles de contact. (131) Sa virulence ne se cantonne pas qu'à la cornée, elle détruit également des protéines du surfactant respiratoire et l'interleukine-22. (132)

Lors d'une infection bactérienne, la concentration de fer dans les tissus est faible et le clivage de la lactoferrine et de la transferrine permet d'apporter du fer aux bactéries infectantes. La protéase IV est capable de réaliser ce clivage pour favoriser le développement de l'infection. D'autre part, il a été montré que le régulateur de l'absorption du fer (Fur) contrôle l'expression de PvdS de manière positive lors de concentration faible en fer, et donc de l'expression de la protéase IV.

Au vu de la faible quantité en fer dans le biofilm par rapport à la plupart des environnements, une sécrétion de protéase IV 39 fois plus importante a été observée. (133)

I.5. La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)

I.5.1. Définition et épidémiologie :

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est définie comme toute pneumopathie survenant dans les services de réanimation 48h après l'intubation et jusqu'à 48 heures après l'extubation.

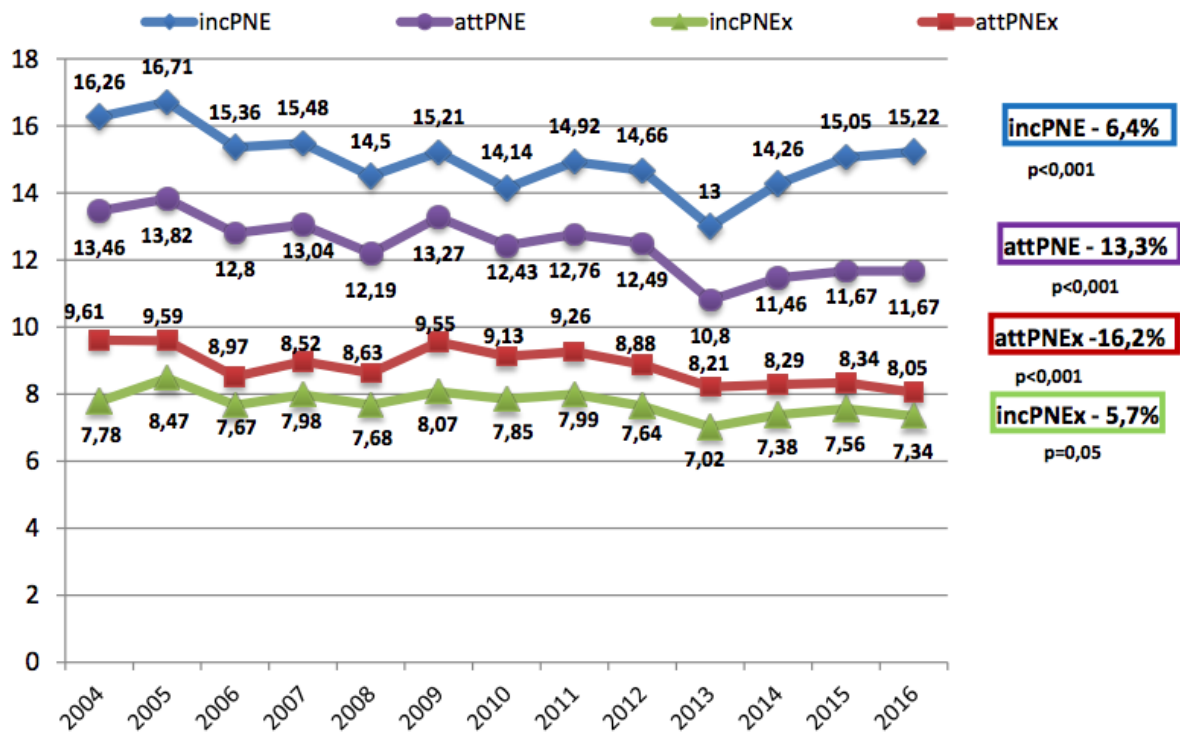
Il s'agit de la 3^{ème} infection nosocomiale la plus fréquente après les infections urinaires et les infections du site opératoire. La dernière étude de Santé Publique France et du réseau REA-Raisin de 2016 retrouvait un taux d'incidence de PAVM de 11,67 sur 100 patients intubés soit un taux d'incidence de 15,22 sur 1000 jours d'intubation. Ces taux d'incidence ont une tendance à la baisse depuis les années 2000 liés à une baisse du pourcentage de patients intubés mais surtout de la durée d'exposition moins longue depuis 2009 du fait des recommandations portant sur le sevrage et l'utilisation de techniques non invasives.

Le délai d'apparition moyen par rapport à l'admission en réanimation est de 11,6 j pour les pneumopathies et le délai exprimé par rapport au début de l'exposition au dispositif invasif est en moyenne de 10,7 j pour les pneumopathies associées à l'intubation. (10)

Dans 88,7% des cas, la pneumopathie est associée à l'intubation (premiers épisodes). Le mode de diagnostic le plus fréquent est "protégé semi-quantitatif", c'est-à-dire par lavage broncho-alvéolaire qui correspond à un diagnostic de 50% des PAVM. 74,9 % des premiers épisodes de pneumopathies sont monomicrobiens, dont 20% des PAVM sont dues à *P. aeruginosa* et 13,3% au *Staphylococcus aureus*. (10)

L'intubation trachéale et la ventilation mécanique sont associées à une augmentation de 7 à 21 fois de l'incidence de la pneumonie et jusqu'à 28 % des patients sous ventilation mécanique développeront cette complication. L'apparition d'une PAVM est associée à une augmentation attribuable de la morbidité et de la mortalité. (134)

Plusieurs facteurs de risque associés à la survenue d'une PAVM ont pu être identifiés tels que le sexe masculin, la durée d'intubation, le nombre de ré-intubation, la présence d'un traumatisme de l'appareil respiratoire ou encore le transfert depuis un autre service de réanimation. Des facteurs protecteurs ont également pu être identifiés tels que la prise d'antibiotique dès l'admission, un âge élevé, ou une chirurgie urgente.



attPNE taux d'attaque des pneumopathies liées à l'intubation pour 100 patients intubés
 incPNE taux d'incidence des pneumonies liées à l'intubation pour 1000 j d'intubation
 attPNEEx taux d'attaque des pneumopathies (liée ou non à l'intubation) pour 100 patients de réanimation (intubés ou non)
 incPNEEx taux d'incidence des pneumopathies (liée ou non à l'intubation) pour 1000 j d'hospitalisation en réanimation

Figure 30 : Évolution des taux de pneumopathies de 2004 à 2016 selon différents indicateurs

De 2013 à 2016, nous observons une augmentation de 2,22 points du taux d'incidence des PAVM pour 1000 jours d'intubation qui peut être expliqué par la baisse de la durée d'exposition à l'intubation et qui entraîne nécessairement une baisse du dénominateur (somme des journées d'intubation) et peut expliquer en partie cette augmentation relative du taux d'incidence des pneumopathies.

I.5.2. Physiopathologie de la PAVM

Le diagnostic de la PAVM reste toujours complexe, associant des arguments cliniques, radiologiques et biologiques. La radiologie est le critère principal de diagnostic avec une atteinte du parenchyme pulmonaire et une condensation plutôt des bases. Cette atteinte est associée à des critères cliniques résultant de l'impact de l'infection sur le patient tels que l'augmentation des besoins en oxygène (augmentation du rapport PaO₂/FiO₂) ou encore du score CPIS (Clinical Pulmonary Infection Score). A cela s'ajoutent des critères microbiologiques qui permettent d'identifier le (ou les) pathogène(s) responsable(s) et facilite la prise en charge et le traitement de la PAVM (Figure 31).

Les principaux agents pathogènes responsables de PAVM sont *P. aeruginosa*, *S. aureus* et les *Entérobactérales*. *S. aureus* ou encore *S. pneumoniae* sont surtout responsables de PAVM dites précoces (survenant dans les 5 premiers jours post-intubation). A contrario, *P. aeruginosa* ou *A. baumannii*, sont responsables de PAVM dites tardives (survenant après 5 jours).

R
a
d
i
o

Deux clichés radiologiques ou plus avec une image évocatrice de pneumopathie pour les patients avec cardiopathie ou maladie pulmonaire sous-jacente.
En l'absence d'antécédents de cardiopathie ou de maladie pulmonaire sous-jacente, une seule radiographie ou un seul examen scannographique suffit.

et au moins un des signes suivants

S
y
m
p
t
ô
m
e
s

- hyperthermie > 38 °C sans autre cause
- Leucopénie (<4000 GB/mm³) ou hyperleucocytose (≥ 12 000 GB/mm³)

et au moins un des signes suivants

(ou au moins 2 si pneumopathieS cliniques uniquement (cfr. PN 4 et 5 ci-dessous))

- Apparition de sécrétions purulentes ou modifications des caractéristiques (couleur, odeur, quantité, consistance)
- Toux ou dyspnée ou tachypnée
- Auscultation évocatrice, ronchi, sibilance
- Détérioration de la gazométrie (désaturation) ou besoins accrus en oxygène ou en assistance respiratoire

Et selon le moyen diagnostique utilisé

M
i
c
r
o
b
i
o
l
o
g
i
e

a – Diagnostic bactériologique effectué par :

Examen bactériologique protégé avec numération de micro-organisme (culture quantitative) (PN 1)

- lavage broncho-alvéolaire (LBA) avec seuil de $\geq 10^4$ UFC/ml ou ≥ 5 % des cellules obtenues par LBA avec des inclusions bactériennes au Gram à l'examen direct (classé dans la catégorie diagnostique LBA).
- brosse de Wimberley avec seuil de $\geq 10^3$ UFC/ml
- prélèvement distal protégé (PDP) avec seuil de $\geq 10^3$ UFC/ml

Examen bactériologique non protégé avec numération de micro-organisme (PN 2)

bactériologie quantitative des sécrétions bronchiques (p.ex. aspiration endo-trachéale) avec un seuil de 10^6 UFC/ml

b – Méthodes microbiologiques alternatives (PN 3)

- Hémocultures positives (en l'absence d'autre source infectieuse)
- Culture positive du liquide pleural
- Abscès pleural ou pulmonaire avec ponction positive
- Examen histologique du poumon évocateur de pneumonie
- Examens pour pneumopathies virales ou à micro-organisme particulier (*Legionella*, *Aspergillus*, mycobactéries, mycoplasmes, *Pneumocystis carinii*)
 - mise en évidence d'Ag ou d'AC dans les sécrétions bronchiques
 - examen direct positif ou culture positive de sécrétions ou tissus bronchiques
 - conversion sérologique (ex : grippe, *Legionella*, *Chlamydia*)
 - antigène dans les urines (*Legionella*)

c- Autres

- **bactériologie des crachats ou examen non quantitatif des sécrétions bronchiques (PN 4)**
- **aucun critère microbiologique (PN 5)**

*Remarque: ces critères ont été validés en absence de traitement antibiotique au préalable

Figure 31 : Critères de diagnostic d'une pneumonie lié aux soins intensifs (135)

La physiopathologie de la survenue d'une PAVM reste à ce jour encore peu connue. Elle a principalement été documentée par deux mécanismes :

- Par voie endogène (la plus fréquente) : inhalation des bactéries de la flore oropharyngée qui colonisent la sonde endotrachéale, celle-ci favorise en effet l'accès des micro-organismes pathogènes au tractus respiratoire inférieur. (136) Nous observons ainsi une contamination des sécrétions sous-glottique soit directement de l'oropharynx soit secondairement suite à un reflux de l'estomac ou par la sonde nasogastrique de nutrition entérale qui peut devenir un réservoir important de bacilles à gram négatif. (137)
- Par voie exogène : correspondant à une contamination par des agents pathogènes à partir de l'environnement de l'unité de soins intensifs (eau hospitalière, inhalations d'aérosols médicamenteux ou d'air, mains et vêtements souillés des professionnels de santé ...)

La formation de biofilm dans la sonde endotrachéale peut jouer un rôle contributif dans le maintien de la colonisation trachéale et avoir un rôle important dans la PAVM. (138) En outre, un biofilm bactérien formé sur la surface interne de la sonde trachéale favorise la colonisation bactérienne trachéobronchique en agissant comme un réservoir de contamination des voies aériennes (Figure 32). L'équilibre entre les défenses locales et générales de l'hôte d'une part, et la quantité et la virulence des micro-organismes infectants, détermine alors si la colonisation progressera vers une PAVM. Par ailleurs, la pose de la sonde favorise la survenue de la PAVM car elle peut emmener directement des pathogènes oro-pharyngés vers les voies aériennes profondes. Elle crée également de multiples micro-lésions de l'appareil mucociliaire. Les autres facteurs favorisant la PAVM sont l'âge du patient, la présence d'antécédent pulmonaire (mucoviscidose, bronchopneumopathie chronique obstructive ...) ou encore la présence d'une immunodépression.

Pathogenesis of ventilator-associated pneumonia (VAP)

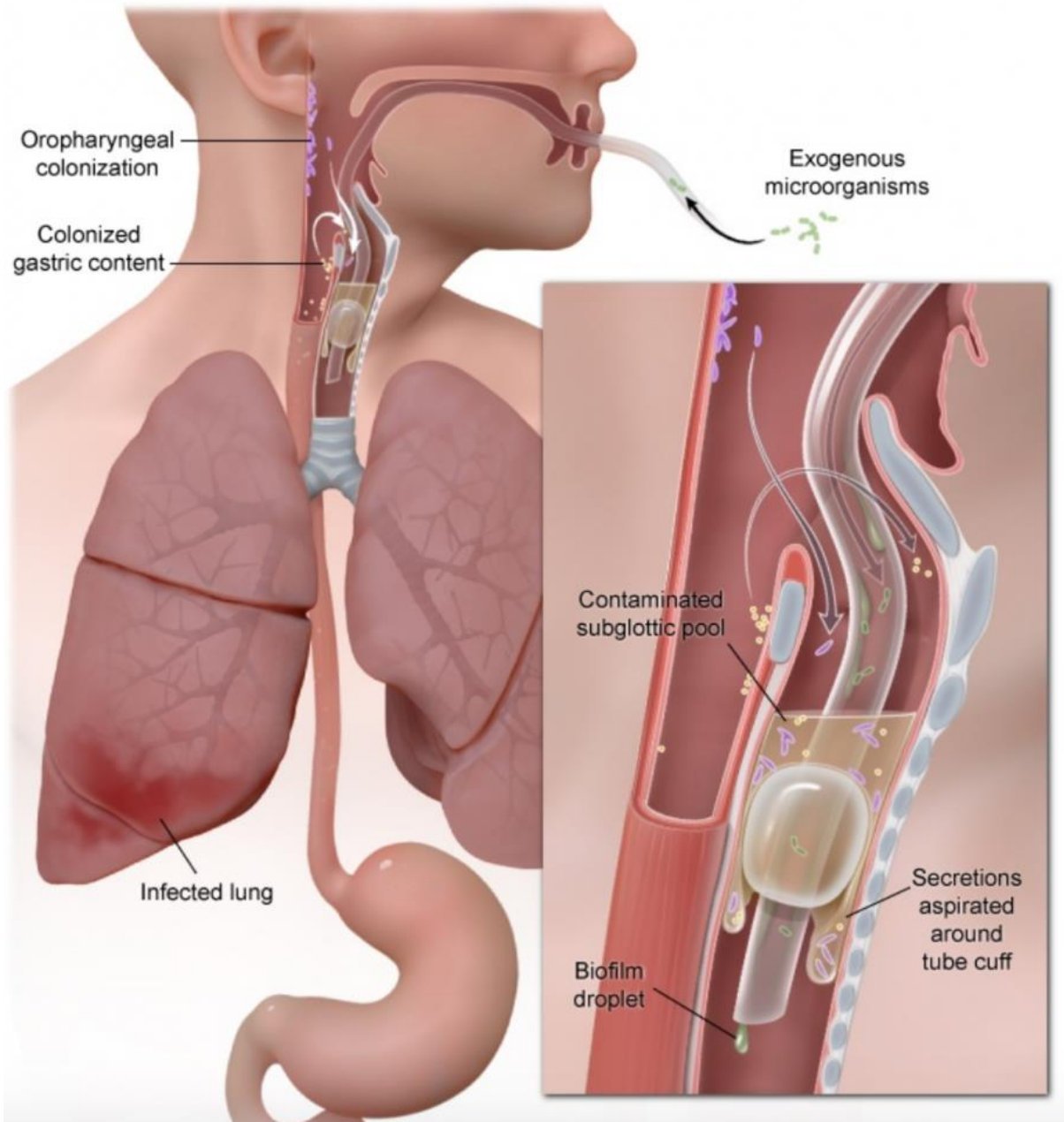


Figure 32 : Représentation de la physiopathologie lors d'une intubation endotrachéale (139)

I.5.3. Rôle de *P. aeruginosa* dans la PAVM

L'espèce *P. aeruginosa* est un pathogène important des services de Réanimation, de par ses nombreux facteurs de virulence et sa complexité de traitement au vu des phénotypes de résistance.

Cette bactérie est classiquement associée aux PAVM tardives car elle provient surtout de l'environnement hospitalier et est capable de former un biofilm lui permettant de se nicher idéalement sur le matériel de soins notamment les sondes endo-trachéales. La formation du biofilm peut se faire au niveau de la surface interne de la sonde endotrachéale (contenant des microorganismes exogènes) ou au niveau supérieur du ballonnet (contenant un mélange de bactéries d'origine oropharyngée et gastrique). C'est après l'accumulation de ce biofilm qu'il y a un risque de fuite du biofilm jusqu'au niveau de l'appareil respiratoire inférieur. Pour éviter cela des mesures préventives ont été mis en place lors de la 5^{ème} conférence de consensus de la société de réanimation française tels qu'une pression du ballonnet assez grande (entre 25 et 30 cmH₂O pour diminuer les micro inhalations), la décontamination oro-pharyngée régulière ou encore une angulation minimale de 30° pour éviter de maintenir le patient intubé en décubitus dorsal strict.

La diversité des isolats des *P. aeruginosa* colonisateurs initiaux des patients intubés est élevée reflétant les différentes sources d'acquisition des isolats (endogène, environnementale, transmission inter-patient) mais cette diversité diminue avec le temps. Non pas à cause d'une pression sélective des antibiotiques mais plutôt due aux conditions de l'environnement pulmonaire. (140)

La PAVM survient significativement plus tôt chez les patients déjà colonisés. Effectivement une étude internationale a conclu que les risques de développer une PAVM par *P. aeruginosa* étaient huit fois plus élevés chez les patients ayant déjà été colonisés que chez les patients non colonisés. (138)

Par ailleurs, de nombreuses études se sont intéressées au lien entre certains facteurs de virulence et l'aspect clinique du patient intubé. Notamment une pathogénicité très augmentée lors de PAVM avec une forte production d'élastase et de pyocyanine.(141,142) De plus, la perte d'intégrité des barrières pulmonaires permet une dissémination bactérienne dans la circulation sanguine et la fuite de cytokines pro-inflammatoires, provoquant une diminution de la pression artérielle moyenne, indicateur de choc septique . Le résultat net est une mortalité accrue associée à l'infection par des souches T3SS+. (84)

I.5.4. Intérêt de l'étude génomique des souches de *P. aeruginosa* en service de réanimation

Le très grand génome de *P. aeruginosa* contribue considérablement à sa capacité d'adaptation, favorisant sa survie en atténuant sa virulence et évitant le système immunitaire avec la perte de flagelle et de pili. Par conséquent, les études génomiques fournissent des informations importantes sur l'élucidation de l'évolution de *P. aeruginosa* et de ses interactions avec l'hôte tout au long de l'infection.

Au vu des résistances et des facteurs de virulence du *P. aeruginosa*, la détection des différents gènes par le NGS pourrait permettre de mieux comprendre l'impact du contenu génomique sur l'évolution clinique et donc d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la PAVM. La présence bactérienne pourra nous renseigner sur ses capacités à la colonisation en échappant au système immunitaire donnant une indication de non antibiothérapie au vu de sa présence sans pathogénicité, ou au contraire la présence de facteurs de virulences notamment toxigène qui nécessiterait un traitement le plus précoce possible.

De plus le NGS va apporter son aide au développement vaccinal contre le *P. aeruginosa*, en effet depuis quelques années les chercheurs travaillent sur un vaccin capable d'éradiquer la bactérie notamment chez les mucoviscidoses. Pour être le plus efficace possible, il faut être parfaitement informé de l'armement de la bactérie et de sa manière de vivre au sein du poumon. Ainsi des anticorps pourront cibler un épitope précis (tels que le flagelle ou les mécanismes de captations ferriques) pour tuer la bactérie.

Indépendamment de cette approche clinique, l'analyse génomique permet d'apporter un point de vue épidémiologique aux isolats circulants dans le service de Réanimation du CHU de Limoges. La caractérisation des souches par leur ST et nombre de SNP permet par exemple de suivre la dissémination bactérienne dans un service, d'identifier une éventuelle épidémie voir d'identifier des sources de contaminations environnementales en collaborant avec les équipes opérationnelles d'hygiène et le laboratoire. Cette analyse génomique permet ainsi de prévenir et alerter précocement l'émergence d'un clone particulier.

De plus cette analyse permet une comparaison national et international, pouvant faire ressortir l'émergence de souches virulentes, l'identification fréquente de gènes de résistances particuliers ou encore la présence d'éléments génétique mobile perturbant la mise en place de traitement anti-pseudomonale.

Néanmoins, l'analyse par NGS nécessite encore beaucoup de temps de préparation comprenant plusieurs heures de manipulation et un temps de séquençage d'au moins 24 heures, ce qui est un frein à son déploiement en clinique. Bien que plusieurs études ont tenté de mettre en place ce dispositif en routine, la culture microbiologique est encore nécessaire et bien plus rapide pour aiguiller le clinicien dans son interprétation clinique et son choix d'antibiothérapie. Les décisions de prise en charge médicale ne seront réalisables que lorsque l'analyse génomique sera bien plus rapide.

