UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER

FACULTÉ DE MEDECINE TOULOUSE

Année 2016 2016 TOU3 1702

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPÉCIALITE BIOLOGIE MÉDICALE

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : 12/05/2016

Par MONTALEGRE Romain

ÉVALUATION DU RISQUE D'ÉMERGENCE DE RÉSISTANCES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* À DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES ANTIPYOCYANIQUES EN RÉANIMATION

DIRECTEUR DE THÈSE GRARE Marion

JURY: Président Madame le Professeur MARTY Nicole

Assesseur Madame le Professeur ROQUES-CESCHIN Christine

Assesseur Madame le Docteur GRARE Marion

Assesseur Monsieur le Docteur GEORGES Bernard

TABLEAU du PERSONNEL HU

des Facultés de Médecine du l'Université Paul Sabatier au 1er septembre 2015

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire M. ROUGE D Doyen Honoraire M LAZORTHES Y Doyen Honoraire M CHAP H M. GUIRAUD-CHAUMEIL B M. PUEL P. Doyen Honoraire M. ESCHAPASSE Professeur Honoraire Professeur Honoraire Mme ENJALBERT Professeur Honoraire M. GEDEON M PASQUIF Professeur Honoraire M. RIBAUT Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. ARLET J. Professeur Honoraire RIBET M. MONROZIES Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. DALOUS Professeur Honoraire M. DUPRE Professeur Honoraire M. FABRE J. Professeur Honoraire M. DUCOS Professeur Honoraire M. LACOMME Professeur Honoraire M. COTONAT Professeur Honoraire M. DAVID Mme DIDIER Professeur Honoraire Professeur Honoraire Mme LARENG M.B. M. BES Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. BERNADET Professeur Honoraire M. REGNIER M. COMBELLES Professeur Honoraire Professeur Honoraire M REGIS Professeur Honoraire M. ARBUS M. PUJOL Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. ROCHICCIOLI M. RUMEAU M. BESOMBES Professeur Honoraire Professeur Honoraire Professeur Honoraire M SUC M. VALDIGUIE Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. BOUNHOURE Professeur Honoraire M. CARTON Professeur Honoraire Mme PUEL J. Professeur Honoraire M GOUZI Professeur Honoraire associé M. DUTAU Professeur Honoraire M. PASCAL M. SALVADOR M. Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. BAYARD Professeur Honoraire M. LEOPHONTE Professeur Honoraire M FABIÉ

Professeur Honoraire M. BARTHE M. CABARROT Professeur Honoraire M DUFFAUT Professeur Honoraire Professeur Honoraire M ESCAT M. ESCANDE Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. PRIS M. CATHALA Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. BAZEX M. VIRENQUE Professeur Honoraire M. CARLES Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. BONAFÉ Professeur Honoraire M. VAYSSE Professeur Honoraire M ESQUERRE Professeur Honoraire M. GUITARD M. LAZORTHES F. Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. ROQUE-LATRILLE Professeur Honoraire M. CERENE Professeur Honoraire M. FOURNIAL Professeur Honoraire M. HOFF Professeur Honoraire M. REME Professeur Honoraire M FAUVEL M. FREXINOS Professeur Honoraire M. CARRIERE Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. MANSAT M. Professeur Honoraire M. BARRET Professeur Honoraire M. ROLLAND Professeur Honoraire M. THOUVENOT Professeur Honoraire M. CAHUZAC M. DELSOL Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. ABBAL Professeur Honoraire M. DURAND M. DALY-SCHVEITZER Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. RAILHAC Professeur Honoraire M. POURRAT Professeur Honoraire M. QUERLEU D. Professeur Honoraire M. ARNE JL M. ESCOURROU J. Professeur Honoraire M. FOURTANER G. Professeur Honoraire M. LAGARRIGUE J. Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. PESSEY JJ. M. CHAVOIN JP Professeur Honoraire Professeur Honoraire M. GERAUD G. Professeur Honoraire M. PLANTE P. M. MAGNAVAL JF Professeur Honoraire

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE
Professeur CUN IE
Professeur MURAT
Professeur MANELFE
Professeur LOUVET
Professeur SARRAMON
Professeur CARATERO
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL
Professeur COSTAGLIOLA

Professeur JL. ADER
Professeur Y. LAZOR THES
Professeur E. LARENG
Professeur F. JOFFRE
Professeur B. BONEU
Professeur H. DABERNAT
Professeur M. BOCCALON
Professeur B. MAZIERES
Professeur E. ARLET-SUAU
Professeur J. SIMON

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN 37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe

P.U. - P.H. 2ème classe

Doyen : JP. VINEL

M. ADOUE Daniel	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépato-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. BUGAT Roland (C.E)	Cancérologie	M. FOURNIE Bemard	Rhumatologie
M. CARRIE Didier	Cardiologie	M. FOURNIÈ Pierre	Ophtalmologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	Mme GENESTAL Michèle	Réanimation Médicale
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. FRAYSSE Bernard (C.E)	Oto-rhino-laryngologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. LANG Thierry	Bio-statistique Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépato-Gastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAVAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MONROZIES Xavier	Gynécologie Obstétrique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
M. MOSCOVICI Jacques	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh	Gériatrie	P.U.	
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie	M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. PRADERE Bernard (C.E)	Chirurgie générale		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
LEMON HOIDER	Loguio	II.	

Professeur Associé de Médecine Générale Dr. MESTHÉ Pierre

3

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe P.U. - P.H. 2ème classe

Doyen: E. SERRANO

M. ACAR Philippe Péd atrie M. ALRIC Laurent Médecine Interne Mme ANDRIEU Sandrine Epidémiologie M. ARLET Philippe (C.E) Médecine Interne M ARNAL Jean-François Physiologie Mme BERRY Isabelle (C.E) Biophysique M. BOUTAULT Franck (C.E) Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie M. BUJAN Louis Urologie Andrologie M. BUSCAIL Louis Hépato-Gastro-Entérologie

M. CANTAGREL Alain (C.E) Rhumatologie M. CARON Philippe (C.E) Endocrinologie M. CHAMONTIN Bernard (C.E) Thérapeutique

M. CHIRON Philippe (C.E) Chirurgie Orthopédique et Traumatologie M CONSTANTIN Amaud Rhumatologie M. COURBON Frédéric Biophysique Mme COURTADE SAIDI Monique Histologie Embryologie M. DELABESSE Eric Hématologie Mine DELISLE Marie-Bernadette (C.E) Anatomie Pathologie M. DIDIER Alain (C.E) Pneumologie M. ELBAZ Meyer Cardiologie M. GALINIER Michel Cardiologie