II. Matériels et Méthodes

La Figure 33 présente l'organigramme des principales étapes réalisées dans cette étude

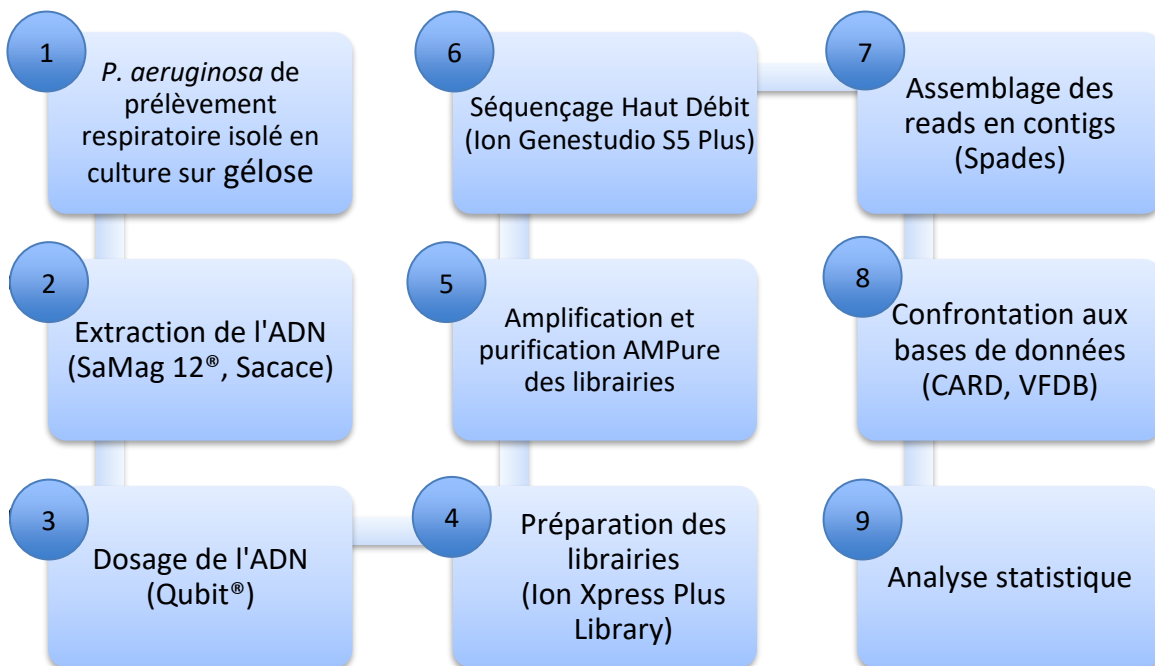


Figure 33 : Organigramme de l'étude

II.1. Isolement et extraction des isolats de *P. aeruginosa*

II.1.1. Sélection des isolats

Depuis 2019, tous les isolats de *P. aeruginosa* isolées en culture à partir de prélèvements respiratoires et provenant de patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente du Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren de Limoges ont été conservées. Les prélèvements respiratoires incluent des aspirations endotrachéales (AET), des aspirations bronchiques ou encore des liquides de lavage broncho-alvéolaire.

Tous les isolats ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène au cours de la prise en charge standard des prélèvements respiratoires en suivant les recommandations européennes de l'ESCMID. Un antibiogramme a également été réalisé en milieu liquide sur carte AST-N240 sur l'automate Vitek2® (bioMérieux) ou en milieu gélosé Mueller-Hinton avec des disques imprégnés d'antibiotiques. Chaque antibiogramme a été interprété selon les recommandations EUCAST CA-SFM 2019 V.1.0 afin de déterminer leur profil de sensibilité.

II.1.2. Recueil des informations cliniques

Pour chaque patient ayant présenté au minimum une colonisation respiratoire à *P. aeruginosa*, plusieurs paramètres cliniques ont été recueillis dont :

- l'âge du patient
- les antécédents et les comorbidités du patient
- les dates d'admission et de sortie dans le service de réanimation de Limoges
- le numéro de la chambre d'hospitalisation
- le motif d'admission
- la positivité au Covid-19 lors de l'hospitalisation
- la présence d'une bactériémie ou d'une autre infection
- la présence d'une intubation et si oui la date de l'intubation
- la présence d'une PAVM et sa date
- la date et le type du prélèvement respiratoire
- la quantification du *P. aeruginosa* et sa présence seul ou associé à d'autres bactéries
- la conclusion clinique d'une trachéo-bronchite ou d'une simple colonisation devant l'absence de PAVM
- la mortalité

II.1.3. Extraction de l'ADN

Chaque isolat a été ré-isolé sur gélose au sang. L'extraction des ADN a été réalisée en utilisant le kit *SaMag bacterial DNA extraction* sur l'automate SaMag-12® (Sacace Biotechnologies). Rapidement, quatre à cinq colonies de chaque souche ont été resuspendues dans 220 µL de tampon d'extraction (buffer BL2B). Deux cent microlitres de cette solution sont récupérés et extraits dans un volume d'élution de 50 µL.

II.1.4. Dosage de l'ADN

Les extraits d'ADN recueillis ont été quantifiés sur l'appareil QuBit® selon la procédure du kit *Qubit dsDNA Broad Range Assay* (ThermoFischer Scientific). Il s'agit d'une technique de quantification de l'ADN basée sur la mesure de fluorescence émise uniquement après liaison à l'ADN. Cette spécificité permet une quantification précise des acides nucléiques.

II.2. Le séquençage haut débit

Le séquençage haut-débit est une technique de séquençage du génome. Le WGS (ou Whole Genome Sequencing) consiste à obtenir la séquence ADN intégrale d'une souche bactérienne d'intérêt. Elle se distingue des autres techniques de séquençage par l'absence d'amplification préalable. Le séquençage haut débit a pour principe de base la formation et la lecture de façon conjointe de millions de *reads* (ou courtes séquences d'ADN de 200 à 400 pb) qui une fois réassemblés pourront permettre de reconstruire le génome initial. Pour obtenir ces *reads* plusieurs étapes préalables sont nécessaires à savoir la préparation des bibliothèques, le contrôle et la quantification des bibliothèques, l'amplification des bibliothèques et le séquençage.

II.2.1. Préparation des librairies

L'étape de préparation des librairies consiste à préparer l'ADN bactérien afin qu'il soit en capacité de passer sur le séquenceur. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit *Ion Xpress Plus Fragment Library for AB Library Builder System* (ThermoFisher Scientific) qui présente l'avantage d'être semi-automatisé par l'automate *Library Builder* (ThermoFisher Scientific).

L'ADN bactérien est premièrement fragmenté en morceaux de 200 à 300 pb, à l'aide d'une enzyme appelée *Ion Shear*. Pour pouvoir identifier chaque échantillon et donc chaque morceau d'ADN appartenant au même isolat, un code-barre composé de quelques nucléotides a été attribué à chaque isolat et ajouté par ligation aux différents fragments d'ADN de chaque isolat. Des adaptateurs P1 et A, qui sont nécessaires aux premières étapes du séquençage, sont également inclus aux extrémités de chaque fragment d'ADN. Chaque étape de la préparation de librairie nécessite la purification des fragments d'ADN ayant fixés les adaptateurs et le code-barre (Figure 34). Ces purifications sont réalisées à l'aide de billes d'AMPure® (Beckman Coulter). Ces billes permettent la fixation d'ADN par polarité et la purification des fragments est réalisée après deux lavages à l'éthanol 70%. L'élution est réalisée dans vingt microlitres d'eau ppi.

Au bout de ces deux heures de préparation, l'amplification des fragments d'ADN ayant liés les adaptateurs et les codes-barres est nécessaire pour optimiser la librairie. Une PCR de 8 cycles est réalisée en utilisant une enzyme hautement fidèle pour éviter l'insertion d'erreur contenue dans un mix : la polymérase Platinum PCR SuperMix High Fidelity (ThermoFisher). A celle-ci est ajoutée des amorces Primer Mix présentes dans le coffret *Ion Plus Fragment Library Adapters* (ThermoFisher) complémentaires des adaptateurs P1 et A. En sortie de PCR, une purification des fragments d'ADN est réalisée grâce aux billes d'AMPure.

En sortie de PCR, une purification des fragments d'ADN est réalisée grâce aux billes d'AMPure.

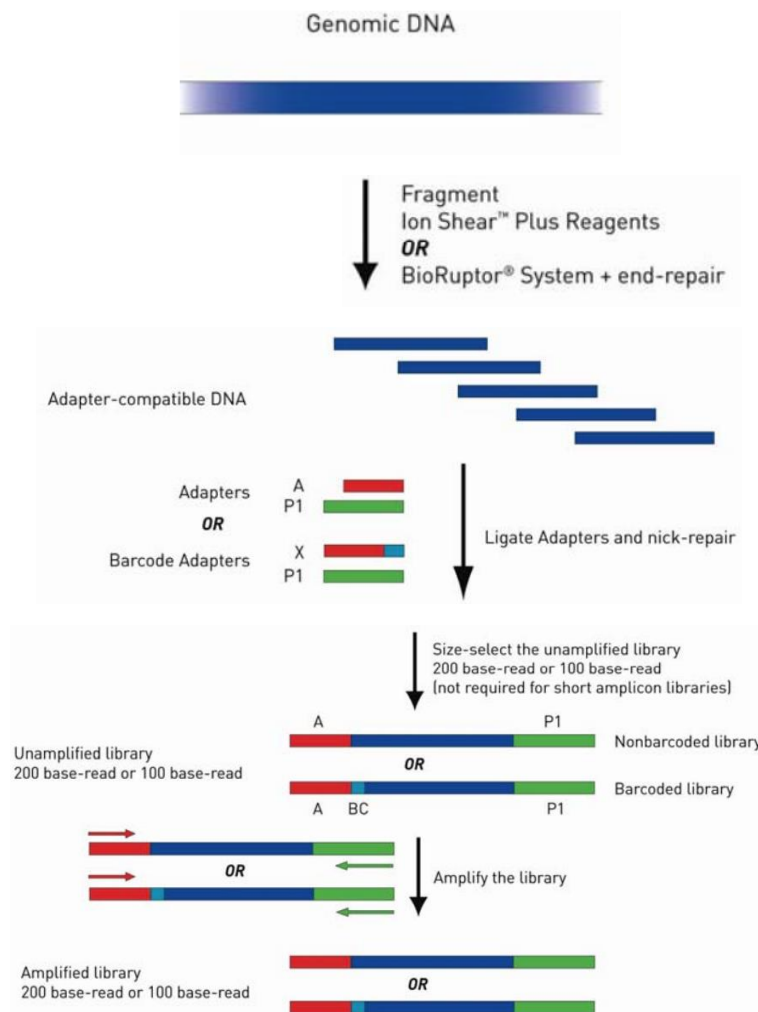


Figure 34 : Etapes de préparation de la bibliothèque d'ADN génomique ionique et d'amplicons

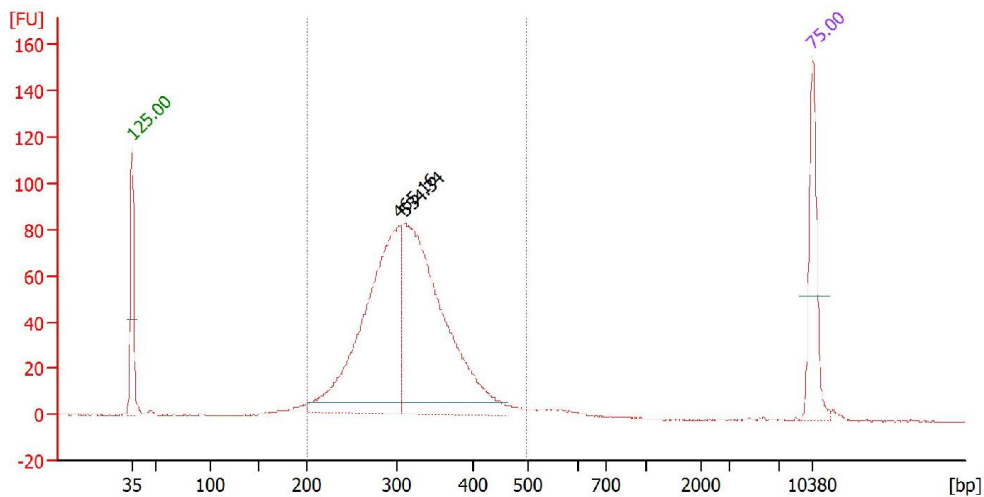
II.2.2. Contrôle et quantification des librairies

L'analyse de taille et de quantité des fragments d'ADN doit être réalisée avant séquençage pour pooler de façon équimolaire les différents ADN barecodés. Cela a été réalisé sur l'automate *bioAnalyzer* (Agilent Technologies) avec le kit *Agilent Broad Range DNA Reagents*, qui contient les puces (Figure 35) et les réactifs. La puce contient un ensemble de microcanaux interconnectés permettant la séparation des fragments d'acide nucléique en fonction de leur taille et la quantification des fragments grâce à la détection de la fluorescence.



Figure 35 : Puce Agilent High Sensitivity DNA

Nous obtenons un profil tel que celui présenté sur la Figure 36. Deux marqueurs de taille de 35 bp et 10380 bp permettent de calibrer la taille et la quantification de l'électrophorèse. Pour toutes nos souches, nous avons obtenu un pic maximal de concentration compris entre 300 et 400 bp. Cette taille de fragment correspond à nos ADN de souches fragmentés à environ 200 pb ainsi que les adaptateurs et code-barres ajoutés durant l'étape de préparation de librairie (100 pb environ). La quantification en picomolaire de chaque échantillon a été relevée. Ces profils nous ont permis d'affirmer que la quantité d'ADN disponible était suffisante et que la préparation des librairies était satisfaisante.



Peak table for sample 6 : 41

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Molarity [pmol/l]	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	35	125,00	5 411,3	Lower Marker	43,00
2	303	465,16	2 322,9		70,46
3	311	534,34	2 602,7		71,07
4	10380	75,00	10,9	Upper Marker	113,00

Figure 36 : Exemple d'électrophorèse d'une souche de *P. aeruginosa*

II.2.3. PCR émulsion

L'étape de séquençage à proprement parler, doit être précédée d'une amplification clonale nécessaire pour permettre un signal de détection suffisant. Cette étape est spécifique du séquençage par la technologie Ion Torrent. Elle est réalisée par PCR en émulsion à l'aide de l'automate Ion Chef, comprenant 50 cycles pour une durée d'environ 6 heures. Le principe de cette PCR est précisé dans la Figure 37. Il permet d'isoler dans une émulsion formée par un mélange eau-huile, une bille d'ISP (*Ion Sphere Particles*), un fragment d'ADN, les ePCR primers, les dNTP et l'ADN polymérase. L'amplification du fragment sera réalisée grâce à des amorces couplées à une biotine reconnaissant l'adaptateur P1. En sortie de l'Ion Chef, chaque bille sera recouverte de millions de copies clonales du fragment d'ADN initial. Les ISP fixées à l'ADN seront récupérées après purification et chargées sur une puce de séquençage *Ion 540 Chip* recouverte de 150 millions de micropuits, dont chacun a la capacité d'intégrer une seule bille.

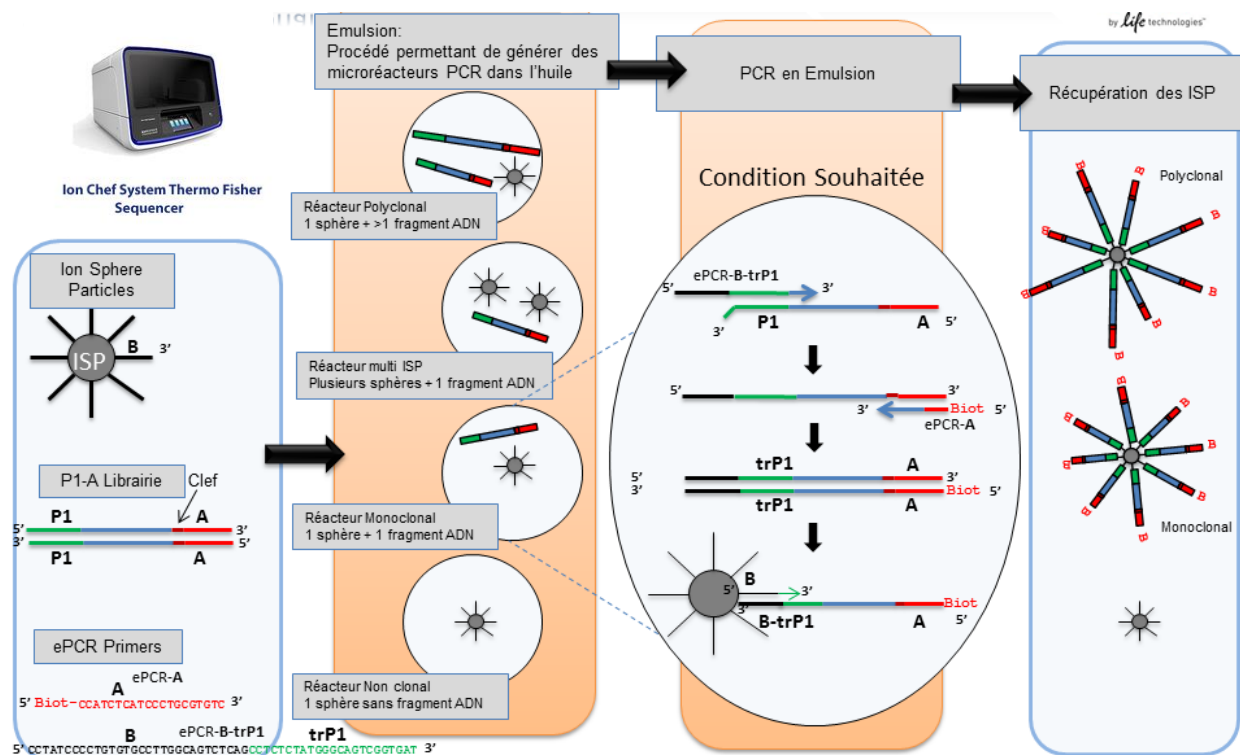


Figure 37 : Étape de la PCR émulsion préalable au séquençage haut débit (d'après ThermoFisher Scientific)

II.2.4. Séquençage

Le séquençage Ion Torrent est une méthode de séquençage basée sur la détection d'ions hydrogènes libérés durant la polymérisation de l'ADN. C'est une méthode de séquençage par synthèse durant laquelle un brin complémentaire est créé à partir d'une amorce reconnaissant l'adaptateur A. Ainsi à chaque ajout de dNTP par l'ADN polymérase un proton H^+ sera émis ce qui modifiera le pH. Cette variation sera prise en compte en temps réel

Run Summary

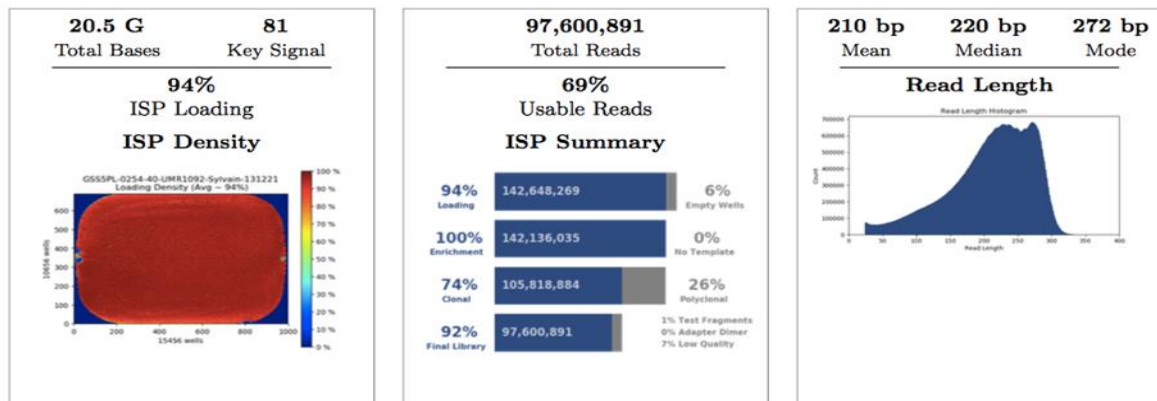


Figure 39 : Exemple d'un chargement d'une puce de séquençage. A gauche est représenté le taux de chargement des ISP sur la puce ; au centre le nombre total de *reads* générés ainsi que le nombre de *reads* polyclonaux et de faibles qualités ; à droite la taille moyenne des fragments séquencés

II.2.5. Deux paramètres clés du NGS : couverture et profondeur

Le séquençage haut débit est une technologie innovante et performante, mais le risque d'erreur n'est pas nul. Pour évaluer la qualité des séquences générées, plusieurs paramètres sont importants :

- Le **Phred-Score** est un score de qualité de séquençage attribué à chaque base. Plus sa valeur est élevée, moins le risque d'erreur est grand. Par exemple un Phred-Score égal à 20 correspond à une erreur de séquençage toutes les 100 pb tandis qu'à 30 il y a un risque d'erreur toutes les 1000 pb. Un Phred-Score supérieur à 20 est au moins requis avec la technologie Ion Torrent. Toutes les séquences générées avec un Phred-Score inférieur à 20 sont automatiquement éliminées.
- La **profondeur** correspond au nombre de fois qu'un nucléotide donné a été lu. Ce nombre moyen de lectures par base à une position donnée est exprimé en nombre de fois (X). Plus elle est importante, moins le risque d'erreur sera important et meilleure sera la détection des variants. Une profondeur minimale de 30X est habituellement requise et idéalement de 50X est attendue, c'est-à-dire qu'une base ciblée a été séquencé en moyenne 30 à 50 fois sur des reads indépendants. (143) L'étape d'assemblage pourra ensuite prendre la lecture de base majoritaire présent sur le plus grand nombre de *reads* et ne tiendra pas compte des rares erreurs de séquençage.
- La **couverture** de séquençage correspond au pourcentage du génome bactérien pour lequel une information a été générée. Une couverture de 100% est ainsi idéalement attendue mais jamais entièrement atteinte. Plus la profondeur de séquençage est élevée, meilleure sera la couverture : couverture et profondeur sont donc étroitement liées.



Figure 40 : Notion de couverture et de profondeur de séquençage. A gauche le gène 1 présente une profondeur importante avec une couverture élevée. A droite, le gène 2 présente une profondeur plus faible et une couverture médiocre (partie du gène non séquencée).

II.3. Analyse bioinformatique

II.3.1. Création des contigs

Une fois le séquençage des échantillons réalisés, les données brutes obtenues en sortie de séquenceur contiennent plusieurs millions de *reads* (tailles de plusieurs Gigabases). Une étape de conversion des données brutes en données biologiques est nécessaire grâce à l'algorithme de "base calling" faisant une conversion des données sous forme de nucléotides (A, T, C, G) pour créer les *reads* regroupés dans un fichier au format UBAM. Ce fichier sera converti en format FASTQ par le logiciel Bamtools. A chaque base incorporée est associé un Phred-Score, retrouvé à la fois dans les fichiers UBAM et FASTQ. Ces fichiers sont très volumineux et dépassent plusieurs gigaoctets d'informations. Pour réduire leur taille et interpréter les résultats, les *reads* qui se superposent sont assemblés afin de recréer la séquence d'ADN originelle de la bactérie sous forme de *contigs* (fragments de plusieurs centaines de milliers de paires de bases). Cette étape cruciale dépend de la qualité de séquençage, du taux d'erreurs de la technique, de la profondeur de séquençage et du logiciel d'assemblage.(144,145) Nos données ont été assemblées grâce à l'assembleur SPADES afin d'obtenir des données analysables.