M. CLOCK Yves Chirurgie Cardio-Vasculaire M GOURDY Pierre Endocnnologie M. GRAND Main (CE) Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis Chirurgie plastique Mme GUIMBAUD Rosine Cancérologie

Endocrinologie Mme HANAIRE Hélène (C.E) M. KAMAR Nassim Néphrologie M. LARRUE Vincent Neurologie M. LAURENT Guy (C.E) Hématologie M. LEVADE Therry (C.E) Biochimie M MALECA/E François (C.E.) Ophtalmologie

M. MARQUE Philippe Médecine Physique et Réadaptation Bactériologie Virologie Hygiène Mme MARTY Nicole M. MASSIP Patrice (C.E) Maladies Infecticuses M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E) Psychiatrie Infantile M. RITZ Patrick Nutrition M. ROCHE Henri (C.E) Cancérologie M ROLLAND Yves Gériatrie M. ROSTAING Lionel (C.E). Néphrologie M. ROUGE Daniel (C.E) Médecine Légale M. ROUSSEAU Hervé (C.E) Radiclogie M. SALVAYRE Robert (C.E) Biochimie M. SCHMITT Laurent (C.E) Psychiatrie M. SENARD Jean-Michel Pharmacologie

Oto-rhino-laryngologie

Médecine du Travail

Chirurgie Digestive

Urologie

Pédatre.

Gynécologie Obstétrique M. VAYSSIERE Christophe

M. VELLAS Bruno (C.E) Gériatrie

M. SERRANO Elie (C.E)

M. SOULAT Jean-Marc

M. SOULIE Michel (C.E)

Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.F.)

M. SUC Bertrand

M. ACCADBLED Franck Chirurgie Infantile M. ARBUS Christophe **Psychiatrie** M. BERRY Antoine Parasitologie M. BONNEVILLE Fabrice Radiologie M HOUNES Vincent Médeane d'urgence Mme BURA-RIVIERE Alessandra Médecine Vasculaire M. CHAUFOUR Xavier Chirurgie Vasculaire M. CHAYNES Patrick Anatomic M. DAMBRIN Camille Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire M. DECRAMER Stéphane Péciatrie M. DELOBEL Pierre Maladies Infectieuses M. DELORD Jean-Pierre Cancérologie

Mme DULY-BOUI IANICK Béatrice Thérapeutique M FRANCHITTO Nicolas Toxicologie M. CALINIER Philippe Chirurgie Infantile M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio Chirurgie Plastique Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Murie Anatomie Pathologique M. HUYGHE Eric Urologie

M. LAFFOSSE Jean-Michel Chirurgie Orthopédique et Traumatologie M. LEGUEVAQUE Pierre Chirurgie Générale et Gynécologique M. MARCHEIX Bertrand Chirurgie thoracique et cardiovasculaire Mme MAZEREEUW Juliette Dematologie M MEYER Nicolas Dematologie

Oto-rhino-laryngologie

M. MINVILLE Vincent Ancethésiologie Réanimation M. MUSCARI Fabrice Chirurgie Digestive M. OTAL Philippo Radiologic M. ROUX Franck-Emmanuel Neurochirurgie M. SAILLER Laurent Médecine Interna M. TACK Ivan Physiologie Mme URO-COSTE Emmanuelle Anatomie Pathologique

M. VERCEZ Sébastien

Professeur Associé de Médecine Générale Pr VIDAL Marc Pr STILL MUNKES André
Professeur Associé en O.R.L
Pr WOISARD Virginie

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL 133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex

	M.C.U P.H.		.U P.H
I. APOIL Pol Andre	Immunologie	Mme ABRAVANEL Florence	Bactériolog e Virologie Hygiène
me ARNAUD Catherine	Epidémiologie	M. BES Jean-Claude	Histologie - Embryologie
BIETH Eric	Génétique	M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
me BONGARD Varina	Epidémiologie	Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
me CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition	Mme CARFAGNA Luana	Pédi <i>a</i> trie
ne CASSAING Sophie	Parasilologie	Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
ne CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation	Mme CAUSSE Elisabeth	Biochimie
CONGY Nicolas	Immunologie	M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
me COURBON Christine	Pharmacologie	M. CHASSAING Nicolas	Génétique
ne DAMASE Christine	Pharmacologie	Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
ne de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie	M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
ne DE MAS Véronique	Hėmatologie	Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
me DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène	M. CORRE Jil	Hématologie
DUBO S Damien	Bactériologie Virologie Hygiène	M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
ne DUGUET Anne-Marie	Médecine Légale	M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
DUPUI Philippe	Physiologie	M DESPAS Fabien	Pharmacologie
FAGUER Starislas	Néphrologie	M FCOUARD Thomas	Pédiatrie
me FILLAUX Judith	Parasitologie	Mme FSQUIRQL Yolande	Médecine du travail
GANTET Pierre	Biophysique	Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
me GENNERO Isabelle	Biochimie	Mme GALINIER Anne	Nutrition
me GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire	Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
HAMDI Safouane	Biochimie	M. GASQ David	Physiologie
me HITZEL Anne	Biophysique	Mmc GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie	Mme CUILBEAU-FRUCIER Céline	Anatomie Pathologique
JALBERT Florian	Stomatologie et Maxillo-Faciale	Mme CUYONNET Sophie	Nutrition
ne JONCA Nathalie	Diologie cellulaire	M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale	Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
ne LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie	M. LAHARRAGUE Patrick	Hématologie
LAURENT Camille	Anatomie Pathologique	M. LAIREZ Olivie	Biophysique et médecine nucléaire
ne LE TINNIER Anne	Médecine du Travail	Mme LAPRIE Anne	Cancérologie
LHERMUSIER Thibault	Cardiologie	M. LEANDRI Roger	Biologie du dével, et de la reproduction
LOPEZ Raphael	Anatomie	Mme LEOBON Céline	Cytologie et histologie
me MONTASTIER Emilie	Nutrition	M. LEPAGE Benoit	Bio-statistique
MONTOYA Richard	Physiologie	Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
me MOREAU Marion	Physiologie	M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével, et de la reproduction
me NOGUEIRA M.L.		Mme NASR Nathalie	Neurologie
. PILLARD Fabien	Biologie Cellulaire	Mme PERIQUE I Brigite	Nutrition
me PRERE Mane-Francoise	Physiologie		
me PUISSANT Bénédicte	Bacténologie Virologie	Mme PRADDAUDE Françoise M. RIMAII HO Jacques	Physiologie Anatomie et Chinurgie Générale
me RAGAB Jarie	Immunologie Biochimie	M RONGIERES Michel	The state of the s
			Anatomie - Chirurg e orthopédique
me RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
me SABOURDY Frédérique	Biochimie	M. TKACZUK Jean	Immunologie
me SAUNE Karine	Bactériologie Virologie	Mme VALLET Marion	Physiologie
SILVA SIFONTES Stein	Réanimation	Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie
SOLER Vincent	Ophtalmologie		
TAFANI Jean-André	Biophysique		120 and 1
TREINER Emmanuel	Immunologie		M.C.U.
me I REMOLLIERES Florence	Biologie du développement	M. BISMUTH Serge	Médecine Génerale
IRICCIRE Jean-Louis	Anatomie et Chirurgie Orthopédique	Mme ROUGE-BUGAT Mane-Eve	Médecine Génerale
VINCENT Christian	Biologie Cellulaire	Mme ESCOURROU Brighte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr DRILLAC Thierry Dr ABITTEBOUL Yves Dr CHICOULAA Bruno Dr IRI-DELAHAYE MOtoko

Dr BISMUTI I Michel Dr BOYER Pierre Dr ANE Serge

DECEMBRE 2015

SOMMAIRE

SOMMAIRE	6
REMERCIEMENTS	9
ABREVIATIONS	11
TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	13
NTRODUCTION	16
PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE	18
I. Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique	18
A. Diagnostic	18
A.1. Diagnostic clinique	18
A.2. Diagnostic microbiologique	19
B. Epidémiologie	21
B.1. Epidémiologie bactérienne	21
B.2. Epidémiologie et multi-résistance	22
C. PAVM et pronostic	24
D. Physiopathologie	24
D.1. Dynamique d'acquisition de P. aeruginosa en réanimation	24
D.2. Dynamique d'acquisition de souches multi-résistantes	27
E. Facteurs de risque de PAVM	28
F. Antibiothérapie des PAVM	29
II. Quelques mots sur <i>P.aeruginosa</i>	30
A. Qui est <i>P. aeruginosa</i> ?	30
B. P. aeruginosa et facteurs de virulence	31
B.1. Facteurs d'adhérence et de motilité de P. aeruginosa	31
B.2. Facteurs de développement du processus infectieux	32
B.3. Facteurs de virulence et résistance aux antibiotiques	34
C. P. aeruginosa et les antibiotiques	34
C.1. P. aeruginosa et bêta-lactamines	34

C.2. P. aeruginosa et aminosides	. 49
C.3. P. aeruginosa et quinolones	51
PARTIE II: MECANISMES DE RESISTANCE DE <i>P. AERUGINOSA</i> ET EVOLUTION AU COURS L'HOSPITALISATION EN REANIMATION, 2013-2014	
I. Objectifs	. 53
II. Matériels et méthodes	. 53
A. Type étude et comité d'éthique	. 53
B. Recueil des souches	. 54
B. Etude des résistances	. 54
C.1. Recueil des concentrations Minimales inhibitrices (CMI)	54
C.2. Interprétation de l'antibiogramme et mécanismes de résistance	55
C.3. Phénotypes de résistance	. 58
C.4. Cinétique des résistances	58
D. Recueil de renseignements cliniques	59
III. Résultats	. 60
A. Nombre de souches - sites de prélèvement	60
B. Mécanismes de résistances et phénotypes de résistances associés	. 61
B.1. Souches résistantes à la ticarcilline-acide clavulanique	. 61
B.2. Souches résistantes à la pipéracilline-tazobactam	62
B.3 Souches résistantes à la ceftazidime	. 63
B.4 Souches résistantes à l'imipénème	. 65
B.5 Souches résistantes au méropénème	. 66
B.6. Résistances associées	. 67
B.7. Acquisition d'enzyme et phénotypes de résistances associées	67
C. Cinétique de résistance	. 68
C.1. Caractéristiques des patients colonisés-infectés à P. aeruginosa	68
C.2. Cinétique de résistance et antibiothérapie	69
D. Infections et colonisations associées par des germes autres que <i>P. aeruginosa</i>	71
D.1. Infections associées	71

D.2. Colonisations associées	72
IV. Discussion	73
CONCLUSION	79
BIBLIOGRAPHIE	80
ANNEXES	86

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Nicole MARTY, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN, merci d'avoir accepté de juger mon travail et de me faire l'honneur d'être membre de ce jury. Croyez en mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Bernard GEORGES, merci de me faire l'honneur d'être membre de ce jury de thèse. Je vous suis particulièrement reconnaissant pour les remarques constructives que vous avez portées à mon projet de thèse.

A Madame le Docteur Marion GRARE, que je remercie chaleureusement d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Je te suis très reconnaissant pour ton aide indispensable, ta sympathie et ta pédagogie.

A Madame le Docteur Maryse ARCHAMBAUD que je remercie de m'avoir fait découvrir cette discipline passionnante qu'est la Bactériologie. Mais aussi aux Docteurs Danielle CLAVE, Damien DUBOIS, Christine SEGONDS, Marie-Françoise PRERE, et Catherine DELMAS.

A l'ensemble des biologistes comme Pamela CHAUVIN, Xavier IRIART, Sophie CASSAING, François LABONNE, Marie DELPECH et Fréderic ALZIEU que j'ai côtoyé et qui m'ont tant apporté professionnellement et humainement durant mon internat.

A ma future femme, Marie-Claire pour son soutien indéfectible, son amour, et l'avenir qu'elle me promet.

A mes parents, qui m'ont soutenu et supporté durant toutes mes études, surtout dans les quelques moments difficiles.

A mon frère, toujours présent, merci particulièrement pour les moments passés ensemble durant notre collocation étudiante.

Aux Techniciens, techniciennes et secrétaires du laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU de Toulouse: Virginie, Laure, Claire, Jocelyne, Manu, Laurent, Véronique, Fabienne, Brigitte, Marie-Pierre, Blandine, Aurélie, Mado, Muriel pour leur aide, leurs qualités humaines, leur écoute et leur talent pédagogique.

A toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse : Brigitte, Cathy, Martine, Annie, Coralie, Séverine, kiki, Geneviève, Eric, Marie-Jo... Ainsi qu'à tous les autres techniciens et techniciennes que j'ai rencontré : au pré-analytique du PTI (Rose-Marie, Sandra, Amélie, Corinne...), en Hématologie (Anne, Laure, Claire, Alex, Gaël, Emilie, Elodie, ...) en biochimie et en garde (Adeline, Audrey, Pascale...) : merci.