II.3.2. Analyse MLST à partir des données de séquençage

Après assemblage des *reads* l'analyse par typage des séquences multilocus (MLST) a été réalisée à partir des données de séquençage assemblées. Celle-ci a été réalisée à l'aide du serveur PubMLST 2.0 (146) et est basée sur l'analyse des différents allèles des sept gènes de ménage du *P.aeruginosa* (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* et *trpE*). Les types de séquences ont été déterminés selon les profils alléliques pour chaque isolat.

II.3.3. Analyse phylogénétique

A partir des contigs, une analyse des liens de parenté entre isolats a été effectuée grâce au logiciel « snippy v4.4.3 ». Ce dernier permet de rechercher les *Single Nucleotides Polymorphisms* entre chaque isolat par rapport à une souche de référence, PAO1 dans notre cas. Le nombre de SNPs retrouvé permet premièrement de classer phylogénétiquement les souches. En effet, des souches ayant un faible nombre de SNPs sont génétiquement plus proches. Deuxièmement, le nombre de SNP permet d'affirmer si deux isolats appartiennent à un même clone (nombre de SNP < 5) (147) sachant que le cut-off de SNP est discutable. La visualisation de l'arbre phylogénétique a été effectuée en utilisant les logiciels Fasttree v2.1.10 et Figtree v1.4.4.

II.3.4. Analyse des gènes de résistance

La recherche des différents gènes de résistances retrouvés sur nos isolats a été effectuée avec le logiciel « *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* » (CARD) v3.2.0 (Université McMaster, Hamilton, Ontario). Ce programme permet d'annoter les gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) dans les génomes assemblés par similarité de séquences d'intérêt des gènes de résistances avec un pourcentage de couverture et d'identification supérieurs à 95%.

Par ailleurs, nous avons analysé sur le logiciel Geneious® v2020.0.4 certains gènes d'intérêt reconnus pour être responsable des principales résistances observées chez l'espèce *P. aeruginosa*. Il s'agit des gènes *ampC*, *ampD*, *ampDh2*, *ampDh3*, *ampR*, *dacB* et *oprD* pour les bêta-lactamines, et des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* pour la famille des fluoroquinolones.

Par alignement de séquences nucléotidiques avec les gènes sauvages de la souche de PAO1, nous avons pu détecter les différentes mutations pouvant conférer une résistance chromosomique. Les séquences nucléotidiques ont ensuite été converties en séquences protéiques pour masquer l'effet des mutations silencieuses. Après alignement protéique par l'aligneur MUSCLE v3.8.425, nous avons récupéré les différentes modifications de séquences en acides aminés.

II.3.5. Analyse des gènes de virulence

Enfin, pour identifier les gènes de virulence, les contigs des différents échantillons ont été soumis à la base de données VFDB (Virulence Finder DataBase) permettant de détecter la présence de 237 facteurs de virulence d'intérêt pour *P. aeruginosa*. Néanmoins, la base de données n'est pas fiable à 100% car la détection de certains gènes peut ne pas être optimale si une trop grande variabilité existe par rapport à la séquence de référence ou si le gène d'intérêt est tronqué dans le contig d'intérêt. C'est pourquoi une analyse complémentaire dans le logiciel Geneious® a été réalisée. Nous avons ainsi pu confirmer l'absence de gènes de virulence par comparaison aux séquences de PAO1.

A partir du profil de virulence de chaque isolat, nous avons réalisé une analyse en coordonnée principale (PCoA) ainsi que des analyses en Shade-plot sur le logiciel Primer-e v7.

II.4. Associations des données génomiques aux données cliniques

Les résultats de typage des isolats et des gènes de virulence ont été confrontés aux données cliniques recueillies et notamment à une évolution pathologique au niveau respiratoire au cours du séjour en Réanimation Polyvalente. Pour cela, le critère PAVM/non PAVM a été utilisé pour analyser les deux sous-populations.

L'analyse des facteurs de virulence selon le critère PAVM a permis de générer une *heatmap* afin d'analyser la fréquence de chaque gène de virulence dans les deux groupes à partir du logiciel GraphPad Prism. Un test du *Chi2* avec un seuil de significativité fixé à 0,05 a été utilisé pour calculer les p-values entre les deux groupes.

III. Résultats

Les résultats sont présentés en plusieurs parties selon les caractéristiques de chaque isolat et des données cliniques, des données de typage, de phylogénie, des profils de résistance et de virulence. Une dernière partie essaiera d'identifier d'éventuels facteurs de virulence associés à la survenue de PAVM dans notre population.

III.1. Nombre d'échantillons inclus, caractéristiques clinique et microbiologiques

Soixante-neuf souches différentes de *P. aeruginosa* ont été inclus dans notre étude, isolées chez 54 patients hospitalisés dans le service de Réanimation polyvalente du CHU de Limoges entre Mars 2019 et Janvier 2022. Huit patients présentaient 2 isolats morphologiquement différents, deux patients en possédaient 3 et un patient en possédait 4. La Figure 41 nous permet de visualiser dans le temps de l'étude le nombre d'hospitalisation par mois de nos patients pour lesquels un ou plusieurs *P. aeruginosa* a été identifié.

Dans le Tableau 1 sont référencés les données démographiques des patients, le motif d'admission, l'infection au Sars-CoV-2, l'apparition d'infections au cours du séjour et leur localisation ayant motivé l'instauration d'une antibiothérapie, l'apparition d'une PAVM, l'origine ainsi que les caractéristiques microbiologiques de chaque prélèvement.

Nous observons une prédominance masculine avec quarante-cinq hommes (84%) et neuf femmes (16%). L'âge moyen des patients inclus était de 62 ans (min = 24 ; max = 81 ans). Les motifs d'admissions étaient surtout d'ordre respiratoire (44%) dont presque la moitié était des pneumopathies au Sars-Cov-2 sur les années 2020-2021. Quelques poly-traumatismes (13%), ou d'autres causes variées tels que des comas hypercapniques ou encore des ruptures d'anévrisme (13%), complètent les motifs d'admissions principaux. Parmi nos 54 patients, 22 % étaient positifs au Sars-Cov-2. Quarante-sept patients ont présenté un épisode infectieux au cours de leur séjour, dont 37 étaient pulmonaires. Parmi ceux-ci 22 PAVM et 11 trachéobronchites ont été recensées.

D'un point de vue microbiologique, la plupart des prélèvements analysés provenaient d'aspiration endo-trachéale et étaient plurimicrobiens. En effet, associée à la présence de *P. aeruginosa*, la culture microbiologique de 17 prélèvements retrouvaient également une entérobactériale, 16 du *S. aureus* et 2 de l'*Haemophilus influenzae*.

Par ailleurs, nous avons observé 15 bactériémies dont 10 étaient documentées à *P. aeruginosa*, parmi celle-ci 9 avaient un point d'appel pulmonaire et une un point d'appel digestif.

Représentation chronologique de nos patients hospitalisés en Réanimation

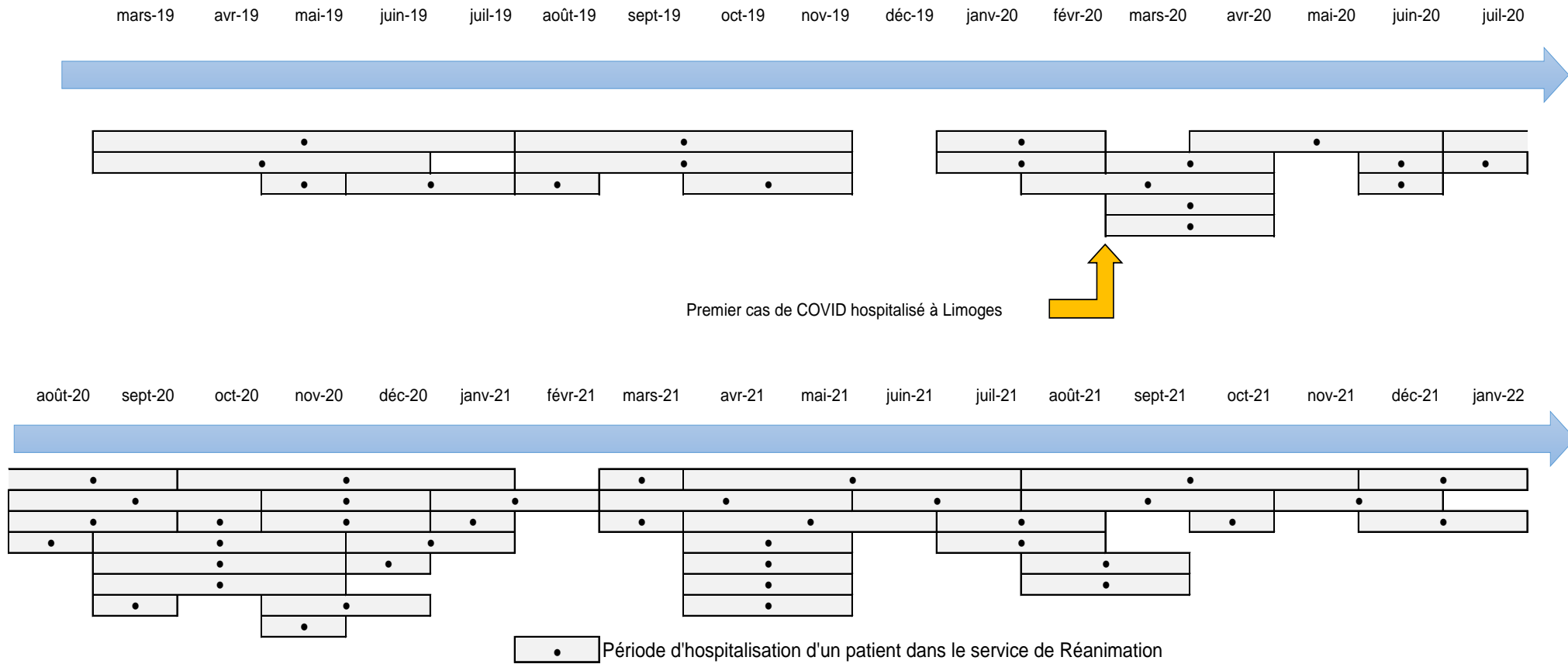


Figure 41 : Chronologie d’hospitalisation de nos patients inclus dans l’étude

Tableau 1 : Caractérisation cliniques et microbiologiques

	n (%)
Sexe	
Homme	45 (84%)
Femme	9 (16%)
Age moyen	62 ans
Motifs d'admission	
Respiratoire	24 (44%)
Polytraumatisme	7 (13%)
Autres	7 (13%)
Digestif	6 (11%)
Neurologique	4 (7%)
Infectieux (hors COVID)	3 (6%)
Cardiaque	3 (6%)
Patient COVID	12 (22%)
Infections au cours du séjour	
Respiratoires	37 (69%)
PAVM	22 (41%)
à <i>P. aeruginosa</i>	13 (24%)
à <i>P.aeruginosa</i> + <i>S.aureus</i>	2 (4%)
à <i>P.aeruginosa</i> + autres germes	7 (13%)
Trachéobronchite	11 (20%)
à <i>P. aeruginosa</i>	8 (15%)
à <i>P. aeruginosa</i> + Enterobacterales	2 (4%)
à <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>	1 (2%)
Autres étiologies respiratoires	4 (7%)
Infection urinaire	5 (9%)
Digestif	3 (6%)
Ventriculite	1 (2%)
Liées à un cathéter	1 (2%)
Bactériémie	15 (28%)
<i>P. aeruginosa</i>	10 (19%)
autres germes	5 (9%)
Type de prélèvement	
AET	59 (86%)
LBA	8 (12%)
Aspiration protégée	2 (3%)
Prélèvements monomicrobiens à <i>P. aeruginosa</i>	23 (33%)
Prélèvements plurimicrobiens	46 (67%)
Entérobacterales	17 (25%)
<i>S. aureus</i>	16 (23%)
Levures	6 (9%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	2 (3%)
Autres germes	5 (7%)

III.2. Typage et phylogénie des isolats séquencés

III.2.1. Qualité de séquençage

Avant de procéder à l'analyse de données, le séquençage haut débit a permis de générer un nombre de *reads* supérieur à 1 million pour chaque échantillon avec un Phred-score supérieur à 20 pour tous les *reads*. Après mapping des génomes sur la séquence de référence de *P. aeruginosa* PAO1, nous avons obtenu la profondeur moyenne de nos échantillons qui varie de 38 à 213 fois (38-213 X), avec une moyenne pour l'ensemble de nos échantillons de 99 fois. C'est-à-dire qu'à chaque position du génome, environ 99 *reads* couvrent un nucléotide donné et permettent d'assurer un séquençage robuste et sûr de la base originelle (Tableau 2). Seuls trois isolats (PA31, PA35 et PA61) n'atteignent pas une profondeur idéale de 50X tout en étant toutefois acceptable car au-delà de 30X de profondeur. La qualité des résultats concernant ces souches pourrait éventuellement être confirmée par un nouveau séquençage ultérieurement.

L'assemblage des *reads* en contigs a généré un nombre de contigs inférieur à 500 pour tous les isolats sauf pour PA27, PA30, PA34 et PA35. Les résultats sont dans l'ensemble satisfaisants mais ces quatre souches pourraient être reséquencées pour confirmer les résultats retrouvés dans cette étude.

III.2.2. Typage MLST des isolats de *P. aeruginosa*

Dans le tableau 3 sont référencés les ST de nos 69 isolats associés aux sérogroupes définis par l'antigène O. Nous observons 37 ST différents avec une fréquence plus importante du ST 27 et ST 244.

Ces isolats sont, par ailleurs, regroupés en 9 sérogroupes définis par l'antigène O du LPS. Les 4 sérogroupes les plus fréquemment retrouvés dans notre étude sont le séro groupe O1 avec 15 isolats, O5 avec 12 isolats, O6 et O11 avec 11 isolats chacun.

III.2.3. Phylogénie des isolats de *P. aeruginosa*

Un arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ensemble de nos souches séquencées a été créé et est présenté Figure 42. Celui-ci a été créé en comparant les SNP entre chaque isolat à la souche de référence PAO1.

Dans cet arbre phylogénétique, nous observons premièrement un regroupement des différents isolats selon leur ST, ce qui permet de valider notre arbre phylogénétique. De plus, nous observons un regroupement des isolats retrouvés chez un même patient qui ont pour la majorité un nombre de SNP <50.

En revanche, plusieurs isolats sont phylogénétiquement très proches alors qu'ils ont été retrouvés chez différents patients. De tels regroupements ont été observés à 10 occasions. Pour pouvoir affirmer que ces isolats appartiennent au même clone, nous avons analysé le nombre de SNP présent entre chacun d'eux (Figure 42). Pour six groupes d'entre eux, le nombre de SNP est inférieur à 50 SNP ce qui est en faveur d'une infection par le même clone et donc d'une diffusion nosocomiale de *P. aeruginosa*. Et un groupe retrouvait 52 SNP.

Ainsi la suspicion de microépidémie pourrait être évoqué notamment avec :

- Les souches PA14, PA15, PA16, PA17, PA19 et PA33 ayant des SNP inférieurs à 23 entre-elles. Elles concernent des patients hospitalisés au même moment (fin 2020 sauf pour PA33) et dont certains possédaient des chambres voisines.
- Les souches PA9, PA10 et PA11 ayant des SNP inférieurs à 16, concerne deux patients hospitalisés en même temps (Mars 2021) dans des chambres voisines (chambres 12 et 13)
- Les souches PA31, PA39 et PA 41 ayant des SNP inférieurs à 8, concerne trois patients hospitalisés sur des périodes proches (fin 2021) dans des chambres voisines (chambres 22, 24 et 25)
- Les souches PA49 et PA59 ayant des SNP inférieurs à 28 concernent deux patients hospitalisés à des périodes différentes dont la chambre d'hospitalisation nous est inconnue.
- Les souches PA65, PA66 et PA69 ayant des SNP inférieurs à 8, concerne deux patients hospitalisés au même moment (Avril 2020) dans des chambres non voisines (chambres 14 et 26)

Enfin, chez un même patient ayant été infecté par les souches PA29, PA34 et PA35 nous observons un éloignement phylogénétique de PA35 confirmé par une différence de 18315 SNP entre PA35 et PA29 et une différence de 18413 SNP entre PA35 et PA34. Cela nous amène à penser que ce même patient a été infecté par deux souches de *P. aeruginosa* différentes.

Tableau 2 : Profondeur moyenne obtenue pour chaque isolat après séquençage haut débit

Souches	Profondeur séquençage vs PAO1 (en X)	Nombre de contigs après assemblage	Souches	Profondeur séquençage vs PAO1 (en X)	Nombre de contigs après assemblage
PA-1	147,6	320	PA-36	68,6	341
PA-2	140,5	243	PA-37	56,6	127
PA-3	102,8	323	PA-38	85,6	112
PA-4	166,5	173	PA-39	71,3	336
PA-5	155,6	235	PA-40	71,4	454
PA-6	128,5	376	PA-41	122,2	261
PA-7	154,7	168	PA-42	80,2	222
PA-8	146,6	238	PA-43	50,2	357
PA-9	134,8	388	PA-44	133,9	280
PA-10	113,1	408	PA-45	82,7	317
PA-11	108,6	368	PA-46	93,9	172
PA-12	197,3	225	PA-47	96,5	150
PA-13	132,3	173	PA-48	67,7	253
PA-14	109,2	236	PA-49	101,4	224
PA-15	137,3	243	PA-50	92,9	261
PA-16	117,4	324	PA-51	74,4	221
PA-17	119,8	323	PA-52	119,8	240
PA-18	122,2	230	PA-53	95,5	275
PA-19	90,5	242	PA-54	94,5	386
PA-20	56,4	281	PA-55	82,7	227
PA-21	59,6	652	PA-56	77,1	166
PA-22	68,7	275	PA-57	115,9	167
PA-23	57,3	265	PA-58	136,1	114
PA-24	75,3	227	PA-59	82,9	179
PA-25	67,2	252	PA-60	100,8	239
PA-26	50,7	260	PA-61	45,6	272
PA-27	50,3	1417	PA-62	193,8	135
PA-28	58	256	PA-63	71,8	118
PA-29	106,5	178	PA-64	129,3	124
PA-30	63,8	1433	PA-65	102,1	154
PA-31	37,7	219	PA-66	62,3	213
PA-32	96,1	305	PA-67	93,5	174
PA-33	58,8	579	PA-68	212,7	150
PA-34	66,5	1243	PA-69	107,7	159
PA-35	40,9	2471			

Tableau 3 : Représentation des sérogroupes et des ST de nos 69 souches

Souche	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10	PA11	PA12	PA13	PA14	PA15	PA16	PA17	PA18	PA19	PA20	PA21
Sérogroupe	O7	O11	O10	O5	O3	O2	O11	O3	O11	O11	O11	O6	O6	O1	O1	O1	O1	O6	O1	O10	O11
ST	2102	253	253	3719	3037	244	1031	508	235	235	235	155	395	27	27	27	27	2618	27	253	308

Souche	PA22	PA23	PA24	PA25	PA26	PA27	PA28	PA29	PA30	PA31	PA32	PA33	PA34	PA35	PA36	PA37	PA38	PA39	PA40	PA41
Sérogroupe	O6	O4	O2	O6	O2	O1	O6	O4	O1	O11	O11	O1	O4	O6	O3	O3	O3	O11	O6	O11
ST	2618	1395	381	179	348	27	395	992	27	446	309	27	992	2048	2056	2056	2056	446	282	446

Souche	PA42	PA43	PA43	PA44	PA45	PA46	PA47	PA48	PA49	PA50	PA51	PA52	PA53	PA54	PA55	PA56	PA57	PA58	PA59	PA60
Sérogroupe	O3	O2	O2	O2	O1	O1	O1	O6	O5	O5	O5	O5	O5	O4	O11	O5	O5	O6	O2	O1
ST	2715	270	270	270	207	612	612	186	277	267	267	267	267	175	571	991	991	1129	277	313

Souche	PA61	PA62	PA63	PA64	PA65	PA66	PA67	PA68	PA69
Sérogroupe	O5	O1	O1	O1	O5	O5	O3	O4	O5
ST	244	207	242	242	244	244	274	389	244

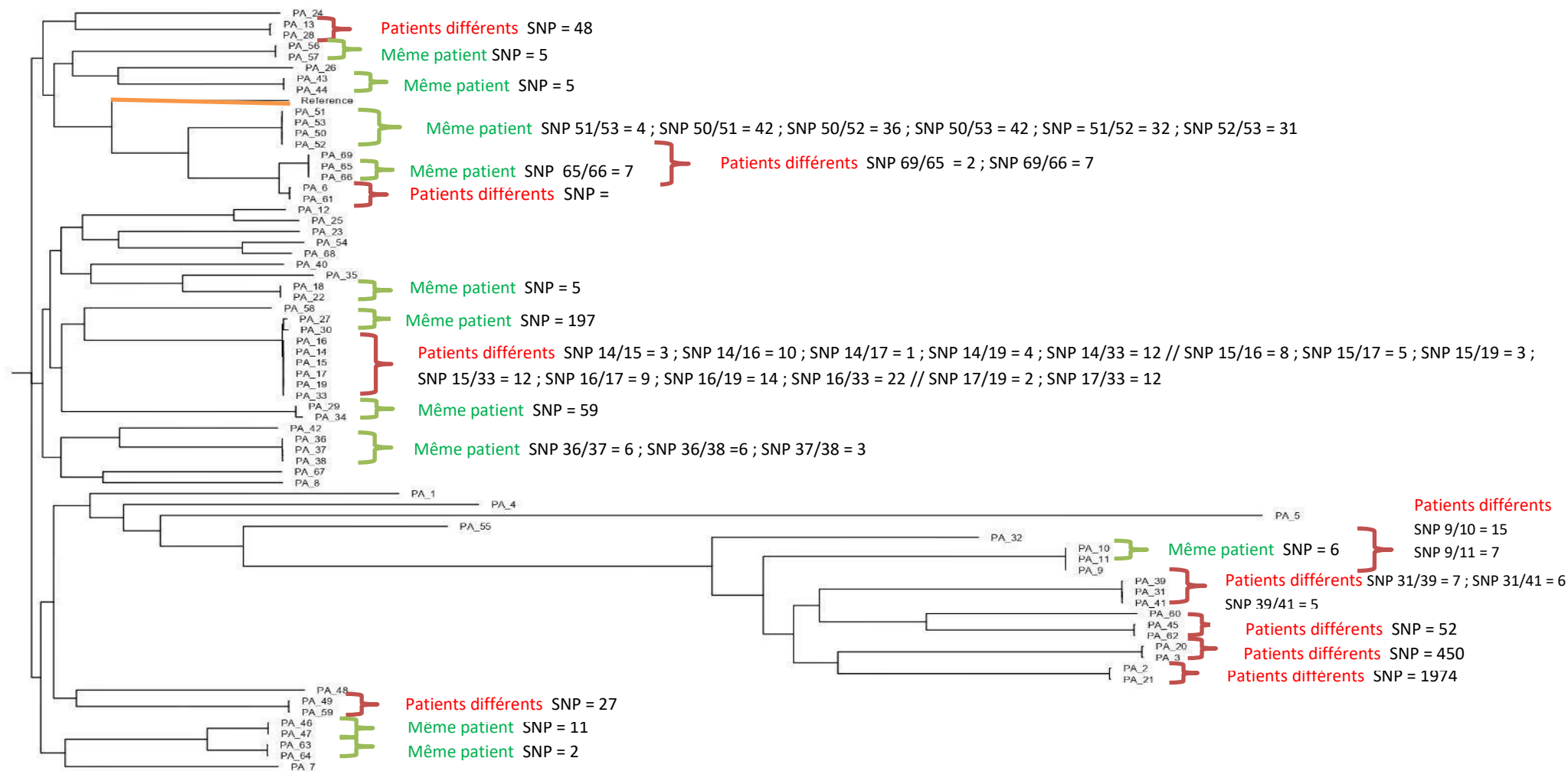


Figure 42 : Arbre phylogénétique de nos isolats séquencés généré par comparaison des SNP à la souche de référence PAO1

La séquence de référence PAO1 est représentée par un trait orange. Les isolats correspondant aux patients identiques sont représentés en vert, les isolats correspondant à des patients différents sont représentés en rouge.