A l'ensemble de me co-internes qui ont éclairés mes stages et gardes d'internat, la team bactério : Jean-François, Caroline, Sandrine, Ludovic, Jonathan, Sébastien et Marine mais aussi Patricia, Vincent, Louis, Guillaume, Laura, Jérôme, Alexandre, Agnès, Mickael, Laurie, Céline, Rose-Anne, Christophe, David, Yvan, Arnaud, Jessica, Angèle, Noémie, Raphaëlle. Et enfin à mes derniers co-internes qui m'ont supportés et parfois aidé pour la fin de mon internat : Pierre-Yves, Inès, Hadrien, Hélène, Marion, Etienne, Jérémie, Samuel, Elodie, Morgane, Jules, Louis-Thomas, Carole, Martial, et Karen, merci pour votre bonne humeur et votre humour.

ABREVIATIONS

AAC : N-acétyltransférase A.CS : Aérosols de Colistine

AHL: Acyl-homosérine lactones

AMC: Amoxicilline-acide clavulanique

AMX : Amoxicilline

AN: Amikacine

ANT : O-nucléotidyltransférase

APH: O-phosphotransférase

ATM: Aztréonam

BGN: Bacille Gram négatif

BLSE: Bêta-lactamase à spectre élargi

BMR: Bactérie multirésistante

C1G : Céphalosporine de première génération

C2G: Céphalosporine de deuxième génération

C3G: Céphalosporine de troisième génération

C4G: Céphalosporine de quatrième génération

CAZ: Céftazidime

CCLIN: Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales

CIP: Ciprofloxacine

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CPIS: Clinical pulmonary infection score

CRO: Ceftriaxone

CS: Colistine

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétique

ES-OXA: Extended-Spectrum Oxacillinases

FEP: Céfépime

GES: Guyana extended spectrum

GM: Gentamicine IPM: Imipénème

IN: Infection nosocomiale

KPC: Klebsiella Pneumoniae Carbapénémase

LBA: Lavage broncho-alvéolaire

LPS: Lipopolysaccharides

LVX: Levofloxacine

LZD: Linézolide

MBL: Métallo-bêta-lactamase

MEM : Méropénème MH : Muller-Hinton

MTR : Methronidazole

NDM: New delhi métallo-bêta-lactamase

NT : Non techniqué

OFX : Ofloxacine

OX: Oxacilline

PA: P. aeruginosa

PAMDR: P.aeruginosa Multi Résistant

PAS: P. aeruginosa sensible

PAVM: Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique

PDP: Prélèvement distal protégé

QS: Quorum sensing

RA: Rifampicine

SARM: Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigue

SFAR : Société Française d'Anesthésie Réanimation

SHV: sulfhydryl variable

SST III : Système de sécrétion de type III SXT : Triméthoprime Sulfaméthoxazole

TCC: Ticarcilline-acide clavulanique

TEC: Teicoplanine

TEM: Temoneira

TIC: Ticarcilline

TM: Tobramycine

TZP: Pipéracilline-tazobactam

VA: Vancomycine

VIM: Verona intégron métallo-bêta-lactamase

VM : Ventilation mécanique

TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

<u>Figure 1</u> . Evolution de la résistance (%) de <i>P. aeruginosa</i> à la ceftazidime dans le ser de Réanimation de A) Rangueil et B) Purpan, entre 2013 et 2015	vice 23
<u>Figure 2</u> . Evolution de la résistance (%) de <i>S. aureus</i> à la méticilline dans le service Réanimation de A) Rangueil et B) Purpan, entre 2013 et 2015	e de 23
Figure 3. Evolution de la résistance (%) des Entérobactéries aux C3G (BLSE) dans le ser de Réanimation de A) Rangueil et B) Purpan, entre 2013 et 2015	vice 23
Figure 4. A) <i>P. aeruginosa</i> en culture sur gélose au sang, B) <i>P. aeruginosa</i> en coloration Gram (CHU de Toulouse)	n de 30
Figure 5. Schéma simplifié des systèmes LasR/LasI et RhIR/RhII	32
Figure 6. Exemple d'antibiogramme de P. aeruginosa sauvage	36
Figure 7. P. aeruginosa avec une hyperproduction d'AmpC isolée	38
Figure 8. P. aeruginosa - hyperproduction d'AmpC+ perte de la porine D2	39
Figure 9. P. aeruginosa - BLSE GES-1 et surproduction d'AmpC	41
Figure 10. P. aeruginosa - BLSE GES-1, surproduction AmpC et perte porine D2	41
Figure 11. P. aeruginosa - BLSE SHV-2a et surproduction d'AmpC	42
Figure 12. P. aeruginosa - OXA-19 et Surproduction d'AmpC	42
Figure 13. P. aeruginosa -OXA-19 et Surproduction d'AmpC Test de synergie sur MH a optimisation distance entre les disques (CHU Toulouse)	avec 43
Figure 14. P. aeruginosa: métallo-bêta-lactamase de type VIM	45
Figure 15. Exemples d'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i> avec altération de la porine isolée	D2 46
Figure 16. P. aeruginosa surexpression MexAB-OprM isolée	47
<u>Figure 17</u> . Algorithme décisionnel pour l'exploration des mécanismes de résistance de souches de <i>P. aeruginosa</i> résistantes à la ceftazidime	chez 57
<u>Tableau I</u> . Clinical Pulmonary Infection Score, modifié d'après Klompas 2007	19
<u>Tableau II</u> . Sensibilité et spécificité des différents types d'échantillonnages bronchique	s20
<u>Tableau III</u> . Facteurs de risque d'acquisition de <i>P. aeruginosa</i> en service de soins intenmodifié d'après Cobos-Trigueros et al. 2015	nsifs, 26
<u>Tableau IV</u> . Facteurs de risque d'acquisition de <i>P. aeruginosa</i> en service de soins intenmodifié d'après l'étude Dynapyo	nsifs, 26
<u>Tableau V</u> . Facteurs de risque d'isolement d'une souche de <i>P. aeruginosa</i> multi résista modifié d'après Montero et al 2010	inte, 28