III.3. Analyse génomique des gènes de résistance

La recherche de gènes de résistance acquis et des mutations chromosomiques a été comparée aux phénotypes de résistance retrouvés au laboratoire par CMI en milieu liquide ou par diffusion. Cette recherche de mutation a été faite en comparaison du génome de la souche de référence PAO1 qui possède un phénotype de résistance multi-sensible.

III.3.1. Les bêta-lactamines

Concernant les bêta-lactamines, nous avons obtenu 42 souches (61%) résistantes à la ticarcilline + acide clavulanique, 22 souches (32%) résistantes à la pipéracilline, 20 souches (29%) résistantes à la pipéracilline+tazobactam, 13 souches (19%) résistantes à la ceftazidime, 16 souches (23%) résistantes et une intermédiaire au céfépime, 10 souches (15%) résistantes et une intermédiaire à l'imipénème et 6 souches (9%) résistantes et 9 intermédiaires au méropénème. Sur les 33 souches ayant eu un antibiogramme pour le ceftazidime+avibactam 5 souches (7%) étaient résistantes et pour le ceftolozane+tazobactam 6 souches (9%) ont été retrouvées résistantes. (Figure 43)

III.3.1.1. Gènes de résistance acquis

Nous n'avons pas retrouvé de gènes de résistance acquis conférant une résistance phénotypiquement à partir de l'analyse CARD. D'où une focalisation de notre étude sur les mutations chromosomiques concernant les gènes de résistances aux bêta-lactamines.

III.3.1.2. Analyse des mutations des gènes impliqués dans la résistance aux bêta-lactamines

En premier lieu, nous avons étudié le gène *ampC*, codant pour la céphalosporinase PDC. Parmi nos isolats il y avait 19 PDC différentes retrouvées dont 14 PDC-3, 9 PDC-5, 9 PDC-8 et 7 PDC-1. Les différences de PDC sont liées à la présence de mutations sur le gène *ampC* ; nous en avons recensé 25 au total. L'ensemble des mutations sur le gène *ampC* sont observables sur la Figure 44 en comparaison avec l'arbre phylogénétique nous permettant d'observer des mutations similaires en fonction des embranchements phylogénétiques.

PDC-1 correspond à la céphalosporinase naturelle retrouvée chez PAO1. Sur nos 7 souches PDC-1 nous n'avons observé aucune mutation. Douze souches PDC-3 avaient uniquement la mutation T105A qui est la plus fréquemment observée et 2 souches PDC-3 avaient en plus la mutation S306F. Toutes nos souches PDC-5 avaient uniquement la mutation R79Q en plus de T105A. Huit de nos 9 souches PDC-8 avaient uniquement la mutation L176R en plus de T105A, à part une souche qui avait une troisième mutation R273K.

Concernant le gène *ampD* nous avons retrouvé 13 mutations différentes (Figure 45). La plus fréquente est la mutation G148A retrouvée chez 46 souches. Vingt de nos souches ne retrouvaient aucune mutation du gène *ampD*.

Concernant le gène *ampDh2*, nous avons retrouvé 4 mutations différentes (Figure 46). Seulement 6 souches ont une mutation dans ce gène.

Concernant le gène *ampDh3*, nous avons trouvé 7 mutations différentes (Figure 46). La plus fréquente est la mutation A219T retrouvés chez 33 souches.

Concernant le gène *ampR*, nous avons retrouvé 13 mutations différentes. Nous observons 44 souches sans aucune mutation pour ce gène (Figure 47).

Concernant le gène *dacB*, nous avons retrouvé 6 mutations différentes. La plus fréquente est la mutation A394P retrouvées chez 22 souches (Figure 48).

Pour l'ensemble de ces gènes, il ne semble pas y avoir de regroupement de mutations selon l'arbre phylogénétique et les ST.

III.3.1.3. Comparaison avec les données phénotypiques de l'antibiogramme

Au vu de la diversité des mutations et des régulations génotypiques il est quasiment impossible de prévoir les résistances phénotypiques à partir des mutations des principaux gènes de régulation de la céphalosporinase AmpC.

En effet lorsqu'on regarde nos isolats PA36, PA37 et PA38 appartenant au même patient, dont le sérotype, le ST et le PDC est similaire, nous observons exactement les mêmes mutations sur les gènes *ampC*, *ampD*, *ampDh2*, *ampDh3*, *ampR* et *dacB* pourtant les antibiogrammes sont totalement différents. Il n'a pas non plus été retrouvé de gène de résistance acquis entre chacun de ces isolats. L'isolat PA36 est sensible à tous les antibiotiques, l'isolat PA37 possède une résistance à la pipéracilline +/- tazobactam et à la ticarcilline +acide clavulanique alors que l'isolat PA38 possède une résistance à toutes les bêta-lactamines sauf la ceftazidime +/- avibactam.

De même lorsque l'on regarde des souches ayant des PDC similaires c'est-à-dire les mêmes mutations sur le gène *ampC*, nous retrouvons des résistances différentes et ceux même avec des mutations des gènes régulateurs d'*ampC* similaires.

La figure 43 permet d'observer cette diversité phénotypique de résistance en fonction des mutations.

La substitution D135N/G transforme AmpR en un activateur transcriptionnel constitutif de *blaPDC*, donnant potentiellement une résistance au ceftolozane/tazobactam, tout comme les variations R86C et G154R qui transforment MexR en un puissant activateur de l'expression de *blaPDC*. Notre souche PA33 possède cette mutation, mais elle est sensible à ceftolozane/tazobactam mais résistante à ceftazidime/avibactam.

De nombreuses résistances n'ont pas été abordé tel que l'hyperexpression des pompes à efflux ou la modification de la bêta-lactamase de type OXA. En effet pour notre souche PA13 résistante au céfépime avec une sensibilité à la ceftazidime, cela pourrait être lié à la surexpression de la pompe à efflux MexXY-OprM ou à la production de la bêta-lactamase de type OXA-30.

III.3.2. Fluoroquinolones

Concernant les fluoroquinolones, nous avons 55 souches (80%) sensibles aux fluoroquinolones, une souche sensible à la ciprofloxacine mais résistante à la lévofloxacine, et 13 souches (19%) résistantes aux deux antibiotiques.

III.3.2.1. Gènes de résistance acquis

Nous n'avons pas retrouvé de gènes de résistance acquis conférant une résistance phénotypiquement à partir de l'analyse CARD. D'où une focalisation de notre étude sur les mutations chromosomiques concernant les gènes de résistances aux fluoroquinolones.

III.3.2.2. Analyse des mutations des gènes impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones

Pour essayer de comprendre ces résistances nous avons en premier lieu étudié le gène *gyrA*, dont la mutation la plus fréquente est T83I, retrouvée chez 6 souches parmi les 7 ayant une mutation sur le gène *gyrA*. Toutes les souches ayant cette mutation sont résistantes aux quinolones. Une souche possède une mutation Isoleucine -> Acide aspartique en 783 sur *gyrA* mais ne confère pas de résistance car non localisé dans la région QRDR. Nous avons également étudié le gène *gyrB*, sur lequel deux mutations ont été retrouvées à savoir H58N et A360S. Soixante-deux souches ne trouvaient aucune mutation sur le gène *gyrA* et 65 souches n'avaient pas de mutation sur le gène *gyrB*.

Concernant le gène *parC*, 13 mutations différentes ont été retrouvées dont la plus fréquente est S87L. Quarante-deux souches ne présentaient pas de mutation du gène *parC*.

Concernant le gène *parE*, 4 mutations différentes ont été décrites dont D533E sur 18 souches.

A noter que tous les ST 235 sont résistants aux fluoroquinolones.

III.3.2.3. Comparaison avec les données phénotypiques de l'antibiogramme

Seule la mutation T83I de *gyrA* confère une résistance aux fluoroquinolones, celle-ci est d'autant plus importante lorsqu'elle est associée à une mutation *parC*.

Sur nos 6 souches ayant la mutation T83I de *gyrA*, toutes étaient associées à une mutation de *parC* dont 5 fois la mutation S87L, donnant lieu à des résistances de haut niveau rendues avec des CMI >4 pour la lévofloxacine et CMI >2 pour la ciprofloxacine et des résistances contacts avec le disque de ciprofloxacine, c'est-à-dire un diamètre de 6 mm.

Toutes les souches ayant une mutation sur le gène *gyrB* étaient sensibles.

Parmi les 36 souches ayant une mutation de *parC* ou *parE*, 30 étaient uniques, sans mutation de *gyrA*. Au sein de ces 30 souches, 27 étaient sensibles aux fluoroquinolones et 3 avaient une diminution de la sensibilité avec une CMI pour la lévofloxacine à 4 et une CMI pour la ciprofloxacine à 1. Les résistances aux fluoroquinolones non expliquées par la présence de mutations pourraient être dues à une diminution de la perméabilité de la paroi cellulaire et à des systèmes d'efflux multidrogues.

Par conséquent, aucune mutation unique *gyrB*, *parE* ou *parC* (sauf S87L) ne confère une sensibilité significativement réduite aux fluoroquinolones. La résistance aux fluoroquinolones est donc principalement due aux mutations T83I de *gyrA* et S87L de *parC*.

III.3.3. Les aminosides

Une très faible résistance aux aminosides a été observée avec seulement 6 souches résistantes (8,7%).

La recherche des résistances aux aminosides n'a mis en évidence que deux gènes *aadB* et *aadA1*, localisé sur un intégron de type 1 de la souche PA54, sur laquelle se trouvait également les gènes *qacE* et *sul1*(Annexe 2)

aadB confère une résistance à la gentamicine, la tobramycine et la kanamycine

aadA1 confère une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine

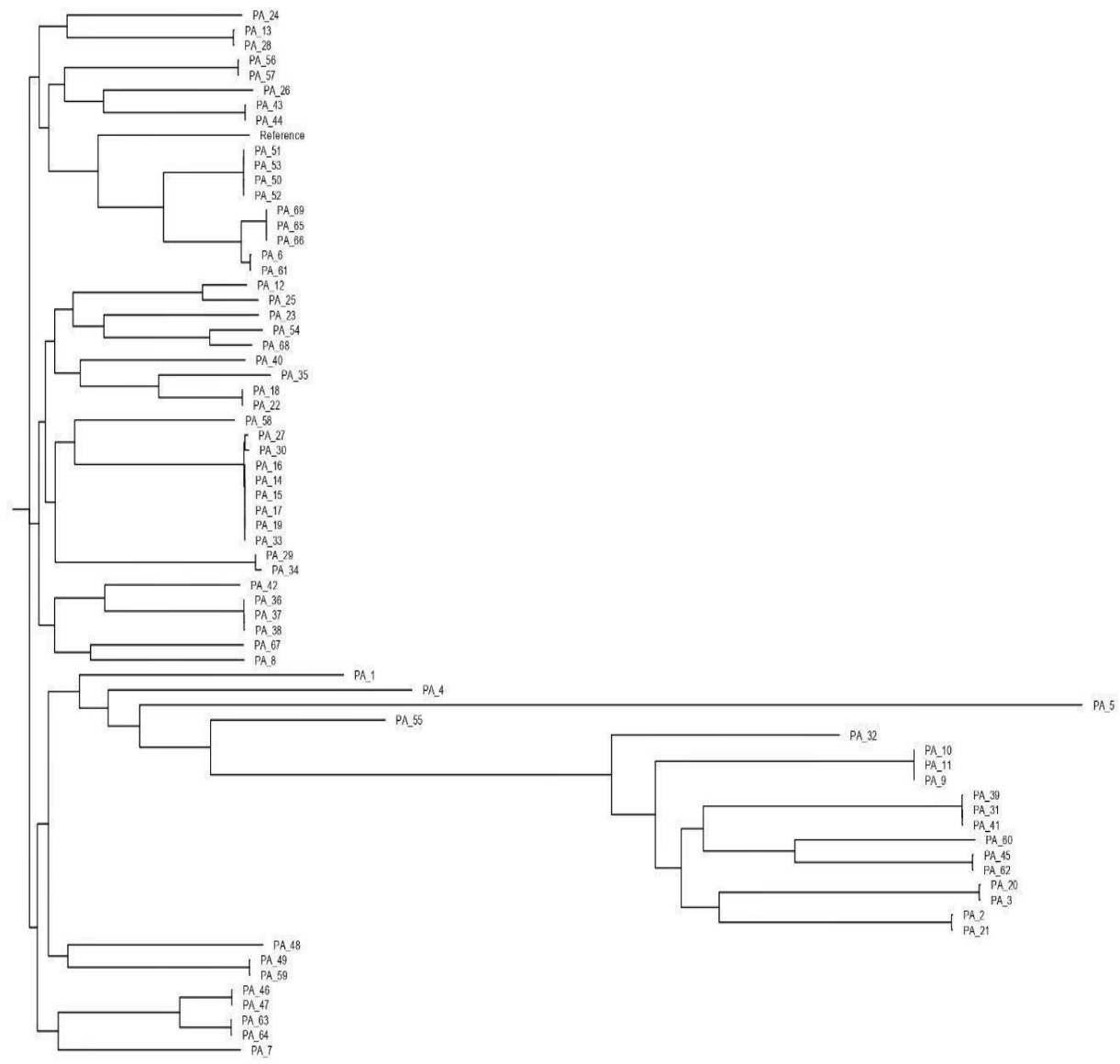
qacE confère une résistance aux ammonium quaternaires utilisé dans les désinfectants

sul1 confère une résistance aux sulfamides

En effet, notre souche PA54 observe phénotypiquement une résistance à la gentamicine et à la tobramycine avec des CMI > 8 et une sensibilité à l'amikacine avec une CMI à 4.

N° de souche	Antibiogramme sur Vitek (par CMI)										Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé																	
	t c c	p p p	t z z	t a a	f m m	i m m	g e e	t o o	a m m	l v v	c i i	c o l	t c c	t p p	t z z	a Z A	C / T	C a a	f t e	i m m	g e e	t o o	a m m	i p p	f o s			
1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S																
2	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	R	S													
3													S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R			
4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S													
5	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S													
6																												
7																												
8																												
9																												
10																												
11																												
12	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
13	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S													
14	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
15	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
16	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
17	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
18																												
19													R	R	R	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	
20													S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
21													S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
22													S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
23													R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S	R	R
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
25																												
26	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
27																												
28																												
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
30																												
31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
32	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
33																												
34	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
35	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
36																												
37	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S														
38																												
39																												
40	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
41																												
42																												
43																												
44																												
45																												
46	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
47	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S														
48	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
49	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
50	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S														
51	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S														
52	R	R	R	S	R	S	I	I	S	S	S	S	R	R	S													
53	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S														
54	R	R	R	S	I	S	R	R	R	R	S	R	R	S														
55	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S														
56	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
57	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
58	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
59	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S														
60	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
61	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
62	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
63																												
64																												
65																												
66																												
67	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S														
68																												
69	R	R	R	S	R	R	S	I	S	S	S	R	R	S														

Figure 43 : Phénotype de résistance de nos différentes souches ; tic : ticarcilline ; tcc : ticarcilline + acide clavulanique ; pip : pipéracilline ; tzp : pipéracilline+tazobactam ; taz : ceftazidime ; atm : aztréonem ; fep : céfépime ; imi : imipénème ; mem : méropénème ; gen : gentamicine ; tob : tpbramycine ; amk : amikacine ; cip : ciprofloxacine ; lev : lévofloxacine ; col : colistine ; fos : fosfomicine ; cza : ceftazidime+avibactam ; C/T : ceftolozane+tazobactam



Souches	Séro-groupe	Type de PDC	Mutation <i>ampC</i>																								
			R->G5	R->S7	T->A21	R->S29	G->D27	A->T56	A->T55	R->Q79	A->V97	T->A105	Q->L117	Q->R155	A->T170	L->R176	E->K198	L->I200	V->L205	G->S229	R->K273	P->L274	S->F306	L->P320	V->I356	G->A391	
PA-24	02	PDC-14																									
PA-13	06	PDC-8																									
PA-28	06	PDC-8																									
PA-56	05	PDC-3																									
PA-57	05	PDC-3																									
PA-26	02	PDC-5																									
PA-43	02	PDC-8																									
PA-44	02	PDC-8																									
REF	05	PDC-1																									
PA-51	05	PDC-3																									
PA-53	05	PDC-3																									
PA-50	05	PDC-3																									
PA-52	05	PDC-3																									
PA-69	05	PDC-1																									
PA-65	05	PDC-1																									
PA-66	05	PDC-1																									
PA-6	02	PDC-1																									
PA-61	05	PDC-1																									
PA-12	06	PDC-5																									
PA-25	06	PDC-8																									
PA-23	04	PDC-44																									
PA-54	04	PDC-1																									
PA-68	06	PDC-1																									
PA-40	06	PDC-3																									
PA-35	06	PDC-5																									
PA-18	06	PDC-5																									
PA-22	06	PDC-5																									
PA-58	06	PDC-5																									
PA-27	01	PDC-15																									
PA-30	01	PDC-15																									
PA-16	01	PDC-15																									
PA-14	01	PDC-15																									
PA-15	01	PDC-15																									
PA-17	01	PDC-15																									
PA-19	01	PDC-15																									
PA-33	01	PDC-15																									
PA-29	04	PDC-3																									
PA-34	04	PDC-3																									
PA-42	03	PDC-147																									
PA-36	03	PDC-8																									
PA-37	03	PDC-8																									
PA-38	03	PDC-8																									
PA-67	03	PDC-24																									
PA-8	03	PDC-8																									
PA-1	07	PDC-5																									
PA-4	05	PDC-56																									
PA-5	03	PDC-66																									
PA-55	011	PDC-218																									
PA-32	011	PDC-19a																									
PA-10	011	PDC-35																									
PA-11	011	PDC-35																									
PA-9	011	PDC-35																									
PA-39	011	PDC-16																									
PA-31	011	PDC-16																									
PA-41	011	PDC-16																									
PA-60	01	PDC-37																									
PA-45	01	PDC-30																									
PA-62	01	PDC-30																									
PA-20	010	PDC-34																									
PA-3	010	PDC-34																									
PA-2	011	PDC-19a																									
PA-21	011	PDC-19a																									
PA-48	06	PDC-60																									
PA-49	05	PDC-5																									
PA-59	02	PDC-5																									
PA-46	01	PDC-3																									
PA-47	01	PDC-3																									
PA-63	01	PDC-3																									
PA-64	01	PDC-3																									
PA-7	011	PDC-3																									

Figure 44 : Représentation des mutations d'*ampC* en fonction de la phylogénie des souches 98



Souches	Mutation ampD												
	H -> L	W -> R	R -> L	Q -> H	G -> S	A -> G	W -> R	A -> V	G -> A	E -> G	S -> L	T -> A	D -> Y
PA_24	2	9	11	44	46	85	97	134	148	170	175	179	183
PA_13													
PA_28													
PA_56													
PA_57													
PA_26													
PA_43													
PA_44													
REF													
PA_51													
PA_53													
PA_60													
PA_62													
PA_69													
PA_65													
PA_66													
PA_6													
PA_61													
PA_12													
PA_25													
PA_23													
PA_54													
PA_68													
PA_40													
PA_35													
PA_18													
PA_22													
PA_68													
PA_27													
PA_30													
PA_16													
PA_14													
PA_15													
PA_17													
PA_19													
PA_33													
PA_29													
PA_34													
PA_42													
PA_36													
PA_37													
PA_38													
PA_67													
PA_8													
PA_1													
PA_4													
PA_55													
PA_32													
PA_10													
PA_11													
PA_9													
PA_39													
PA_31													
PA_41													
PA_60													
PA_45													
PA_62													
PA_20													
PA_3													
PA_2													
PA_21													
PA_48													
PA_49													
PA_59													
PA_46													
PA_47													
PA_63													
PA_64													
PA_7													

Figure 45 : Représentation des mutations *d'ampD* en fonction de la phylogénie des souches



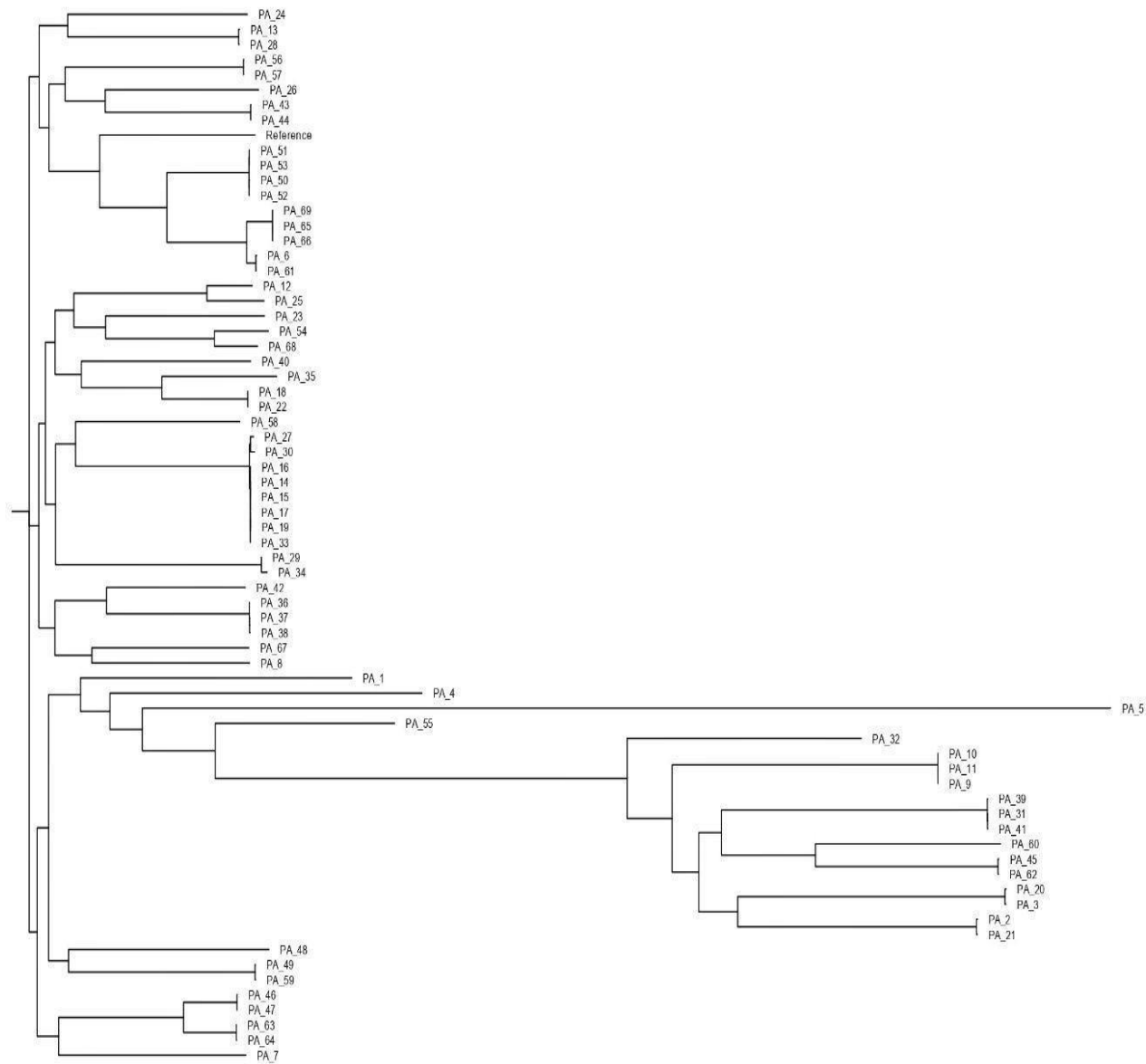
Souches	Mutation ampD2				Mutation ampD3						
	V -> D 89	V -> I 40	T -> I 101	T -> S 115	R -> C 66	I -> T 67	K -> N 154	D -> E 197	A -> V 208	A -> T 219	D -> G 235
PA-24											
PA-13											
PA-28											
PA-56											
PA-57											
PA-26											
PA-43											
PA-44											
REF											
PA-51											
PA-53											
PA-50											
PA-52											
PA-69											
PA-65											
PA-66											
PA-6											
PA-61											
PA-12											
PA-25											
PA-23											
PA-54											
PA-23											
PA-54											
PA-68											
PA-40											
PA-35											
PA-18											
PA-22											
PA-58											
PA-27											
PA-30											
PA-16											
PA-14											
PA-15											
PA-17											
PA-19											
PA-33											
PA-29											
PA-34											
PA-42											
PA-36											
PA-37											
PA-38											
PA-67											
PA-8											
PA-1											
PA-4											
PA-5											
PA-55											
PA-32											
PA-10											
PA-11											
PA-9											
PA-39											
PA-31											
PA-41											
PA-60											
PA-45											
PA-62											
PA-20											
PA-3											
PA-2											
PA-21											
PA-48											
PA-49											
PA-59											
PA-46											
PA-47											
PA-63											
PA-64											
PA-7											

Figure 46 : Représentation des mutations d'ampD2 et D3 en fonction de la phylogénie des souches



Souches	Mutation ampR												
	E -> A 114	D -> N 135	R -> W 244	I -> V 251	G -> E 283	E -> G 287	M -> R 288	A -> V 290	V -> L 291	A -> S 293	R -> E 294	G -> A 295	R -> Q 296
PA-24													
PA-13													
PA-28													
PA-56													
PA-57													
PA-26													
PA-43													
PA-44													
REF													
PA-51													
PA-53													
PA-50													
PA-52													
PA-69													
PA-65													
PA-66													
PA-6													
PA-61													
PA-12													
PA-25													
PA-23													
PA-54													
PA-68													
PA-40													
PA-35													
PA-18													
PA-22													
PA-58													
PA-27													
PA-30													
PA-16													
PA-14													
PA-15													
PA-17													
PA-19													
PA-33													
PA-29													
PA-34													
PA-42													
PA-36													
PA-37													
PA-38													
PA-67													
PA-8													
PA-1													
PA-4													
PA-5													
PA-55													
PA-32													
PA-10													
PA-11													
PA-9													
PA-39													
PA-31													
PA-41													
PA-60													
PA-45													
PA-62													
PA-20													
PA-3													
PA-2													
PA-21													
PA-48													
PA-49													
PA-59													
PA-46													
PA-47													
PA-63													
PA-64													
PA-7													

Figure 47 : Représentation des mutations d'ampR en fonction de la phylogénie des souches



Souches	Mutation <i>dacB</i>					
	Y->H 61	Q->H 156	A->V 358	A->P 394	L-> P 429	A-> T 474
PA-24				■		
PA-13						
PA-28						
PA-56				■		
PA-57				■		
PA-26						■
PA-43						
PA-44						
Reference						
PA-51						
PA-53						
PA-50						
PA-52						
PA-69						
PA-65						
PA-66						
PA-6						
PA-61						
PA-12						
PA-25						
PA-23						
PA-54						
PA-68						
PA-40						
PA-35				■		
PA-18						
PA-22						
PA-58						
PA-27				■		
PA-30				■		
PA-16				■		
PA-14				■		
PA-15				■		
PA-17				■		
PA-19				■		
PA-33				■		
PA-29				■		
PA-34				■		
PA-42				■		
PA-36				■		
PA-37				■		
PA-38				■		
PA-67				■		
PA-8				■		
PA-1						
PA-4				■		
PA-5				■		
PA-55				■		
PA-32				■		
PA-10						■
PA-11						
PA-9						
PA-39						
PA-31						
PA-41						
PA-60						
PA-45						
PA-62						
PA-20		■				
PA-3						
PA-2						
PA-21						
PA-48	■					
PA-49						
PA-59				■		
PA-46						
PA-47						
PA-63						
PA-64						
PA-7						

Figure 48 : Représentation des mutations de *dacB* en fonction de la phylogénie des souches



Souches	Mutation <i>gyrA</i>		Mutation <i>gyrB</i>		Mutation <i>ParE</i>				Mutation <i>ParC</i>													
	T->I	I->D	H->N	A->S	I->V	V->M	A->V	D->E	S->L	R->H	L->Q	S->L	H->Q	S->T	Q->R	P->S	E->D	A->T	V->L	I->V	P->T	
	83	783	58	360	57	200	473	533	87	134	168	197	262	331	405	506	513	587	646	679	752	
PA-24																						
PA-13																						
PA-28																						
PA-56																						
PA-57																						
PA-26																						
PA-43																						
PA-44																						
Reference																						
PA-51																						
PA-53																						
PA-50																						
PA-52																						
PA-09																						
PA-05																						
PA-06																						
PA-0																						
PA-01																						
PA-12																						
PA-25																						
PA-23																						
PA-54																						
PA-68																						
PA-40																						
PA-35																						
PA-18																						
PA-22																						
PA-58																						
PA-27																						
PA-30																						
PA-16																						
PA-14																						
PA-15																						
PA-17																						
PA-19																						
PA-33																						
PA-29																						
PA-34																						
PA-42																						
PA-36																						
PA-37																						
PA-38																						
PA-67																						
PA-8																						
PA-1																						
PA-4																						
PA-5																						
PA-32																						
PA-10																						
PA-11																						
PA-9																						
PA-39																						
PA-31																						
PA-41																						
PA-60																						
PA-45																						
PA-62																						
PA-20																						
PA-3																						
PA-2																						
PA-21																						
PA-48																						
PA-49																						
PA-59																						
PA-46																						
PA-47																						
PA-63																						
PA-64																						
PA-7																						

Figure 49 : Représentation des mutations de *gyrA*, *gyrB*, *parE* et *parC* en fonction de la phylogénie des souches

III.4. Analyse génomique des facteurs de virulence

La présence de 238 gènes de virulences (Annexe 3) a été étudiée appartenant aux protéines d'adhésion ou de motilité (pili, flagelle...), aux protéines permettant la colonisation de l'hôte (phospholipases, rhamnolipides, exotoxines A...), à la synthèse du biofilm (alginate...), à la récupération du fer (pyoverdine, pyochéline...) ou encore aux toxines (exotoxines).

La Figure 50 (shade plot de tous les gènes de virulence) représente sous forme de Shade plot la présence ou l'absence des différents gènes de virulence pour l'intégralité de nos isolats. La plupart des gènes recherchés sont présents ou absents dans l'intégralité de nos souches car appartenant au core-génome. Certains gènes sont isolément absents de certaines souches comme décrit ci-dessous, pouvant être soit une réelle absence soit un défaut d'assemblage des *reads* en contig supprimant un gène.

Sur les quarante-six gènes codant le flagelle tous sont logiquement présents sur toutes les souches à part le gène *fliD* codant pour le filament du flagelle qui est absent chez 4 souches : PA23, PA27, PA30 et PA37.

Trente-quatre gènes codent le pili de type IV, tous les gènes nécessaires à la motilité de traction de type « twitching » étaient présent chez toutes les souches. Contrairement aux gènes utiles à la biosynthèse du pili IV tel que *fimT*, *fimU*, *pilA*, *pilC*, *pilE*, *pilV*, *pilW* et *pilY*, absent chez certaines souches. Le gène *pilA* codant pour la principale sous unité de la pilline n'était présent que chez 6 souches : PA12, PA19, PA51, PA65 et PA66. On remarque l'absence des gènes sur les mêmes souches en effet l'absence de *fimU* est souvent associé à l'absence de *pilV* et de *pilW*. Cela pourrait être expliqué par la présence de ces gènes sur le même opéron.

Vingt-cinq gènes codent l'alginate. Tous les gènes codant la biosynthèse de l'alginate sont présents sur toutes nos souches sauf *algF* absente des souches de PA23, PA27 et PA64 et le gène *algI* absente chez 28 souches. Tous les gènes codant pour la régulation de l'alginate sont également présents chez toutes nos souches sauf *mucE* absent de la souche PA5 et le gène *algP* absent chez 50 souches.

Trois gènes codent les rhamnolipides. Toutes les souches possèdent ces gènes sauf la souche PA54 qui ne possède pas les gènes de biosynthèse de rhamnolipides.

Trois gènes codent la phospholipase C. Ils sont présents chez toutes nos souches. Mais le gène codant pour la phospholipase D *pldA* a été confirmé absent chez 48 souches.

Onze gènes codent la pyochéline. Les gènes *pchA*, *pchB*, *pchD*, *pchH* et *pchR* sont retrouvées chez toutes les souches. De même, dix-sept gènes codent la pyoverdine. Ils sont tous présent chez toutes nos souches sauf le gène *pvdD* absent chez 18 souches et le gène *pvdY* absent chez 5 souches.

Deux gènes codent l'elastase. Ils sont présents chez toutes nos souches sauf le gène *lasA* absent chez la souche PA68.

Un gène code la protéase IV, présent chez nos 69 souches.

Cinq gènes codent le quorum sensing. Ils sont tous présents sauf les gènes *rhIL* et *rhIR* chez la souche PA54.

Quatre gènes codent les exotoxines. Le gène *exoT* présent chez toutes les souches, *exoY* présent chez 66 souches, *exoS* présent chez 55 souches et *exoU* présent chez 14 souches.

Trente-six gènes codent les systèmes de sécrétion. Ils sont tous présents chez toutes nos souches sauf *exsE*, régulateur négatif de l'expression des gènes de sécrétion de type III, absent chez les souches PA3, PA8, PA9, PA20 et PA39.

Le gène *toxA* qui code l'exotoxine A, est présent chez toutes les souches sauf la souche PA5.



Figure 50 : Shade plot des gènes codant les principaux facteurs de virulence retrouvés chez *P. aeruginosa*

La cartographie complète de tous les gènes de virulence nous permet d'observer une présence majeure des gènes de virulence chez toutes les souches.

Afin de mieux visualiser la répartition des gènes de virulence, l'intégralité des profils de virulence ont été représentés sous forme de graphique dans la Figure 51 grâce à une analyse en composante principale (PCoA). Nous pouvons ainsi observer qu'il n'y a pas de corrélation nette entre profil de virulence et ST. En revanche, nous pouvons observer que certains gènes de virulence permettent de discriminer nos isolats. C'est particulièrement le cas des gènes *exoU* et *pldA* régulièrement associés sur nos isolats. A contrario, les isolats *exoS* positifs ne sont pas porteurs des gènes *exoU* ou *pldA*.

Par ailleurs les gènes du pili (*pilC*, *pilY2*, *pilV*, *pilW* et *pilE*) permettent également de discriminer la répartition de nos isolats.

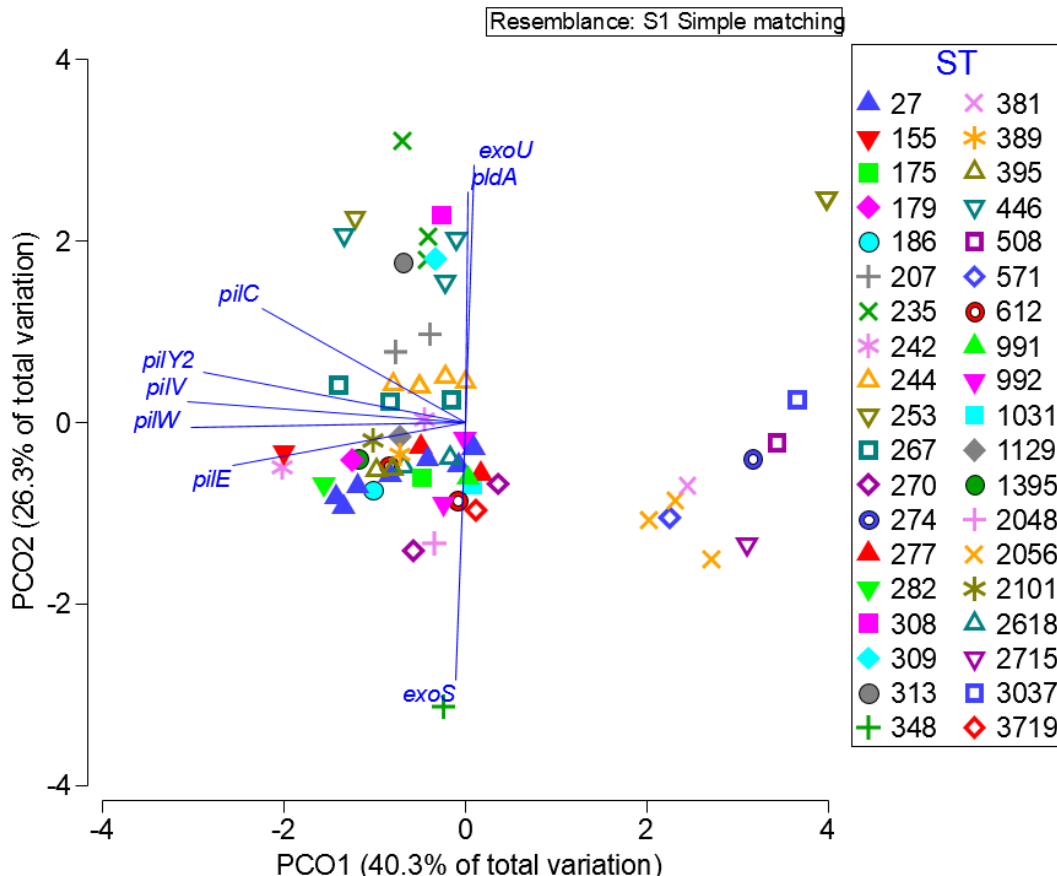


Figure 51 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) de l'ensemble des facteurs de virulence de toutes nos souches

Le PCoA permet de disposer en 2D la distribution de toutes nos souches dans autant de dimensions qu'il y a de gènes de virulence. Chaque point représente un isolat et chaque symbole un ST différent. Les gènes représentés en bleu sont ceux ayant permis la séparation des isolats et pour lesquels une corrélation de Pearson $> 0,7$ a été retrouvée (Figure 51).

La présence du gène *exoU* ou *exoS* semble particulièrement discriminante dans la répartition des isolats. Nous avons donc essayé de corréler le sérotype au type de gènes appartenant au complexe des toxines sécrétées par le SST3 (Tableau 4). La majorité des souches O11 possèdent le gène *exoU* tandis que toutes nos souches O2, O3, O4, O5, O6 et O7 sont de génotype *exoS*.

Tableau 4 : Sérotypes de l'antigène LPS O et phénotypes des toxines TTS3 dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa*

Type d'antigène O (nombre d'isolats)	Nombre (%) d'isolats avec phénotype :			
	ExoU +	ExoS +	ExoY +	ExoT +
O1 (n=15)	3 (20%)	12 (80%)	15 (100%)	15 (100%)
O2 (n=6)	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
O3 (n=7)	0 (0%)	7 (100%)	6 (86%)	7 (100%)
O4 (n=4)	0 (0%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
O5 (n=12)	0 (0%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)
O6 (n=11)	0 (0%)	11 (100%)	10 (91%)	11 (100%)
O7 (n=1)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
O10 (n=2)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)
O11 (n=11)	9 (82%)	2 (18%)	10 (91%)	11 (100%)

III.5. Impact de la virulence dans la survenue de PAVM

L'objectif final de ce travail consiste à associer les profils de virulence retrouvés sur nos différents isolats aux issues cliniques des patients porteurs de ces isolats au niveau respiratoire et en particulier, sur la survenue d'une PAVM. A noter que toutes les trachéobronchites ont été incluses dans le groupe « non PAVM ».

Nous avons premièrement analysé la répartition des PAVM en fonction du sérotype bactérien (Tableau 5). Les isolats du sérotype O10 sont plus fréquemment isolés dans le groupe « PAVM » tandis que les isolats du groupe O1 et O11 sont plus fréquemment isolés dans le groupe « non PAVM ».

Tableau 5 : Distribution des différents sérotypes retrouvés dans le groupe PAVM et non PAVM

Sérotipe	PAVM	Non PAVM
O1	6 (28,6%)	6 (17,6%)
O2	0	5 (14,7%)
O3	2 (9,5%)	3 (8,8%)
O4	1 (4,8%)	3 (8,8%)
O5	1 (4,8%)	5 (14,7%)
O6	3 (14,3%)	6 (17,6%)
O7	1 (4,8%)	0
O10	1 (4,8%)	1 (2,9 %)
O11	6 (28,6%)	5 (14,7%)

La séparation des isolats selon le facteur PAVM/non PAVM n'a pas permis de voir de réelle différence dans le profil global de virulence des isolats (Figure 52). Cela a été confirmé pour

la quasi-totalité des gènes de virulence par analyse individuelle (Figure 53), la majeure partie des facteurs de virulence étant systématiquement présents ou absents.

La distribution du PCoA de la figure 52 ne montre pas de réelle différence concernant les souches provoquant une PAVM. En ce qui concerne les souches non PAVM nous avons une distribution qui tend un peu plus vers le bas du côté du gène de virulence *exoS*.

Néanmoins, trois facteurs de virulence ont montré des différences significatives entre nos deux populations. Sans surprise, les gènes *exoS* et *exoU* sont significativement associés au groupe non PAVM et PAVM respectivement ($p=0.008$). De même, le gène *algP/algR3* est plus fréquemment présent dans le groupe PAVM ($p=0.041$). Ainsi, les isolats issus des voies respiratoires de patients développant une PAVM présentent plus fréquemment les gènes *exoU* et *algP/algR3*.