<u>Tableau VI</u> . Classification d'Ambler	37
<u>Tableau VII</u> . Concentrations critiques et diamètres critiques pour les Pseudomo d'après le CASFM 2013	nas 55
<u>Tableau VIII</u> . Phénotypes de résistance et leur interprétation n'ayant pas fait l'objet tests supplémentaires	t de 56
Tableau IX. Nombre d'isolements de P. aeruginosa selon le site de prélèvement	60
<u>Tableau X</u> . Distribution des CMI des antibiotiques d'intérêts chez les souches <i>P. aeruginosa</i> résistantes à l'association ticarcilline-acide clavulanique	de 61
Tableau XI. Fréquence des mécanismes de résistance supposés (déduits l'antibiogramme) à l'origine de la résistance à l'association ticarcilline-acide clavulani	de que 62
Tableau XII. Distribution des CMI des antibiotiques d'intérêts chez les souches <i>P. aeruginosa</i> résistantes à l'association pipéracilline-tazobactam	de 63
Tableau XIII. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistanc l'association pipéracilline-tazobactam	e à 63
Tableau XIV. Distribution des CMI des antibiotiques d'intérêts chez les souches <i>P. aeruginosa</i> résistantes à la ceftazidime	de 64
Tableau XV. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistance à ceftazidime	à la 64
<u>Tableau XVI</u> . Distribution des CMI des antibiotiques d'intérêts chez les souches <i>P. aeruginosa</i> résistantes à l'imipénème	de 65
Tableau XVII. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistanc l'imipénème	e à 66
<u>Tableau XVIII</u> . Distribution des CMI des antibiotiques d'intérêts chez les souches <i>P. aeruginosa</i> résistantes au méropénème	de 66
Tableau XIX. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistance méropénème	e au 67
Tableau XX. Résistances associées selon la résistance des bêta-lactamines étudiée	67
Tableau XXI. Phénotype de résistance des souches de <i>P. aeruginosa</i> ayant acquis enzyme telle qu'une BLSE, oxacillinase à spectre élargi, carbapénèmase	une 68
Tableau XXII. Résumé des caractéristiques étudiées dans les 3 groupes	68
Tableau XXIII. Antibiotiques reçus et nombre de jours de traitement chez les patie ayant sélectionnés comme mécanisme de résistance l'imperméabilité et/ou surexpression d'efflux	
<u>Tableau XXIV</u> . Antibiotiques reçus et nombre de jours de traitement chez les patie ayant sélectionnés comme mécanisme de résistance une surproduction d'AmpC	ents 70

Tableau XXV.Germes autres que P. aeruginosa responsables d'une infection associée àl'isolement d'une souche de P. aeruginosa sur le même site de prélèvement71Tableau XXVI.Germes autres que P. aeruginosa responsables d'une colonisation associéeà l'isolement d'une souche de P. aeruginosa sur le même site de prélèvement72

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa est le principal représentant de la famille des Pseudomonadacæ. C'est un bacille à Gram négatif, aérobie stricte, capable de survivre dans l'environnement: les eaux, les végétaux, les plantes d'agréments constituent un milieu naturel où se développe la bactérie tant à l'intérieur qu'en dehors de l'hôpital. Chez l'Homme, P. aeruginosa peut vivre en saprophyte des cavités naturelles (conduit auditif externe, rhinopharynx, tractus digestif et/ou génital, plis cutanés humides), mais peut aussi devenir un pathogène opportuniste chez les patients fragilisés, posant ainsi des problèmes préoccupants dans les hôpitaux en raison de sa fréquence, de sa dissémination dans l'environnement, et de sa résistance aux antibiotiques. Il possède un génome complexe et de grande taille, ceci est directement lié à sa capacité d'adaptation et de résistance aux antibiotiques. En effet, il est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques. Aucune des principales familles d'antibiotiques utilisées actuellement contre les bacilles à Gram négatif n'est épargnée : que ce soit les bêta-lactamines, les aminosides, ou les guinolones. Ses nombreuses résistances associées ainsi que ses capacités d'adhésion sous forme de biofilm font de P. aeruginosa une bactérie extrêmement difficile à éradiquer et une des principales causes d'infection nosocomiale (IN) ou d'infections associées aux soins (IAS). Cette bactérie est ainsi la troisième bactérie la plus fréquemment retrouvée dans les infections nosocomiales tous services et sites infectieux confondus, derrière Escherichia coli et Staphylococcus aureus. Les infections urinaires, les pneumopathies et les infections sur site opératoire représentent les principaux sites d'isolement de P. aeruginosa (1).

En Réanimation, *P.aeruginosa* est une bactérie fréquemment mise en cause dans les infections, en particulier dans les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) qui représentent plus de 50% des infections nosocomiales rencontrées en Réanimation (2) et est responsable d'une mortalité variant de 20 à 50 % (probablement plus chez les patients infectés avec des germes pathogènes résistants) (3).C'est pourquoi, de par sa résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques, sa capacité à acquérir une résistance à tous les traitements et à son rôle fréquent dans les infections sévères, *P. aeruginosa* représente aujourd'hui une problématique préoccupante dans nos hôpitaux.

C'est pour cela que nous avons souhaité nous intéresser à la place de *P. aeruginosa* dans les infections chez les patients du service de Réanimation de Rangueil, au CHU de Toulouse; en se focalisant plus particulièrement sur l'évolution de la résistance aux antibiotiques de cette bactérie au cours de l'hospitalisation. Après une 1ère partie bibliographique s'intéressant au rôle de *P. aeruginosa* dans les infections en Réanimation et aux mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par cette bactérie, nous présenterons les objectifs de notre étude. Après un bref explicatif de matériel et méthodes, nous discuterons des principaux résultats de notre étude, et élargirons ensuite la discussion vers l'impact de ces résultats sur la prise en charge des patients. Les résultats de ce travail ont été présentés à European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseses (ECCMID) de 2016 sous forme de poster.

PARTIE I: BIBLIOGRAPHIE

I. Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique

Une PAVM correspond à toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine soit de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal ou d'une trachéotomie, soit de manière non invasive par l'intermédiaire d'un masque facial ou d'un autre procédé dans les 48 h précédant la survenue de l'infection (4). On distingue les PAVM précoces survenant dans un délai de 5 à 7 jours de ventilation, des PAVM tardives survenant au-delà de 7 jours de ventilation (5).

A. Diagnostic

Le diagnostic d'une PAVM est souvent difficile, en effet, les signes cliniques ainsi que les signes radiologiques ne sont pas spécifiques, aucun examen simple et non-invasif ne possède une sensibilité et spécificité satisfaisante (6).

A.1. Diagnostic clinique

Il repose sur la présence de signes cliniques et biologiques tels que :

- l'hyperthermie supérieure à 38°C sans autres causes ou l'hypothermie inférieure à 36°C
- l'apparition de sécrétions respiratoires purulentes
- l'aggravation de l'état hémodynamique et/ou respiratoire (désaturation, altération des gaz du sang) sans autres raisons évidentes
- l'hyperleucocytose au-delà de 12 G/L ou la leucopénie inférieure à 4 G/L (5).