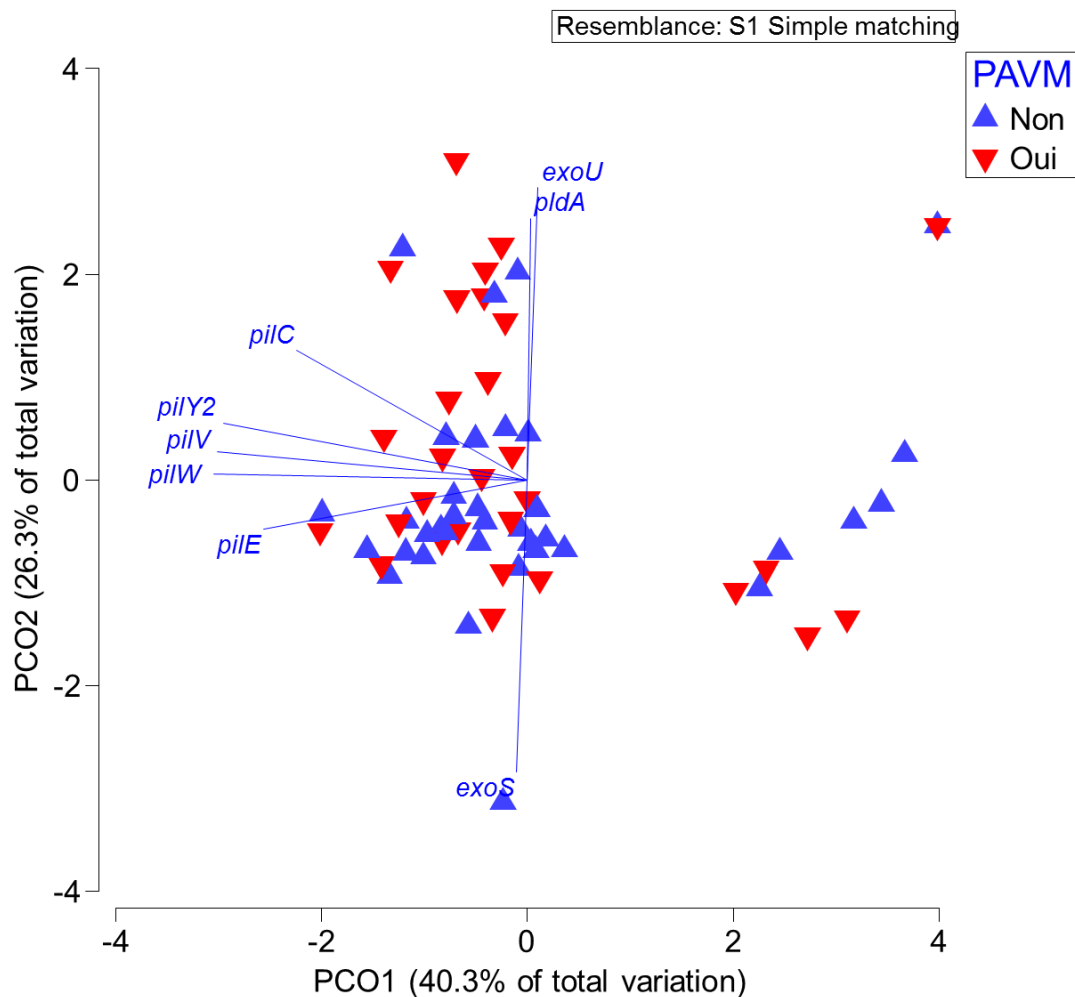


Figure 52 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) des facteurs de virulences de nos souches provoquant une PAVM ou non

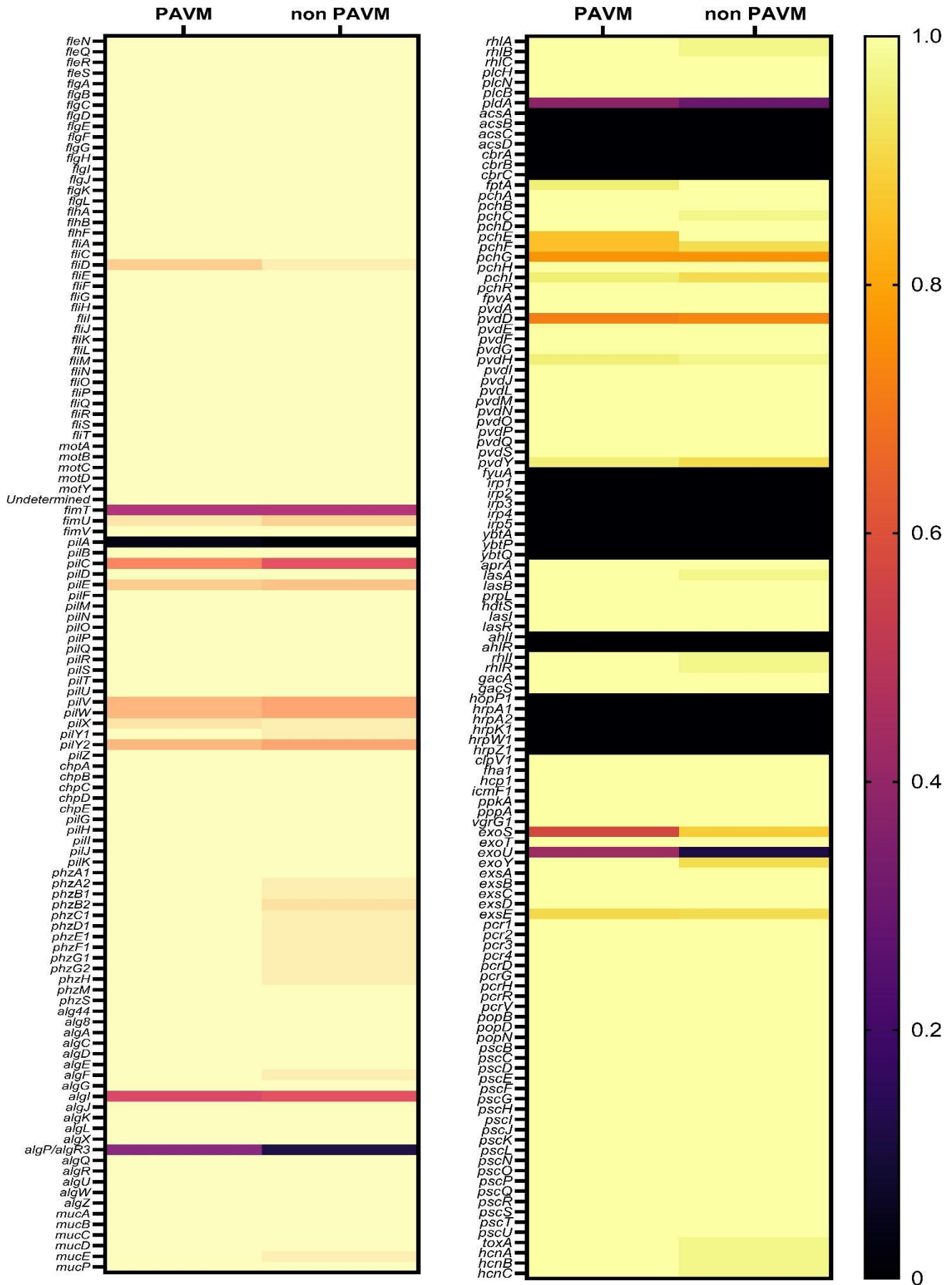


Figure 53 : Carte de chaleur représentant la présence des facteurs de virulence sur le groupe PAVM et non PAVM

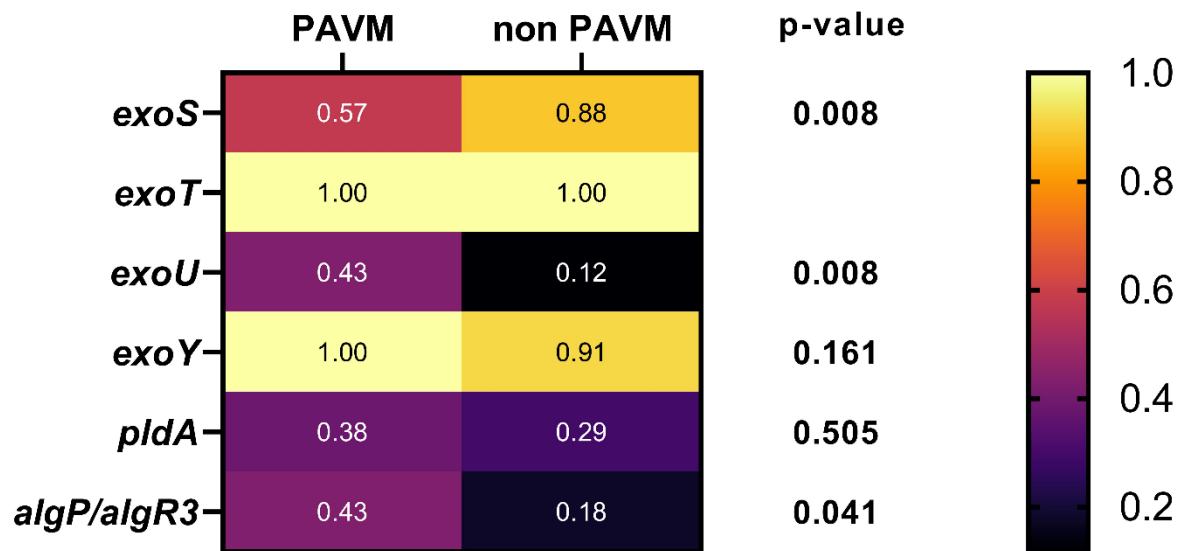


Figure 54 : Focus sur la distribution des gènes des exotoxines, de *pldA* et de *algP* dans les groupes PAVM et non PAVM

III. Discussion

Le séquençage haut débit des souches bactériennes (ou Whole genome sequencing) est une avancée technologique ayant permis d'améliorer la compréhension du génome bactérien. Au-delà de l'étude des souches bactériennes, cette technologie nous permet de faciliter l'identification et la différenciation des microorganismes, la découverte de nouveaux microorganismes émergents, l'élucidation des facteurs de virulence et des marqueurs de résistance, les caractéristiques de la réponse de l'hôte et de la thérapie administrée, et également la détection d'une épidémie ou le suivi des souches et la surveillance du contrôle des infections hospitalières.

Les diagnostics moléculaires actuels des agents pathogènes humains fournissent des informations limitées qui ne sont souvent pas suffisantes pour les enquêtes sur les épidémies et la transmission clonale. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) détermine la séquence d'ADN d'un génome bactérien complet en une seule séquence, et à partir de ces données, les informations sur la résistance et la virulence, ainsi que les informations sur le typage sont obtenues. Les coûts d'investissement et de fonctionnement du NGS ont considérablement diminué au cours de la dernière décennie. Cela lui permet de prendre de plus en plus de place dans les laboratoires, notamment sur la technique Sanger qui été largement utilisée pendant plusieurs années. Ce remplacement est principalement dû aux nombreuses qualités du NGS qui est un processus rapide, plus précis et plus rentable pouvant être exécuté avec un échantillon de petite taille. (148)

La qualité des données génomiques générées est primordiale pour les analyses et les résultats qui en découlent. Le nombre total de *reads* de qualité, la profondeur du séquençage et la qualité de l'assemblage pour reconstruire de manière la plus identique le génome sont les principaux paramètres à maîtriser. Nos analyses ont permis de générer un nombre important de *reads* et une profondeur de séquençage suffisamment grande pour affirmer une bonne qualité de séquençage. En effet la grande majorité de nos isolats avait une profondeur supérieure à 50X, suffisant pour détecter l'intégralité des gènes avec une séquence la plus fidèle possible à la séquence originelle. Le nombre d'insertions et de suppressions de nucléotides détectées augmente rapidement jusqu'à une couverture de 20X et on obtient un plateau après une couverture de 50X avec très peu de nouvelles variations génomiques détectées, permettant alors une bonne analyse représentative. (149) Les trois souches n'ayant pas atteint une profondeur de séquençage supérieure à 50X pourrait éventuellement être re-séquencées ultérieurement tout comme celles n'ayant pas une qualité d'assemblage satisfaisante pour confirmer les résultats de résistance et de virulence obtenus.

Le WGS est un outil important pour comprendre l'évolution microbienne et identifier l'émergence de variant au cours des épidémies. Il offre le plus haut niveau de discrimination des souches bactériennes pour les enquêtes sur les épidémies d'origine alimentaire et l'attribution des sources, ainsi qu'un potentiel d'identification plus précis des dangers, facilitant ainsi une évaluation et une gestion des risques plus ciblées. Notre étude a effectivement mis en évidence une proximité phylogénétique de certaines souches issues de mêmes patients mais également de patients différents. L'analyse des SNP a permis de confirmer que plusieurs micro-épidémies ont eu lieu dans le service de Réanimation polyvalente du CHU de Limoges. En effet, un faible nombre de SNP a été retrouvé entre ces souches phylogénétiquement

proches, notamment pour les souches ayant une différence inférieure à 26 SNP (150) bien que le cut-off de SNP permettant de différencier deux clones ne fasse actuellement consensus. En effet, certaines études rapportent un seuil à 5 SNP, d'autres à 20 ou encore à 50. Cela varie fortement en fonction du temps écoulé entre l'isolement de deux souches ou encore en fonction de l'espèce bactérienne, de la taille de son génome ou de sa plasticité génomique. Par analogie avec l'approche de typage de séquences multilocus (MLST), basée sur l'extraction de sept gènes domestiques, des études ont développé grâce au WGS le typage des séquences multilocus du génome central (cgMLST) basées sur la comparaison de milliers de gènes cibles prédéfinis, ayant un pouvoir discriminant encore plus élevé que le MLST mais moindre que l'analyse des SNP. (6) Néanmoins cette analyse n'a pas été réalisée dans notre étude, nous avons préféré analyser directement les SNP pour être encore plus discriminant.

Dans l'idéal, les isolats de *P. aeruginosa* retrouvés dans l'environnement à l'hôpital et isolées par le laboratoire d'Hygiène devraient être séquencées, pour pouvoir les confronter aux éventuels isolats cliniques et ainsi affirmer la source de transmission. Les analyses d'Hygiène ont montré que le robinet de la chambre 53 du service de Réanimation était contaminé par du *P. aeruginosa* avec un isolement en Janvier 2019, Mai 2019, Juillet 2019 et Juin 2021. Cela pourrait être l'origine de notre souche PA59 isolée chez un patient hospitalisé dans cette chambre le 30/07/2020 ou encore de notre souche PA25 isolée chez un patient hospitalisé dans cette chambre du 07/04 au 09/05/2021. De même, au niveau de la salle de bain commune du lit/douche du service de Réanimation où du *P. aeruginosa* a été isolé le 19/11/2019, le 04/04/2021, le 04/06/2021 et le 08/06/2022. Malheureusement ces isolats environnementaux n'ont pas pu être récupérés et séquencés pour comparaison. Cela nous aurait permis de savoir si les isolats cliniques et environnementaux étaient génétiquement proches. Une comparaison génomique avec les souches isolées chez des patients ayant utilisés cette salle de bain lors de leur hospitalisation serait également très intéressant.

L'utilisation du NGS permet de mieux caractériser les isolats, et nous apporte des informations sur l'influence de la présence des gènes de virulence sur la clinique ou encore des gènes de résistance sur les phénotypes de résistance aux antibiotiques. Bien que son épidémiologie soit majoritairement considérée comme non clonale,(151) certains clones internationaux multirésistants à haut risque ont été reconnus tel que le ST235, émergeant en 1984 qui coïncide avec le début de l'utilisation des fluoroquinolones anti-pseudomonales. Ce ST est le plus répandu internationalement et il est responsable d'infections graves aiguës. Bien qu'elle ne soit pas entièrement spécifique de ce clone, l'exotoxine codée par le gène *exoU* a été identifiée dans tous les isolats ST235.(151) Ce ST235 s'est répandu à travers le monde potentiellement en raison de la pression sélective des fluoroquinolones et est facilement devenu résistant aux aminoglycosides, aux β -lactamines et aux carbapénèmes. Trois souches de notre étude, correspondant à 2 patients, ont été identifiées comme appartenant au ST235 comportant toutes ces caractéristiques de résistance et de virulence. Effectivement nos souches ST235, comme décrit dans la littérature, présentent une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, causée par l'association de mutation T83I de *gyrA* et de la mutation S87L de *parC*. Nous avons également observé une résistance de toutes les bêta-lactamines probablement due à l'hyperproduction mutation dépendante de la β -lactamase intrinsèque AmpC.

Des études ont montré que les isolats appartenant aux sérotypes O1, O6, O11 et O12 représentent plus de 65 % des infections à *P. aeruginosa*, avec une prédominance de O1, O6 et O11 qui représentent environ 50% des souches circulantes de *P. aeruginosa* dans le monde entier. (152) Parmi nos 69 souches 37 sont représentées par O1, O6 et O11 soit 54%. Les isolats des sérotypes O4 et O12 sont plus fréquemment associés à la résistance à diverses classes d'antibiotiques. (153) Nous avons trouvé qu'une souche O4 sur les 4 était MDR. Les données de sérotypage indiquent que les isolats des sérotypes O6 et O11 sont les sérotypes les plus présents dans les pneumonies à *P. aeruginosa*.(54) Sur nos 22 souches O6 et O11, 10 sont responsables de PAVM (4 O6 et 6 O11). Mais les sérotypes les plus responsables des PAVM dans notre étude sont les sérotypes O1 et O11 responsable de 28,6% des PAVM chacun contre 14,3 % causée par O6. L'étude menée par Lu *et al* a montré une relation entre l'évolution clinique de la pneumonie et les sérotypes de *P. aeruginosa*. Le sérotype O1 était associé à une mortalité plus grande, nous avons observé qu'un décès chez un patient ayant eu une PAVM à une souche O1, mais ces résultats sont à relativiser du fait de la difficulté d'imputabilité à associer un décès à une seule étiologie précise. Des études antérieures ont également montré que certains sérotypes sont plus virulents que d'autres, par exemple, les isolats cliniques du sérotype O11 se sont avérés sécréter l'exotoxine ExoU signe de forte virulence, alors que le sérotype O6 était associé à un phénotype ExoU négatif. Effectivement 82% de nos souches O11 étaient porteuses du gène *exoU+*, et 100% de nos souches O6 ne présentaient pas le gène *exoU* mais le gène *exoS*.

P. aeruginosa concentre toute une armada de mécanisme pour détruire son hôte, en plus des systèmes de sécrétions on lui retrouve d'autres facteurs importants tels que la pyocyanine, l'elastase, la protease IV permettant à la bactérie de détruire les tissus de l'hôte, de moduler le système immunitaire, de créer des biofilms et d'initier le processus de colonisation. Tout en ayant une grande capacité de se mouvoir au niveau des voies respiratoires grâce au flagelle et aux pili de type IV. Tous ces facteurs de virulence étaient dans l'ensemble présents chez toutes nos souches. Peu de facteurs de virulence permettent de discriminer les isolats entre eux, la quasi-totalité faisant partie intégrante du core-génome. Il n'y a pas non plus d'association claire entre ST et profil de virulence comme cela a pu être démontré pour d'autres bactéries telle que *S. aureus*.(154) Quelques gènes n'ont pas pu être isolés chez certaines souches alors que la totalité des autres isolats les possèdent. Ces absences peuvent être dues à de véritables pertes de gènes ou bien à des erreurs de couverture de séquençage (gène non séquencé), d'assemblage ou de détection par les logiciels utilisés. Une confirmation par PCR spécifique peut-être envisagée pour s'assurer de l'absence du gène.

P. aeruginosa a une emprise sur les cellules hôtes eucaryotes à travers des effecteurs sécrétés par les systèmes de sécrétion notamment des toxines délivrées par le système de sécrétion de type III. Le T3SS est l'un des principaux facteurs de virulence et est associée à une mauvaise évolution clinique et une mortalité accrue. (155)

Nous avons retrouvé, parmi nos 69 souches 20,3% d'isolats porteurs du gène *exoU*, 79,7% d'*exoS*, 95,7% d'*exoT* et 100% d'*exoY*. Une corrélation inverse a été observée entre la présence des gènes *exoU* et *exoS* dans nos souches comme dans la majorité des études qui retrouvaient également le même ordre de grandeur en proportion. Notamment l'étude de Boulan *et al* (156) qui avait noté une prévalence du gène *exoU* plus élevée dans les infections aiguës invasives. Ceci conforterait l'idée que nos souches *exoU+* étaient les plus virulentes

étant donné que 71,4% d'entre elles ont provoquées une PAVM, alors que seulement 14,5% des souches *exoS* ont provoquées des PAVM. La présence d'une septicémie était également plus fréquente en présence de souche *exoU+*. (157) Parmi nos 10 bactériémies à *P. aeruginosa* 40% étaient des souches *exoU+*.

Une corrélation significative a pu être mise en évidence entre présence du gène *exoU* sur nos isolats et développement de lésions pulmonaires aiguës. D'autant plus que le gène *exoU* est un très bon marqueur discriminant entre isolats tel que nous l'avons démontré avec l'analyse en coordonnées principales. Le gène *exoU* a également pu être significativement associé à la survenue de PAVM et le gène *exoS* à la non survenue de PAVM. Néanmoins, cela n'est pas le seul facteur explicatif puisque plusieurs souches non porteuses du gène *exoU* étaient responsables de PAVM. (155)

La combinaison de plusieurs facteurs de virulence est également responsable de profils de virulence exacerbés. Par exemple Luo *et al* a étudié la virulence combinatoire du gène *pldA* et *exoU*, en effet lorsque le T6SS secrète une phospholipase D codée par *pldA* dans une souche *exoU+*, une virulence plus importante a été observée. (158) Parmi nos 14 souches *exoU+* seulement deux ne retrouvent pas le gène *pldA* mais ces dernières étaient quand même responsables de PAVM.

Sullivan *et al* ont rapporté que les souches résistantes aux fluoroquinolones et MDR étaient plus susceptibles de provoquer une pneumonie qu'une bronchite ou une colonisation. L'association de la résistance aux fluoroquinolones et du gène codant pour l'effecteur TSS ExoU chez *P. aeruginosa* était le facteur prédictif le plus fort du développement de la pneumonie. (159)

De plus, 5 de nos souches ne possède pas le gène *exsE*, régulateur négatif du T3SS, ainsi une virulence plus forte pourrait être attendue au vu de l'incapacité de répression de la transcription du T3SS. En effet, Rietsch *et al* (160) ont démontré que l'absence du gène *exsE* ne modifie pas la sécrétion de l'exotoxine ExoS, mais que son hyperproduction entraîne la diminution de synthèse de T3SS. ExsE se lie à ExsC qui est un anti-anti-activateur de l'expression de T3SS. En analysant ces 5 souches seulement 2 sont responsables d'une bactériémie et d'une PAVM, mais le nombre d'isolat reste faible pour conclure sur ce point.

Bien qu'il n'y ait pas d'explication génétique et une association claire entre la virulence associée à ExoU et la résistance aux antibiotiques, il ne fait aucun doute que les souches bactériennes possédant à la fois des caractéristiques virulentes et des multirésistances sont plus dangereuses. L'amélioration des méthodes de génotypage et de phénotypage pour l'analyse des toxines T3SS des isolats cliniques permet d'augmenter notre compréhension dans ce domaine. Une étude Californienne s'est penché sur le sujet (161) en comparant l'effet des mutations *parC* sur les souches *exoU+* et *exoS+*. Il a été démontré que les mutations de *parC* augmentent ou n'ont pas d'effet sur la fitness (l'aptitude à la survie) des souches *exoU*, alors qu'elles diminuent celle des souches *exoS*. Ces résultats peuvent fournir une explication de la prédominance observée du génotype *exoU* virulent dans les sous-populations cliniques résistantes aux fluoroquinolones. Par ailleurs les isolats *exoU+* étaient plus susceptibles d'être résistants aux fluoroquinolones que les isolats *exoS+* (92 % contre 61 %, $P < 0,05$). Ces isolats possèdent une mutation du gène *gyrA* et présentent un phénotype de surexpression de la pompe à efflux. (162) Dans notre étude, parmi nos 14 souches *exoU+* nous observons 4 souches résistantes aux fluoroquinolones associées à une résistance aux

carbapénèmes. De plus 66,7% des mutations T183I de *gyrA* entraînant une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones sont des souches *exoU+*.

Nous observons une différence significative (p -value = 0,041) avec une présence plus importante de *algP/algR3* dans nos souches causant une PAVM que dans les autres souches. Ce gène régule positivement la production d'alginate mais également de lipopolysaccharide et est nécessaire pour la motilité de contractions médié par le pili de type IV. AlgR s'est avéré essentiel pour la pathogenèse de *P. aeruginosa*. (163)

Le quorum sensing est très important étant donné qu'il joue un rôle dans la production de facteurs de virulence, la sensibilité aux antibiotiques et le développement du biofilm. Il existe deux systèmes de régulation du quorum sensing contrôlant de nombreux gènes de virulence, le système LasR-LasI, présent sur la globalité de nos souches et le système RhlR-RhlI, absent uniquement chez une de nos souches. Par supposition qu'il n'y ait pas un défaut de détection du gène, cette souche devrait avoir une virulence moindre au vu de l'absence du système de régulation majeur du QS, effectivement nous n'avons pas observé de PAVM mais une simple trachéobronchite avec cette souche. Une des principales limites de l'analyse du NGS est qu'elle ne tient pas compte des systèmes de régulation génétique. Une analyse du transcriptome pourrait ainsi être utile pour mettre en évidence dans notre étude des modifications de niveaux d'expression des mécanismes de résistance (systèmes d'efflux MexAB-OprM, MexEF-OpRM...) ou de virulence (gradient d'expression des gènes) qui n'ont pas pu être étudiés ici. De plus, de nombreux gènes présentent des schémas d'induction temporel par le quorum-sensing où ils sont non seulement activés en réponse à l'augmentation de la densité bactérienne, mais également réprimés en phase stationnaire. (164) L'étude de Wagner *et al* (165) a identifié 616 gènes régulés par le quorum-sensing, avec un nombre de gènes régulés positivement différent entre la phase stationnaire et la phase de multiplication bactérienne, et également quelques gènes réprimés. L'analyse NGS nous permet d'identifier la présence ou non des différents gènes de virulence, mais sans analyse du transcriptome, il nous est impossible de savoir le réel impact phénotypique du gène. Néanmoins cette analyse transcriptomique semble délicate à réaliser car les niveaux d'expression observés *in vitro* ne reflètent probablement pas ceux observés *in vivo*.

Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que des antibiotiques de type macrolides réduisaient l'expression du gène du quorum sensing et ainsi la production de facteurs de virulence dépendant du QS. De tel antibiotique pourrait être utilisés pour inhiber la virulence bactérienne et prévenir la PAVM chez des patients intubés. (81) Cela semble néanmoins peu envisageable dans un souci d'épargne des antibiotiques et de maîtrise de la diffusion de l'antibiorésistance.

P. aeruginosa affiche une résistance intrinsèque à de larges classes d'antimicrobiens en raison de la faible perméabilité de sa membrane externe, de l'hyperproduction des pompes à efflux et des modifications enzymatiques des antibiotiques. Un des objectifs de cette étude était de présenter les principaux mécanismes de résistance aux antimicrobiens impliqués dans la PAVM. Mais en raison d'une multitude de mécanismes présents, la simple explication génomique est difficile à interpréter pour prédire les résistances phénotypiques. Concernant les fluoroquinolones des mutations typiques tels que T83I de *gyrA* provoquent toujours une résistance. Pour les bêta-lactamines cela reste plus complexe, en effet aucune mutation sur un gène précis n'a pu être identifiée comme responsable d'une résistance. Le système de régulation de la céphalosporinase AmpC reste très complexe de nos jours étant donnée la multitude de gènes le régulant avec autant de possibilité de mutations.

La surproduction de céphalosporinase AmpC chromosomique, impliquant un large éventail de gènes régulateurs, est probablement le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines induit par mutation génomique. Il a été détecté dans plus de 20 % des isolats cliniques de *P. aeruginosa*. Les inactivations mutationnelles de *dacB* et *ampD* sont connues pour être les mécanismes les plus courants d'hyperproduction d'AmpC et de résistance aux β -lactamines. Parmi nos souches nous avons retrouvé 90% de souches mutées sur *ampC*, les 10% non mutée correspondent à nos 7 souches PDC-1, 72% mutées sur *ampDh3*, 71% mutées sur *ampD*, 42% mutées sur *ampR*, 38% mutées sur *dacB* et 9% mutées sur *ampDh2*.

A ce jour il existe plus de 497 variants de céphalosporinase du Pseudomonas (PDC) (23) qui possède des niveaux de résistance différents aux bêta-lactamines, dont certains confèrent une résistance accrue au ceftolozane-tazobactam (PDC-35) et au ceftazidime-avibactam, à cela se rajoute la régulation d'*ampC* par les autres gènes. L'étude de Torrens *et al* a étudié le changement de CMI de la ceftazidime et de la quantité d'ARNm d'*ampC* en fonction des mutations d'*ampD*, *ampDh2*, *ampDh3* et *dacB* sur une souche PAO1. Ils ont observé une augmentation de la CMI par 24 pour une mutation simple de *dacB* et par 8 pour une mutation simple de *ampD*. Il n'y avait pas de changement de CMI lorsqu'il y avait une mutation simple d'*ampDh2* et *ampDh3*. Par contre lorsqu'elles étaient associées à une mutation d'*ampD*, la CMI augmentait de 12 fois pour *ampDh2* et de 48 fois pour *ampDh3*. Et l'association d'une mutation d'*ampD* et de *dacB* retrouvait une CMI de la ceftazidime 96 fois plus grande. Au vu de nos différentes mutations retrouvées sur ces gènes nous n'avons pu tirer de conclusion étant donné que des combinaisons de mutations similaires étaient retrouvées chez des souches sensibles et résistantes à la ceftazidime. Ainsi aucune mutation n'a pu être identifiée comme responsable de l'inactivation d'*ampD* ou *dacB*. Le dosage de l'ARNm de *ampC* nous aurait éventuellement permis d'incriminer l'hyperproduction d'*ampC* comme responsable des résistances.

Dans notre étude, un patient a attiré notre attention. Nous observons entre la souche PA27, prélevée le 11/05/2021 et la souche PA30 prélevée le 10/06/2021 chez le même patient, la présence d'un probable clone avec le même serogroupe O1, le même ST 27, très proche phylogénétiquement avec 197 de SNP. Les deux souches ont un PDC-15 et exactement les mêmes mutations sur les gènes *ampC*, *dacB* et *ampD3* pourtant la PA27 est résistante à toutes les bêta-lactamines même à la ceftazidime-avibactam et au ceftolozane-tazobactam. Après exploration la seule différence retrouvée, est la présence d'une OXA-50 chez la PA27, présente de manière naturelle chez le *P. aeruginosa* et une OXA-494 chez PA30. Ainsi le même clone aurait eu des modifications génétiques en un mois lui faisant perdre ses multiples résistances. Il pourrait également s'agir d'une infection par deux isolats issus d'un même clone et ayant une origine environnementale de contamination commune. De plus nous observons que la souche multirésistante a provoqué une PAVM alors que la souche totalement sensible a été considérée comme une simple colonisation pulmonaire par la suite.

Concernant l'imperméabilité des porines D2, l'analyse du gène *oprD* n'a pas non plus été concluante avec une multitude de mutations à des positions très variables chez des souches sensibles et résistantes aux carbapénèmes. Des mutations identiques ont été retrouvées chez des souches ayant une résistance isolée à l'imipénème et au méropénème ainsi que chez des souches totalement sensibles. Au vu de la complexité génomique les résultats n'ont pas été rendus dans ce travail, mais pourraient être explorés dans des travaux futurs.

Les quatre pompes d'efflux les plus fréquentes sont MexAB-OprM (donnant une résistance à ticarcilline+/- acide clavulanique, à l'aztréonam et au meropénème), MexCD-OprJ (donnant une sensibilité moindre au céfépime), MexEF-OprN et MexXY/OprM (donnant une résistance au céfépime et une réduction de sensibilité aux aminosides).(12) Après analyse sur le logiciel CARD nous nous sommes rendu compte que tous les gènes codant pour les pompes à efflux : mexA, mexB, mexC, mexD, mexE, mexG, mexH, mexI, mexJ, mexK, mexL, mexM, mexN, mexP, mexQ, mexR, mexS, mexT, mexV, mexW, mexY, mexZ étaient présent chez toutes nos souches. Etant donnée notre impossibilité de savoir le niveau de surexpression donnant lieu à des résistances, nous n'avons pas pu étudier ce phénomène de résistance, bien qu'il soit majeur dans les phénotypes observés au laboratoire.

La priorisation de l'étude ne nous a pas permis d'étudier la résistance aux aminosides, par manque de temps et de par leur faible utilisation lors d'infections à *P. aeruginosa* qui se limite plutôt à une utilisation d'urgence dans le service de Réanimation notamment lors d'un choc septique. Nous nous sommes ainsi cantonner à la recherche de résistance aux aminosides seulement par la recherche d'intégrons. Un seul intégron de résistance a été retrouvé parmi tous nos isolats, ce qui reste très faible en proportion comparé à d'autres études.(166,167)

En plus de la résistance mutationnelle chromosomique, qui est relativement fréquente, la résistance transférable chez *P. aeruginosa* est un autre domaine de préoccupation. En effet, il existe une prévalence croissante dans le monde des β -lactamases transférables, les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases (en particulier les carbapénémases de classe B, ou métallo- β -lactamases) avec une distribution qui n'est pas uniforme et qui varie de moins de 1 % à près de 50 %, selon l'hôpital et la zone géographique. (168) Nous n'avons observé qu'une souche avec un intégron, un résultat très faible étant donné la forte présence habituelle d'intégron chez les BGN. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que nos souches sont peu résistantes aux aminosides et que cela dépend de l'épidémiologie locale de chaque réanimation.

La prévalence mondiale de *P. aeruginosa* MDR a augmenté au cours des dernières décennies et se situe maintenant dans la fourchette de 15 à 30 %.(169) Nous avons 29 % de souches MDR parmi nos isolats, en considérant une souche MDR s'il y a au moins une résistance à plus de 3 familles d'antibiotiques différentes. À titre de comparaison avec nos voisins espagnols, ayant réalisé une étude multicentrique récente à grande échelle (51 hôpitaux) sur *P. aeruginosa* montrant que 26 % des isolats étaient multirésistants.(170)

Le risque majeur de ces souches MDR est, pour le patient, de recevoir un traitement antimicrobien initial inadéquat. (171) Nous savons également que les retards de mise en place d'une antibiothérapie efficace sont associés à de moins bons résultats de survie chez les patients atteints d'infections à *P. aeruginosa*. (172) De plus, cela nécessite des antibiotiques de deuxième voir de troisième ligne et sont plus toxique que ceux utilisées pour traiter les infections de souches sensibles. Quarante-cinq pourcents de nos souches MDR ont été isolées chez des patients décédés en réanimation, dont 20% seraient directement imputables à l'infection à *P. aeruginosa*. De plus, 60% des souches MDR sont responsables de PAVM dans notre étude. Par comparaison, sur les 32 souches isolées lors d'une colonisation pulmonaire chez 28 patients, il n'y avait que 18,7% de profils MDR.

Notre étude comporte cependant plusieurs limites. La première est la difficile interprétation des données cliniques chez des patients très souvent poly-pathologiques intubés-ventilés sur de longues durées et pouvant présenter de multiples lignes d'antibiothérapies. De plus, il reste toujours difficile de diagnostiquer une PAVM (d'autant plus lorsque d'autres étiologies respiratoires telle que le Sars-Cov-2 influent sur l'issue clinique) et d'imputer le décès d'un patient à une infection par *P. aeruginosa*. Cela est d'autant plus difficile car les PAVM à *P. aeruginosa* surviennent essentiellement chez des patients séjournant longuement en service de Réanimation ou ayant un statut immunitaire dégradé. La deuxième concerne la présence plurimicrobienne au niveau pulmonaire et quelques fois la présence de plusieurs isolats de *P. aeruginosa*. Il est ainsi difficile d'imputer une souche précise responsable de PAVM. La troisième repose sur la difficulté d'analyse des résistances, le NGS ne permettant pas de mettre en évidence les niveaux d'expression des gènes il nous est impossible de conclure sur les résistances notamment liées à l'efflux ou encore sur les niveaux d'expression des facteurs de virulence. Enfin, la dernière limite concerne l'analyse bioinformatique des contigs qui nécessiterait une automatisation sur des serveurs capables d'analyser des fichiers très volumineux pour pouvoir faire directement l'analyse à partir des *reads*.

Par ailleurs, il est difficile de tirer des conclusions définitives étant donné le petit nombre de souches dans chaque sérotype. Une étude clinique plus large combinant un recueil de données cliniques plus précises permettrait d'analyser plus finement les facteurs responsables de la survenue d'une PAVM. Ceci pourrait renforcer les conclusions et l'implication des gènes de virulence sur la pathogénicité du patient.

Les patients gravement malades ont tendance à contracter une PAVM sous intubation, augmentant la morbidité et la mortalité ainsi que le coût des soins de santé avec une durée d'hospitalisation plus longue et une majoration de soins. La mortalité associée à la PAVM reste aujourd'hui non négligeable (jusqu'à 50% de mortalité). (173) Le NGS peut nous aider à améliorer la compréhension de la survenue d'une PAVM tant au niveau des caractéristiques de virulence d'une souche donnée, que des caractéristiques phylogénétiques et épidémiologiques. L'outil est très intéressant devant l'importance des données descriptives obtenues, mais est difficilement applicable à la routine devant la rapide évolution clinique. La métagénomique qui correspond à un séquençage directement sur le prélèvement sans culture préalable de l'échantillon au laboratoire, permet d'obtenir le contenu bactérien, viral et fongique, semble être un outil particulièrement intéressant dans l'investigation de la PAVM. La difficulté reste le temps d'analyse mais surtout la trop grande proportion d'ADN humain dans les prélèvements respiratoires, parasitant la détection des éléments microbiens.

L'amélioration des outils mis à la disposition de la recherche et des laboratoires cliniques, tout comme l'amélioration des données du « big data » permettant de gérer et traiter de grandes quantités de données, pourra permettre d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la PAVM dans un futur proche.

Conclusion

Cette étude monocentrique nous a permis d'utiliser les capacités du NGS pour analyser le contenu génomique de différentes souches de *P. aeruginosa* isolées dans les prélèvements respiratoires des patients hospitalisés dans le service de Réanimation Polyvalente de Mars 2019 à Janvier 2022. Nous avons séquencé soixante-neuf souches qui ont montré un profil extrêmement polyclonal avec 37 ST différents. Néanmoins, plusieurs microépidémies ont pu être mises en évidence au sein du service de Réanimation avec un nombre de SNP inférieur à 30.

Notre étude a inclus un nombre important de patients de manière exhaustive sur plusieurs années, retrouvant une vingtaine de PAVM. Une présence majeure des sérogroupes O1, O6 et O11 nous permet d'avoir une population de souches de bonne représentation des souches circulantes au niveau nationale.

Le travail d'analyse des résistances et des facteurs de virulence fut important. Une concordance phénotypique et génotypique a été retrouvée lors de l'analyse du profil de résistance aux fluoroquinolones, et une analyse plus difficile pour les bêta-lactamines où plusieurs facteurs interviennent.

Enfin, notre étude nous a permis d'identifier deux facteurs favorisant les infections graves notamment une mauvaise évolution pulmonaire avec l'apparition de PAVM : la présence de souches sécrétrices d'exotoxines codées par le gène *exoU* à travers le T3SS et la présence de souches multi-résistantes. En effet 71,4% des souches *exoU*+ et 60% des souches MDR ont causé des PAVM. Une analyse clinique plus précise et une population plus large seraient à envisager pour confirmer ces résultats.

Références bibliographiques

1. Denis François, Ploy Marie-Cécile, Martin C, Cattoir Vincent. Bactériologie Médicale - Techniques usuelles 3^{ème} édition. Elsevier Masson. 2016. 572 p.
2. International Human Genome Sequencing Consortium, Whitehead Institute for Biomedical Research, Center for Genome Research:, Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 15 févr 2001;409(6822):860-921.
3. Barreto S. Recombinaison et évolution de la composition en base: démonstration expérimentale de la conversion génique biaisée vers GC chez les Bactéries. :47.
4. Reva ON, Tümmler B. Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns. *BMC Bioinformatics*. 7 juill 2004;5(1):90.
5. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 31 août 2000;406(6799):959-64.
6. Tönnies H, Prior K, Harmsen D, Mellmann A. Establishment and Evaluation of a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 18 févr 2021;59(3):e01987-20.
7. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. août 2015;21-22:41-59.
8. Conseil de l'Europe. Recommandations n° R (84) 20 sur la prévention des infections hospitalières, adoptée par le comité des ministres le 25 octobre 1984 lors de la 376^e réunion des délégués des ministres.
9. Santé Publique France. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017 Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 270 p. [Internet]. [cité 30 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-mai-juin-2017>
10. Santé Publique France. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte : Réseau REA-Raisin, France, Résultats 2016 [Internet]. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/surveillance-des-infections-nosocomiales-en-reanimation-adulte-reseau-rea-raisin-france-resultats-2016>
11. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2020 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2022 [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial->

12. de Sousa T, Hébraud M, Dapkevicius MLNE, Maltez L, Pereira JE, Capita R, et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 29 nov 2021;22(23):12892.
13. 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.
14. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. août 1998;27 Suppl 1:S93-99.
15. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol*. 2015;10(10):1683-706.
16. Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, et al. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One*. 2012;7(3):e34067.
17. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. févr 2016;16(2):161-8.
18. Zeng L, Jin S. aph(3')-IIb, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2003;47(12):3867-76.
19. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2004;48(6):2043-8.
20. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
21. Shiba T, Ishiguro K, Takemoto N, Koibuchi H, Sugimoto K. Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the nfxB gene. *J Bacteriol*. oct 1995;177(20):5872-7.
22. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. oct 2009;22(4):582-610.
23. Torrens G, Hernández SB, Ayala JA, Moya B, Juan C, Cava F, et al. Regulation of AmpC-Driven β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Different Pathways, Different Signaling. *mSystems*. 3 déc 2019;4(6):e00524-19.

24. 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.* 6 oct 2016;16:234.
25. 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.* 1 juill 2015;59(7):3925-34.
26. Moya B, Zamorano L, Juan C, Pérez JL, Ge Y, Oliver A. Activity of a New Cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against β -Lactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Selected In Vitro and after Antipseudomonal Treatment of Intensive Care Unit Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2010;54(3):1213-7.
27. Fournier D, Carrière R, Bour M, Grisot E, Triponney P, Muller C, et al. Mechanisms of Resistance to Ceftolozane/Tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 20 janv 2021;65(2):e01117-20.
28. Caille O, Zincke D, Merighi M, Balasubramanian D, Kumari H, Kong KF, et al. Structural and Functional Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Global Regulator AmpR. *J Bacteriol.* nov 2014;196(22):3890-902.
29. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2009;53(5):1766-71.
30. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, et al. Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2015;59(10):6248-55.
31. Sid Ahmed MA, Khan FA, Hadi HA, Skariah S, Sultan AA, Salam A, et al. Association of blaVIM-2, blaPDC-35, blaOXA-10, blaOXA-488 and blaVEB-9 β -Lactamase Genes with Resistance to Ceftazidime–Avibactam and Ceftolozane–Tazobactam in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics.* 19 janv 2022;11(2):130.
32. CNR Résistance aux antibiotiques [Internet]. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/phototheque.html>
33. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. Involvement of the MexXY-OprM Efflux System in Emergence of Cefepime Resistance in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2006;50(4):1347-51.
34. Nouri R, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. The role of gyrA and parC mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Braz J Microbiol.* 26 juill 2016;47(4):925-30.
35. Farahi RM, Ali AA, Gharavi S. Characterization of gyrA and parC mutations in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Tehran hospitals in Iran. *Iran J Microbiol.* août 2018;10(4):242-9.

36. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2005;49(2):479-87.
37. Vaziri F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Sao Paulo Braz.* 2011;66(9):1519-22.
38. Salacha R. Les Patatines de *Pseudomonas Aeruginosa* : secrétées ou non secrétées ? Telle est la question ... [Internet] [These de doctorat]. Aix-Marseille 2; 2010 [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2010AIX22040>
39. Ha DG, Kuchma SL, O'Toole GA. Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1149:59-65.
40. Conrad JC, Gibiansky ML, Jin F, Gordon VD, Motto DA, Mathewson MA, et al. Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys J.* 6 avr 2011;100(7):1608-16.
41. Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechère JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *J Bacteriol.* nov 2000;182(21):5990-6.
42. Garcia M, Morello E, Garnier J, Barrault C, Garnier M, Burucoa C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence.* 2 août 2018;9(1):1163-75.
43. Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 avr 2004;101(17):6664-8.
44. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 1 sept 2014;22(9):517-27.
45. Craig L, Li J. TYPE IV PILI: PARADOXES IN FORM AND FUNCTION. *Curr Opin Struct Biol.* avr 2008;18(2):267-77.
46. de Bentzmann S, Plésiat P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol.* juill 2011;13(7):1655-65.
47. Allen WJ, Phan G, Waksman G. Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol.* août 2012;22(4):500-6.
48. Ruer S, Stender S, Filloux A, de Bentzmann S. Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J Bacteriol.* mai 2007;189(9):3547-55.
49. Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juin 2001;98(12):6911-6.

50. Mikkelsen H, Ball G, Giraud C, Filloux A. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PloS One*. 23 juin 2009;4(6):e6018.
51. Giraud C, de Bentzmann S. Inside the complex regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chaperone usher systems. *Environ Microbiol*. août 2012;14(8):1805-16.
52. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocíncová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol*. 1 juin 2011;2:118.
53. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*. 19 déc 2019;9(1):6.
54. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, François B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care Lond Engl*. 15 janv 2014;18(1):R17.
55. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. mai 2003;41(5):2158-60.
56. Wang S, Xiang D, Tian F, Ni M. Lipopolysaccharide from biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 induces macrophage hyperinflammatory responses. *J Med Microbiol*. 28 avr 2021;70(4):001352.
57. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture ▽. *Appl Environ Microbiol*. août 2011;77(15):5238-46.
58. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*. déc 2007;10(6):644-8.
59. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 17 nov 2020;21(22):8671.
60. Cherny KE, Sauer K. *Pseudomonas aeruginosa* Requires the DNA-Specific Endonuclease EndA To Degrade Extracellular Genomic DNA To Disperse from the Biofilm. *J Bacteriol*. 22 août 2019;201(18):e00059-19.
61. Gheorghita AA, Wolfram F, Whitfield GB, Jacobs HM, Pfoh R, Wong SSY, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* homeostasis enzyme AlgL clears the periplasmic space of accumulated alginate during polymer biosynthesis. *J Biol Chem*. 3 janv 2022;298(2):101560.
62. Jain S, Ohman DE. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. oct 2005;73(10):6429-36.
63. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev*. juill 2012;36(4):893-916.

64. 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 Pathog.* 27 janv 2011;7(1):e1001264.
65. Baker P, Hill PJ, Snarr BD, Alnabelseya N, Pestrak MJ, Lee MJ, et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci Adv.* mai 2016;2(5):e1501632.
66. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol.* 22 août 2011;2:167.
67. Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, Robinson H, Parsek MR, Howell PL. Structure of the Cytoplasmic Region of PelD, a Degenerate Diguanylate Cyclase Receptor That Regulates Exopolysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 6 juill 2012;287(28):23582-93.
68. Marmont LS, Rich JD, Whitney JC, Whitfield GB, Almblad H, Robinson H, et al. Oligomeric lipoprotein PelC guides Pel polysaccharide export across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 mars 2017;114(11):2892-7.
69. Kowalska K, Soscia C, Combe H, Vasseur P, Voulhoux R, Filloux A. The C-terminal amphipathic alpha-helix of *Pseudomonas aeruginosa* PelC outer membrane protein is required for its function. *Biochimie.* janv 2010;92(1):33-40.
70. Marmont LS, Whitfield GB, Rich JD, Yip P, Giesbrecht LB, Stremick CA, et al. PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 24 nov 2017;292(47):19411-22.
71. Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *J Bacteriol.* déc 2006;188(23):8213-21.
72. Billings N, Ramirez Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasova Y, Stocker R, et al. The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog.* 8 août 2013;9(8):e1003526.
73. Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol.* sept 2009;73(6):1072-85.
74. Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, Hill PJ, Harwood CS, Wozniak DJ, et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 déc 2012;109(50):20632-6.
75. Baker P, Whitfield GB, Hill PJ, Little DJ, Pestrak MJ, Robinson H, et al. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Glycoside Hydrolase PslG Reveals That Its Levels Are Critical for Psl Polysaccharide Biosynthesis and Biofilm Formation. *J Biol Chem.* 20 nov 2015;290(47):28374-87.