La suspicion de PAVM sera encore plus forte en présence d'un contexte évocateur comme une ventilation mécanique (VM) prolongée par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal, des intubations répétées ou dans le cas de patients comateux, polytraumatisés, présentant une défaillance multi viscérale, un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une maladie pulmonaire chronique, ou une immunodépression (5).Enfin, l'apparition, la modification ou simplement la présence d'images radiologiques compatibles sont aussi des arguments en faveur d'une PAVM (5).

Afin de faciliter le diagnostic d'une PAVM, Pugin *et al.* proposent d'associer les critères cliniques en un score : Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS). Ce score associe 6 variables : température, taux de leucocytes, oxygénation (PaO₂ et FiO₂), aspect de la

radiographie pulmonaire, volume et aspect des sécrétions trachéales et résultat des cultures d'une aspiration endo-trachéale (*Tableau I*). Ce score va de 0 à 12, un score strictement supérieur à six est en faveur d'une PAVM (7). Malheureusement, ce score est controversé et ne semble pas avoir une sensibilité et spécificité suffisante pour le diagnostic d'une PAVM (77% de sensibilité et 44% de spécificité) (6)(8).

Tableau I. Clinical Pulmonary Infection Score, modifié d'après Klompas 2007(9).

Paramètres	Points
Température (°C)	
36,5-38,4	0
38,5-38,9	1
<36 ou >39	2
Leucocyte (G/L)	
4,0-11,0	0
<4 ou >11	1
Band forms>0,5	ajouter 1
Sécrétions trachéales	
absence	0
non purulentes	1
purulentes	2
Oxygénation PaO2/FiO2 (mmHg)	
>240 ou SDRA	0
<240 et/ou absence SDRA	2
Radiographie thorax	
pas infiltrat	0
infiltrat diffus	1
infiltrat localisé	2
Culture aspiration trachéale	
Absence de bactérie pathogène ou stérile	0
Présence de bactéries pathogènes	1
Présence de bactéries pathogènes concordant avec	
l'examen microscopique au GRAM	2

A.2. Diagnostic microbiologique

On dispose schématiquement de deux types de méthodes pour documenter microbiologiquement une PAVM, les méthodes non-invasives (aspiration endo-trachéale essentiellement) et les méthodes invasives : lavage broncho-alvéolaire (LBA), mini LBA et prélèvement distal protégé (PDP).

Les méthodes dites non invasives présentent l'avantage d'être moins sujettes aux complications : hypoxémie essentiellement voire hémoptysies ou pneumothorax dans le cas d'un brossage télescopique protégé (10). Elles sont cependant beaucoup moins

sensibles et spécifiques, car présentent un haut risque de contamination par la flore salivaire.

Au laboratoire, les prélèvements sont examinés microscopiquement avant leur mise en culture. Concernant les aspirations endo-bronchiques et endo-trachéales, l'examen microscopique permet d'évaluer dans un premier temps, après coloration au May-Grunwald-Giemsa, à faible grossissement, la qualité du prélèvement : le degré de contamination salivaire est reflété par la présence de cellules épithéliales. L'étape suivante est la recherche à fort grossissement, après coloration de Gram, des différents morphotypes bactériens : on recherchera une flore monomorphe et/ou la présence de bactéries dans les polynucléaires, qui sont des critères en faveur d'une infection (11).

La mise en culture des prélèvements respiratoires doit être aussi rapide que possible pour éviter la perte de viabilité des pathogènes et la prolifération des commensaux. Les milieux de cultures sont incubés, en aérobiose en présence ou non de 5% de CO₂, 48 heures pour les prélèvements non protégés et 5 jours pour les prélèvements bronchoscopiques (11).

L'interprétation de l'examen cyto-bactériologique des sécrétions broncho-pulmonaires est particulièrement délicate. En effet, il s'agit pour le biologiste de confronter les résultats de l'examen microscopique, des résultats quantitatifs de la culture, aidée du contexte clinique afin d'évaluer la valeur prédictive des isolements en culture. Le Tableau II résume les performances des différents prélèvements et des différentes techniques diagnostiques utilisées au laboratoire.

Tableau II. Sensibilité et spécificité des différents types d'échantillonnages bronchiques après l'examen direct et la mise en culture (d'après la Société Française d'Anesthésie Réanimation : pneumopathie acquise sous ventilation 2009).

Type de prélèvements	Sensibilité	Spécificité
Aspiration trachéale qualitative	(57%-88%)	(14%-33%)
Aspiration trachéale quantitative ≥10 ⁶	76 ± 9%	75 ±2 8%
Aspiration tracheate quantitative ≥10	(38% - 82%)	(72% - 85%)
Echantillonnage distal non fibroscopique PDP, mini-LBA (≥10³)	(63% - 100%)	(66% - 96%)
DTD 61	66 ± 19%	90 ± 15%
BTP sous fibroscopie ≥10 ³	(33% - 100%)	(50% - 100%)
LBA sous fibroscopie ≥10 ⁴	73 ± 18%	82 ± 19%
LBA sous libroscopie ≥ to	(42% - 93%)	(45% - 100%)

LBA : lavage broncho alvéolaire; PDP : prélèvement distal protégé; BTP:brosse télescopique protégé

La prise en charge invasive semble permettre de diminuer la mortalité ainsi que la consommation d'antibiotiques (en évitant un traitement à tort d'une PAVM) (8). En France, la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR) préconise la stratégie dite « invasive » car supérieure en terme de qualité de l'antibiothérapie (moins d'antibiothérapie initiale, réduction de la consommation d'antibiotiques) et permettant de diagnostiquer plus fréquemment des infections extra-pulmonaires (5). Toutefois, l'usage de l'aspiration endo-trachéale afin de connaitre la colonisation de l'arbre trachéobronchique semble intéressant pour guider l'antibiothérapie probabiliste dans le cas de PAVM suspectées à germes multi-résistants (12).

B. Epidémiologie

Compte-tenu des problèmes diagnostiques que soulèvent les PAVM, il n'est pas surprenant que la documentation microbiologique de celles-ci ne soit pas toujours présente (13). Malgré cela lorsque l'on identifie la ou les bactéries en cause, il semblerait que la plupart des PAVM soit mono-microbienne (14).

B.1. Epidémiologie bactérienne

On différencie les micro-organismes responsables de PAVM précoces (moins de 5 à 7 jours de ventilation mécanique) et les micro-organismes responsables de PAVM dites tardives (plus de 5 à 7 jours de ventilation mécanique). Le délai d'apparition des pneumopathies en Réanimation étant en moyenne de 9 jours, les PAVM tardives sont largement plus représentées que les PAVM précoces (2).