76. Ali NM, Chatta S, Liaqat I, Mazhar SA, Mazhar B, Zahid S. *Pseudomonas aeruginosa* associated pulmonary infections and in vitro amplification virulent rhamnolipid (rhlR) gene. *Braz J Biol Rev Brasleira Biol.* 2021;82:e228009.
77. Reis RS, Pereira AG, Neves BC, Freire DMG. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Bioresour Technol.* juin 2011;102(11):6377-84.
78. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* févr 2003;185(3):1027-36.
79. Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* mars 2007;189(6):2531-9.
80. Nickzad A, Déziel E. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Lett Appl Microbiol.* mai 2014;58(5):447-53.
81. Köhler T, Guanella R, Carlet J, van Delden C. Quorum sensing-dependent virulence during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation and pneumonia in mechanically ventilated patients. *Thorax.* août 2010;65(8):703-10.
82. Sultan M, Arya R, Kim KK. Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Int J Mol Sci.* 10 nov 2021;22(22):12152.
83. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol IJMM.* déc 2010;300(8):534-43.
84. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* sept 2009;7(9):654-65.
85. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med.* avr 2012;40(4):1157-63.
86. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol Sci.* sept 2016;37(9):734-49.
87. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* janv 2015;6(1):26-41.
88. Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol IJMM.* avr 2006;296(2-3):73-81.
89. Martínez E, Cosnahan RK, Wu M, Gadila SK, Quick EB, Mobley JA, et al. Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun Biol.* 2019;2:66.

90. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol.* févr 2003;6(1):56-60.
91. Smith DC, Spooner RA, Watson PD, Murray JL, Hodge TW, Amessou M, et al. Internalized *Pseudomonas* exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum. *Traffic Cph Den.* avr 2006;7(4):379-93.
92. Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol.* 2015;6:963.
93. Seetharam S, Chaudhary VK, FitzGerald D, Pastan I. Increased cytotoxic activity of *Pseudomonas* exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. *J Biol Chem.* 15 sept 1991;266(26):17376-81.
94. Majoul IV, Bastiaens PI, Söling HD. Transport of an external Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) protein from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum: studies with cholera toxin in Vero cells. *J Cell Biol.* mai 1996;133(4):777-89.
95. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 mai 2002;99(10):7072-7.
96. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:75.
97. Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, et al. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun.* mai 2009;77(5):2065-75.
98. Sonawane A, Jyot J, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa* LecB Is Involved in Pilus Biogenesis and Protease IV Activity but Not in Adhesion to Respiratory Mucins. *Infect Immun.* déc 2006;74(12):7035-9.
99. Grishin AV, Krivozubov MS, Karyagina AS, Gintsburg AL. *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae.* juin 2015;7(2):29-41.
100. Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem.* 5 avr 1993;268(10):7503-8.
101. Galdino ACM, Viganor L, de Castro AA, da Cunha EFF, Mello TP, Mattos LM, et al. Disarming *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB) as a Chemotherapeutic Target. *Front Microbiol.* 2019;10:1701.
102. Bastaert F, Kheir S, Saint-Criq V, Villeret B, Dang PMC, El-Benna J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering With Bacterial Killing Through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation. *Front Immunol.* 2018;9:1675.
103. Saint-Criq V, Villeret B, Bastaert F, Kheir S, Hatton A, Cazes A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a

- lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax*. janv 2018;73(1):49-61.
104. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. Pseudomonas aeruginosa hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun*. mai 1999;67(5):2371-6.
105. Wargo MJ, Gross MJ, Rajamani S, Allard JL, Lundblad LKA, Allen GB, et al. Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during Pseudomonas aeruginosa infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 août 2011;184(3):345-54.
106. Brogden KA. Changes in pulmonary surfactant during bacterial pneumonia. *Antonie Van Leeuwenhoek*. mai 1991;59(4):215-23.
107. Okino N, Ito M. Ceramidase enhances phospholipase C-induced hemolysis by Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem*. 2 mars 2007;282(9):6021-30.
108. Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. A novel extracellular phospholipase C of Pseudomonas aeruginosa is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol*. août 2004;53(4):1089-98.
109. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends Mol Med*. déc 2004;10(12):599-606.
110. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*. juill 2004;72(7):4275-8.
111. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Med Mal Infect*. févr 2006;36(2):78-91.
112. Ran H, Hassett DJ, Lau GW. Human targets of Pseudomonas aeruginosa pyocyanin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 nov 2003;100(24):14315-20.
113. Bonneau A. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'import du fer par la pyoverdine chez Pseudomonas aeruginosa [Internet] [phdthesis]. Université de Strasbourg; 2020 [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03504318>
114. Clément E, Mesini PJ, Pattus F, Schalk IJ. The binding mechanism of pyoverdin with the outer membrane receptor FpvA in Pseudomonas aeruginosa is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry*. 22 juin 2004;43(24):7954-65.
115. Schalk IJ, Guillon L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in Pseudomonas aeruginosa: implications for metal homeostasis. *Environ Microbiol*. juin 2013;15(6):1661-73.
116. Huang B, Ru K, Yuan Z, Whitchurch CB, Mattick JS. tonB3 Is Required for Normal Twitching Motility and Extracellular Assembly of Type IV Pili. *J Bacteriol*. juill 2004;186(13):4387-9.

117. Greenwald J, Nader M, Celia H, Gruffaz C, Geoffroy V, Meyer JM, et al. FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Mol Microbiol.* juin 2009;72(5):1246-59.
118. Lehoux DE, Sanschagrín F, Levesque RC. Genomics of the 35-kb pvd locus and analysis of novel pvdIJK genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 1 sept 2000;190(1):141-6.
119. Hannauer M, Barda Y, Mislin GLA, Shanzer A, Schalk IJ. The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. *J Bacteriol.* mars 2010;192(5):1212-20.
120. Brillet K, Journet L, Célia H, Paulus L, Stahl A, Pattus F, et al. A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Struct Lond Engl* 1993. nov 2007;15(11):1383-91.
121. Llamas MA, Imperi F, Visca P, Lamont IL. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev.* juill 2014;38(4):569-97.
122. Kang D, Revtovich AV, Chen Q, Shah KN, Cannon CL, Kirienko NV. Pyoverdine-Dependent Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Cystic Fibrosis Patients. *Front Microbiol.* 6 sept 2019;10:2048.
123. Mislin GLA, Hoegy F, Cobessi D, Poole K, Rognan D, Schalk IJ. Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol.* 14 avr 2006;357(5):1437-48.
124. Cunrath O, Gasser V, Hoegy F, Reimann C, Guillon L, Schalk IJ. A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* janv 2015;17(1):171-85.
125. Michel L, González N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T, Reimann C. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol.* oct 2005;58(2):495-509.
126. Ochsner UA, Johnson Z, Vasil ML. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl.* janv 2000;146 (Pt 1):185-98.
127. Barker KD, Barkovits K, Wilks A. Metabolic Flux of Extracellular Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* Is Driven by the Iron-regulated Heme Oxygenase (HemO). *J Biol Chem.* 25 mai 2012;287(22):18342-50.
128. Yao H, Jepkorir G, Lovell S, Nama PV, Weeratunga S, Battaile KP, et al. Two distinct ferritin-like molecules in *P. aeruginosa*: The product of the bfrA gene is a bacterial ferritin (FtnA) not a bacterioferritin (Bfr). *Biochemistry.* 14 juin 2011;50(23):5236-48.
129. Iiyama K, Takahashi E, Lee JM, Mon H, Morishita M, Kusakabe T, et al. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS*

Microbiol Lett. 1 avr 2017;364(7).

130. 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 Baltim Md 1950*. 1 janv 2012;188(1):386-93.
131. 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.
132. O'Callaghan R, Caballero A, Tang A, Bierdeman M. *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis: Protease IV and PASP as Corneal Virulence Mediators. *Microorganisms*. 22 août 2019;7(9):E281.
133. Passmore IJ, Nishikawa K, Lilley KS, Bowden SD, Chung JCS, Welch M. Mep72, a metzincin protease that is preferentially secreted by biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 15 févr 2015;197(4):762-73.
134. Hunter JD. Ventilator associated pneumonia. *BMJ*. 29 mai 2012;344:e3325.
135. Société Belge de Médecine Intensive et de médecine d'Urgence. Protocole d'étude Surveillance des Infections Nosocomiales aux Soins Intensifs, Protocole HELICS Belgique [Internet]. [sciensano.be](https://www.sciensano.be). Scientific institute of public health; 2004 [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://www.sciensano.be/en/biblio/protocole-detude-surveillance-des-infections-nosocomiales-aux-soins-intensifs-protocole-helics>
136. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir Care*. juin 2005;50(6):725-39; discussion 739-741.
137. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2005;171(4):388-416.
138. Nseir S, Zerimech F, Jaillette E, Artru F, Balduyck M. Microaspiration in intubated critically ill patients: diagnosis and prevention. *Infect Disord Drug Targets*. août 2011;11(4):413-23.
139. Hsnow. C121 Pneumonia | Medical archive [Internet]. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://hsnow.net/2020/02/20/c121-pneumonia/>
140. Köhler T, Buckling A, van Delden C. Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 avr 2009;106(15):6339-44.
141. Le Berre R, Nguyen S, Nowak E, Kipnis E, Pierre M, Ader F, et al. Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. avr 2008;14(4):337-43.

142. Méar JB. Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S013. tel-01084801. :84.
143. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet.* févr 2014;15(2):121-32.
144. Uritskiy GV, DiRuggiero J, Taylor J. MetaWRAP-a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome.* 15 sept 2018;6(1):158.
145. Deng X, Naccache SN, Ng T, Federman S, Li L, Chiu CY, et al. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 20 avr 2015;43(7):e46.
146. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018;3:124.
147. Pelegrin AC, Saharman YR, Griffon A, Palmieri M, Mirande C, Karuniawati A, et al. High-Risk International Clones of Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Endemic to Indonesian Intensive Care Units: Impact of a Multifaceted Infection Control Intervention Analyzed at the Genomic Level. *mBio.* 12 nov 2019;10(6):e02384-19.
148. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 10 févr 2017;243:16-24.
149. Sealfon R, Gire S, Ellis C, Calderwood S, Qadri F, Hensley L, et al. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and the Dominican Republic. *BMC Genomics.* 11 sept 2012;13:468.
150. Blanc DS, Magalhães B, Koenig I, Senn L, Grandbastien B. Comparison of Whole Genome (wg-) and Core Genome (cg-) MLST (BioNumerics™) Versus SNP Variant Calling for Epidemiological Investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2020;11:1729.
151. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2018;24(3):258-66.
152. Nasrin S, Hegerle N, Sen S, Nkeze J, Sen S, Permala-Booth J, et al. Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC Microbiol.* 6 janv 2022;22(1):13.
153. Del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Cabot G, et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotypes, resistance profiles and high-risk clones: results from a Spanish nationwide survey. *J Antimicrob Chemother.* 1 nov 2019;74(11):3217-20.

154. Meyer S. Analyse prospective par séquençage haut-débit de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine respiratoire isolées au service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges. 9 avr 2021; Université de Bordeaux, thèse 135.
155. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care Lond Engl*. 13 déc 2014;18(6):668.
156. Boulant T, Boudehen YM, Filloux A, Plesiat P, Naas T, Dortet L. Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains. *Front Microbiol*. 2018;9:2578.
157. Wareham DW, Curtis MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int J Med Microbiol IJMM*. juill 2007;297(4):227-34.
158. Luo RG, Miao XY, Luo LL, Mao B, Yu FY, Xu JF. Presence of pldA and exoU in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is associated with high risk of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. mai 2019;25(5):601-6.
159. Sullivan E, Bensman J, Lou M, Agnello M, Shriner K, Wong-Beringer A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med*. janv 2014;42(1):48-56.
160. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 mai 2005;102(22):8006-11.
161. Agnello M, Finkel SE, Wong-Beringer A. Fitness Cost of Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Differs by Type III Secretion Genotype. *Front Microbiol*. 2016;7:1591.
162. Panayidou S, Georgiades K, Christofi T, Tamana S, Promponas VJ, Apidianakis Y. *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence. *Sci Rep*. 11 juin 2020;10:9505.
163. Wu W, Badrane H, Arora S, Baker HV, Jin S. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. nov 2004;186(22):7575-85.
164. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J*. 1 août 2003;22(15):3803-15.
165. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol*. avr 2003;185(7):2080-95.

166. Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente ACP. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1 juin 2005;44(3):303-9.
167. Mobaraki S, Aghazadeh M, Soroush Barhaghi MH, Yousef Memar M, Goli HR, Gholizadeh P, et al. Prevalence of integrons 1, 2, 3 associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Northwest of Iran. *BioMedicine*. mars 2018;8(1):2.
168. Patel G, Bonomo RA. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. mai 2011;9(5):555-70.
169. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 18 sept 2019;32(4):e00031-19.
170. Del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Sánchez-Diener I, Cabot G, et al. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 1 juill 2019;74(7):1825-35.
171. Park SY, Park HJ, Moon SM, Park KH, Chong YP, Kim MN, et al. Impact of adequate empirical combination therapy on mortality from bacteremic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *BMC Infect Dis*. 16 nov 2012;12:308.
172. Kollef MH, Chastre J, Fagon JY, François B, Niederman MS, Rello J, et al. Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med*. oct 2014;42(10):2178-87.
173. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 avr 2002;165(7):867-903.

Annexes

Annexe 1 : Résultats bactériologiques des différents prélèvements pulmonaires	135
Annexe 2 : Présence des gènes de résistance après analyse de CARD	136
Annexe 3 : Gène de virulence analysé dans nos souches de <i>P. aeruginosa</i> à partir de VFDB	138

Annexe 1. Résultats bactériologiques des différents prélèvements pulmonaires

N° de souche	Type de Prélèvement	Date d'isolat	Quantification du <i>P.aeruginosa</i> (UFC/ml)	Autres pathogènes	N° de souche	Type de Prélèvement	Date d'isolat	Quantification du <i>P.aeruginosa</i> (UFC/ml)	Autres pathogènes
1	AB	27/10/2020	10*6	Raoutella omithinolytica 10*3	36	AET	24/07/2021	10*5	Klebsiella pneumoniae 10*6
2	AET	25/11/2020	> 10*6	Levure > 10*6	37	AET	02/08/2021	10*4	Klebsiella pneumonia 10*3 Levure 10*3
3	AET	27/11/2020	> 10*6	Proteus mirabilis > 10*3 ; Levure > 10*4	38	AET	13/08/2021	10*5	-
4	AET	19/12/2020	> 10*4	<i>S. pneumoniae</i> > 10*6	39	AET	26/12/2021	> 10*6	<i>S. aureus</i> > 10*6
5	AET	13/01/2021	> 10*6	Klebsiella pneumonia > 10*3 Staph aureus > 10*4	40	AET	23/07/2021	> 10*6	Enterocloacae 10*3
6	AET	14/01/2021	> 10*6	-	41	AET	13/09/2021	10*4	<i>S. aureus</i> 10*4
7	Aspi protégé	15/01/2021	10*6	Streptococcus agalactiae > 10*6 Enterobacter aeruginosa > 10*3 Staph aureus > 10*4	42	AET	10/12/2021	10*5	-
8	Aspi bronchique	12/03/2021	10*6	-	43	AET	27/08/2021	> 10*6	Serratia marcescens 10*4 <i>S. aureus</i> 10*4
9	Aspi bronchique	22/03/2021	10*6	-	44	AET	27/08/2021	10*4	Serratia marcescens 10*4 <i>S. aureus</i> 10*4
10	Aspi bronchique	27/03/2021	10*4	Staphylococcus aureus > 10*6	45	AET	01/07/2021	10*6	-
11	AET	06/04/2021	10*6	-	46	AET	20/03/2019	10*4	Enterobacter cloacae 10*5
12	AET	02/07/2020	10*3	-	47	AET	20/03/2019	> 10*6	Enterobacter cloacae 10*6
13	AET	26/07/2020	10*6	Moraxella catarrhalis 10*6 Streptococcus pneumoniae > 10*6	48	AET	30/03/2019	10*4	<i>S. aureus</i> 10*5
14	Aspi bronchique	08/08/2020	> 10*6	Serratia marcescens 10*4	49	AET	27/05/2019	10*6	-
15	AET	17/08/2020	10*6	Serratia marcescens 10*3 Staphylococcus aureus > 10*6	50	AET	24/06/2019	10*4	<i>S. aureus</i> 10*5
16	LBA	08/09/2020	10*2	Escherichia coli 10*7 Staphylococcus aureus 10*5	51	AET	24/06/2020	10*5	<i>S. aureus</i> 10*5
17	AET	19/09/2020	10*3	Haemophilus influenzae 10*4 Staphylococcus aureus > 10*3	52	AET	04/07/2019	10*4	<i>S. aureus</i> 10*3
18	AET	13/10/2020	10*4	Streptococcus constellatus 10*4	53	AET	10/07/2019	10*3	-
19	KT protégé	22/10/2020	10*3	Enterobacter aeruginosa 10*3 Streptococcus anginosus 10*6 Levure 10*5	54	LBA	19/08/2019	10*4	-
20	AET	10/11/2020	> 10*6	Klebsiella pneumoniae 10*6 Levure 10*3	55	LBA	17/08/2019	10*4	Proteus vulgaris 10*4
21	AET	12/11/2020	10*5	Staphylococcus aureus > 10*6	56	AET	04/09/2019	10*5	-
22	AET	26/10/2020	> 10*6	Levure > 10*3	57	AET	17/09/2019	10*5	<i>S. aureus</i> 10*4
23	Aspi bronchique	27/04/2021	10*5	Serratia marcescens 10*3 Proteus mirabilis 10*3	58	AET	10/10/2019	10*3	Enterobacter aeruginosa 10*3
24	AET	28/04/2021	10*3	Morganella morganii 10*4	59	Aspi bronchique	27/01/2020	10*3	-
25	LBA	03/05/2021	10*4	-	60	AET	27/01/2020	10*5	Stenotrophomonas maltophilia 10*6
26	AET	04/05/2021	> 10*6	-	61	LBA	26/02/2020	10*4	-
27	LBA	11/05/2021	10*4	<i>S. aureus</i> > 10*6 Stenotrophomonas maltophilia 10*6 Proteus mirabilis 10*3	62	LBA	23/03/2020	10*5	<i>S. aureus</i> > 10*6 <i>E. coli</i> 10*4
28	AET	21/05/2021	> 10*7	Levure 10*3	63	AET	24/03/2020	10*4	<i>H. influenzae</i> > 10*6 <i>S. pneumoniae</i> > 10*6 <i>S. aureus</i> 10*5
29	AET	25/05/2021	> 10*6	-	64	AET	11/04/2020	> 10*6	Levure 10*3
30	AET	12/06/2021	10*4	Stenotrophomonas maltophilia 10*6	65	AET	12/04/2020	10*5	-
31	Aspi bronchique	12/10/2021	10*5	-	66	AET	12/04/2020	10*4	-
32	AET	20/10/2021	10*3	Levure 10*3	67	AET	03/06/2020	10*6	Proteus mirabilis 10*4 Corynebacterium striatum 10*6
33	Aspi bronchique	16/07/2021	10*6	Serratia marcescens 10*5	68	LBA	07/06/2020	10*4	-
34	AET	25/05/2021	> 10*6	-	69	AET	12/06/2020	10*4	<i>S. aureus</i> > 10*6
35	AET	30/12/2021	10*3	-					

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Analyse prospective par séquençage haut-débit de souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine respiratoire isolées au service de Réanimation polyvalente du CHU de Limoges

Pseudomonas aeruginosa est fréquemment isolé chez les patients hospitalisés dans les services de Réanimation, et peut être responsable de la survenue de pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM). L'utilisation du séquençage haut débit (NGS) dans ce contexte permet d'étudier les caractéristiques génomiques des isolats bactériens afin de mieux comprendre la pathogénicité, la virulence et les mécanismes de résistance aux antibiotiques. L'objectif de cette étude monocentrique a été d'analyser par NGS les populations de *P. aeruginosa* isolées à partir des prélèvements respiratoires des patients hospitalisés dans le service de Réanimation polyvalente du CHU de Limoges de Mars 2019 à Janvier 2022.

Soixante-neuf isolats de *P. aeruginosa* issus de 54 patients ont été séquencés. La caractérisation génomique a permis d'identifier 37 *Sequence Type* (ST) différents. Au vu du faible nombre de *single nucleotide polymorphisms* (SNP) entre certains isolats retrouvés chez différents patients, nous avons mis en évidence plusieurs microépidémies au sein du service de Réanimation. L'analyse génomique des facteurs de résistance a été comparée aux résultats des antibiogrammes tandis que les facteurs de virulence identifiés ont été comparés aux données phylogénétiques et aux données cliniques. Les gènes *exoU* et *algP/algR3* codant pour une exotoxine du système de sécrétion de type III et la production d'alginate ont été significativement associés à une plus grande survenue de PAVM.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Réanimation, Séquençage au débit, Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique, Facteur de virulence, Facteur de résistance, Epidémie

Prospective analysis by next generation sequencing of *Pseudomonas aeruginosa* strains of respiratory origin isolated in the intensive care unit of the Limoges hospital

Pseudomonas aeruginosa is frequently isolated from patients hospitalized in intensive care units, and can be responsible of the occurrence of ventilator associated pneumonia (VAP). Next Generation Sequencing (NGS) use in this context allows bacterial analysis in order to better understand its pathogenicity and its resistance to antibiotics. The objective of this monocentric study was to analyze with NGS the populations of *P. aeruginosa* isolated from respiratory samples of patients hospitalized in the Intensive Care Unit of the University Hospital of Limoges from March 2019 to January 2022.

Sixty-nine isolates of *P. aeruginosa* coming from 54 patients were sequenced. Genomic characterization allowed the identification of 37 different sequence types (ST). Due to low single nucleotide polymorphisms (SNP) between strains found in different patients, we were able to identify several microepidemics in the unit. Genomic analysis of resistance were compared to phenotypic resistance on the antibiogram performed at the laboratory and virulence factors were compared to phylogenetic and clinical data. The *exoU* gene encoding an exotoxin of the type III secretion system and the *algP/algR3* encoding alginate production were associated with the development of PAVM. Antibiotic resistance is regulated in very complex way by several genes, in particular in the regulation of the expression of the *ampC* gene coding for the cephalosporinase AmpC. Mutations in fluoroquinolone resistance genes have been associated with phenotypic resistance.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, Intensive Care unit, Next generation sequencing, Ventilator-associated pneumonia, Virulence factor, Resistance factor, Epidemy