Bien que l'étiologie bactérienne des PAVM dépende de l'écologie du service ainsi que de la population concernée (15), les nombreuses études faites à ce sujet montre une distribution globalement identique. A savoir, pour les PAVM dites tardives, on retrouve des bactéries dites nosocomiales, par ordre de fréquence *P. aeruginosa* puis les Entérobactéries, avec en chef de file *E.coli* et *K.pneumoniae*, et *S.aureus* dans un ordre variable selon les études, et enfin *Acinetobacter spp.* et *S. maltophilia* (3)(13)(16). Les PAVM précoces sont causées par des bactéries de la flore oropharyngée, on les retrouve aussi à l'origine d'infections pulmonaires communautaires. Il s'agit d'*H.influenzae*, de *S.pneumoniae* et de *S.aureus*.

B.2. Epidémiologie et multi-résistance

La fréquence de découverte d'une bactérie résistante à de nombreux antibiotiques utilisés en thérapeutique par accumulation de résistances naturelles et acquises, (on parle de bactérie multi-résistante ou BMR), dans les PAVM, dépend de la présence ou de l'absence de facteurs de risques qui sont :

- une antibiothérapie préalable
- une hospitalisation dans les 90 jours précédents
- une hospitalisation actuelle de plus de 5 jours
- une durée de ventilation mécanique (VM) supérieure à 5 jours
- une prise en charge dans un centre de dialyse ou dans un centre de long séjour ou maison médicalisée,
- une immunodépression (maladie ou traitement)
- -une prévalence élevée de BMR dans la communauté ou dans l'hôpital ou l'unité de Réanimation
- et enfin si le malade est déjà connu comme étant colonisé par une BMR (5).

P. aeruginosa est considéré le plus souvent comme étant une BMR lorsqu'il présente une résistance acquise à la ceftazidime et/ou aux carbapénèmes.

L'étude du réseau REA-RAISIN en 2012 a repris les principales résistances des bactéries d'intérêt en Réanimation en France. Elle retrouve chez *P. aeruginosa* une résistance à la ceftazidime dans 23,6% des cas contre 26,2% en 2004, et une résistance à l'imipénème dans 23,4% des cas. La résistance à la méticilline de *S.aureus* dans les services de Réanimation continue de décroitre pour atteindre 25,5% en 2012 (48,7% en 2004). La résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) parmi les souches d'Entérobactéries n'a cessé d'augmenter et se retrouve à 38,8% en 2012 (17,8% en 2004) avec 17,5% de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) (9,9% en 2005). *A. baumannii* présente une résistance à la ceftazidime dans 52,3% des cas contre 75,7% des cas en 2004 ainsi qu'une résistance à l'imipénème dans 39,3% des cas(2).

Des travaux similaires ont été menés en 2013, 2014 et durant l'année 2015 dans les services de Réanimation de Rangueil et Purpan du CHU de Toulouse et montrent une tendance identique, à savoir une baisse des résistances de *P. aeruginosa* à la ceftazidime

(Figure 1), une diminution des SARM (Figure 2) et a contrario une baisse des Entérobactéries BLSE (Figure 3).

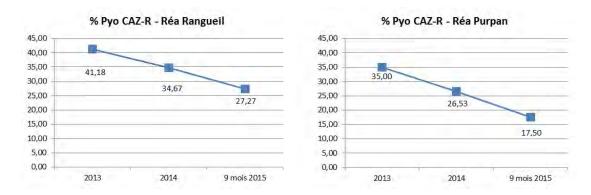


Figure 1.Evolution de la résistance (%) de P. aeruginosa à la ceftazidime dans le service de Réanimation de A) Rangueil et B) Purpan, entre 2013 et 2015.

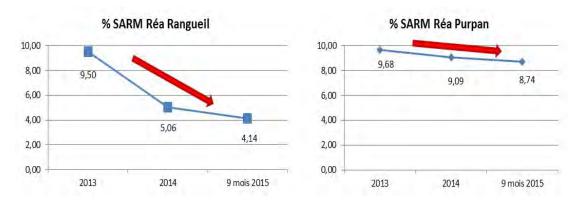


Figure 2.Evolution de la résistance (%) de S. aureus à la méticilline dans le service de Réanimation de A) Rangueil et B) Purpan, entre 2013 et 2015.

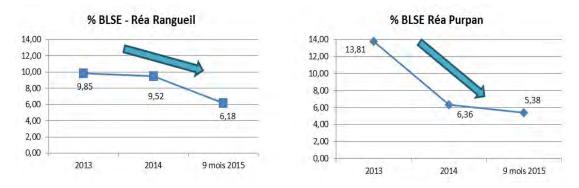


Figure 3.Evolution de la résistance (%) des Entérobactéries aux C3G (BLSE) dans le service de Réanimation de A) Ranqueil et B) Purpan, entre 2013 et 2015.

C. PAVM et pronostic

Les PAVM comme toutes les infections en Réanimation entraînent une augmentation significative de la mortalité, de la morbidité, de la durée et donc du coût de l'hospitalisation (17). Le pronostic et donc la mortalité semblent liés à plusieurs facteurs dont la sévérité de la pathologie diagnostiquée, la présence de comorbidités, la capacité de l'hôte à répondre à l'infection, ou encore la rapidité d'installation d'un traitement adapté et efficace sur le germe en cause (13). L'étiologie bactérienne (le fait que l'infection soit due à un *S. aureus*, à une Entérobactérie ou à un *P. aeruginosa* par exemple) ne semble pas être un facteur influençant sur la mortalité. En revanche, la présence d'une BMR, qui diminue la probabilité d'un traitement probabiliste d'emblée adapté et donc retarde la mise en place d'une antibiothérapie adaptée, provoque indirectement une augmentation de la mortalité (13)(14)(18). Parallèlement, la sévérité de la PAVM ne semble liée ni à l'étiologie bactérienne ni même à la présence d'une BMR (13). Ainsi, pour le choix de l'antibiothérapie probabiliste, il convient non pas de choisir selon la gravité de la pathologie mais plutôt selon le risque de la présence d'une BMR(13).

A l'avenir, une compréhension plus détaillée des pathogènes multi-résistants et une détection précoce des BMR, en augmentant le taux d'antibiothérapie initiale adaptée, permettrait de réduire la mortalité de ces pathologies (16).

D. Physiopathologie

Si l'implication de *P. aeruginosa* est si importante dans les PAVM en Réanimation c'est parce un grand nombre de facteurs concomitants permettent l'acquisition, la colonisation puis la sélection d'une bactérie opportuniste capable de devenir rapidement résistante aux antibiotiques.

L'objectif de ce chapitre est de mieux comprendre les dynamiques d'acquisition et de persistance de *P. aeruginosa* en Réanimation, en particulier dans les infections respiratoires.

D.1. Dynamique d'acquisition de P. aeruginosa en réanimation

La colonisation par *P. aeruginosa* du patient en Réanimation est la première étape avant l'infection. *P. aeruginosa* est parfois déjà représenté parmi la flore endogène (digestive, oro-pharyngée, trachéale, cutanée ou encore génitale) du patient à l'admission. Cependant, l'analyse par biologie moléculaire des souches de *P. aeruginosa* retrouvées

dans les services de Réanimation en France montre que ces souches sont le plus souvent des clones partagés patient-patient ou eau-patient (19). Ainsi l'acquisition exogène, c'est-à-dire la transmission via un réservoir, semble être le modèle le plus fréquent concernant l'acquisition de *P. aeruginosa* en Réanimation. Cette transmission est soit croisée, à partir d'un autre patient via les mains du personnel soignant ou des dispositifs médicaux, soit environnementale à partir d'un réservoir d'eau via les mains du personnel soignant ou des dispositifs médicaux ou liée à l'utilisation de l'eau pour les soins (19).

En France, l'étude Dynapyo a découvert que 11% à 21% des patients de Réanimation semblent acquérir et être colonisés par *P. aeruginosa*. Compte-tenu du mode le plus fréquent d'acquisition de *P. aeruginosa*, ce chiffre dépend étroitement de l'écologie du service, mais aussi de son organisation, des pratiques ainsi que du recrutement des patients. Elle retrouve aussi un délai médian pour l'acquisition et la colonisation à *P. aeruginosa* de 9 jours puis un délai médian entre colonisation et infection de 7 jours si infection il y a par la suite (19).

Plusieurs facteurs favorisent la colonisation du tractus respiratoire par *P. aeruginosa*, certains dépendent du patient comme :

- un antécédent de colonisation/infection à P. aeruginosa
- la modification de la flore endogène liée à la gravité de la maladie sous-jacente entraînant l'hospitalisation
- -d'autres pathologies sous-jacentes ou facteurs de comorbidités (bronchopneumopathies chronique obstructive, asthme, mucoviscidose par exemple)
- de précédents séjours à l'hôpital et/ou un séjour prolongé
- un mauvais état nutritionnel
- un traitement antibiotique préalable
- la présence de matériel étranger (sonde d'intubation ou de trachéotomie pour une ventilation mécanique, sonde urinaire, cathéter veineux et artériel, sonde nasogastrique, nutrition parentérale)
- et enfin l'âge(19).

Les tableaux III et IV résument ces facteurs de risque.

Tableau III. Facteurs de risque d'acquisition de P. aeruginosa en service de soins intensifs, modifié d'après Cobos-Triqueros et al. 2015 (20).

Paramètres	OD Ration (95% IC)	
	OD Ration (95% IC)	P-value
Choc	2,1 (1,2-3,7)	0,01
Intubation		
1-3jours	2,5 (1,2-5)	0,01
>3 jours	3,6 (1,7-7,5)	0,001
Trachéotomie	4,4 (2,3-8,3)	<0,001
Nutrition entérale		
1-3 jours	3,6 (1,8-7,6)	0,001
>3jours	1 (05-2,1)	1
Nutrition parentérale		
1-3 jours	3,9 (1,6-9,6)	0,003
>3jours	1,1 (0,6-2,2)	0,7
Exposition antérieure aux		
fluoroquinolones	1,88 (1,1 à 3,3)	0,03
1-3 jours	0,5 (0,2-1,2)	0,2
>3 jours	0,4 (0,2-0,8)	0,01

Tableau IV. Facteurs de risque d'acquisition de P. aeruginosa en service de soins intensifs, modifié d'après l'étude Dynapyo.

Paramètres	OR	95% IC	Р
Infection/Colonisation antérieure àP. aeruginosa	3,78	1,80-7,97	0,001
Durée cumulée ventilation mécanique (10 jours)	2,56	1,16-4,50	0,001
Durée cumulée antibiothérapie inactive sur <i>P. aeruginosa</i>	1,85	1,33-2,57	<0,001
Point eau contaminé par <i>P.</i> aeruginosa dans sa chambre	1,76	1,09-2,84	0,02

Concernant l'antibiothérapie préalable, l'usage d'antibiotiques inactifs sur *P. aeruginosa* (21)(22) comme l'amoxicilline-acide clavulanique et les glycopeptides (20), ainsi que de l'association pipéracilline-tazobactam(TZP) et les aminosides, semble être un facteur favorisant l'acquisition et la colonisation par *P. aeruginosa*. Contrairement à l'usage des C3G (ceftazidime) actives sur *P. aeruginosa* ainsi que des fluoroquinolones, qui semblent prévenir l'acquisition de *P. aeruginosa*(20)(22).

D'autres facteurs favorisants dépendent du service, dont la présence d'un point d'eau contaminé par *P. aeruginosa*, d'un patient proche ou éloigné colonisé ou encore la colonisation du patient antérieur occupant la chambre (19)(23).

Enfin, les derniers facteurs favorisants concernent *P. aeruginosa* lui-même et ses capacités d'adhésion aux cellules du tractus respiratoire ainsi qu'aux surfaces abiotiques telles que le verre ou le plastique, principaux constituants des dispositifs médicaux utilisés (19). Ces facteurs de virulence seront développés dans le chapitre II consacré à cette bactérie.

D.2. Dynamique d'acquisition de souches multi-résistantes

La définition de multi résistance pour une souche de *P. aeruginosa* reste variable selon les auteurs, certains considèrent *P. aeruginosa* comme une BMR s'il est résistant à la ceftazidime, d'autres s'il est résistant à la ceftazidime et aux carbapénèmes et enfin d'autres seulement s'il est résistant à tous les antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique (bêta-lactamines, aminosides et quinolones). En France, le Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales (CCLIN) considère *P. aeruginosa* comme une BMR à partir du moment où celui-ci est résistant à la ceftazidime.

L'acquisition d'une souche de *P. aeruginosa* dite « multi-résistante » en Réanimation est possible soit par transmission croisée soit par acquisition de résistances, sous la pression de sélection exercée par les antibiotiques, d'une souche ayant préalablement colonisé le patient (24).

Pour rappel, les facteurs de risques « classiques » d'acquisition d'une BMR sont :

- une antibiothérapie préalable,
- une hospitalisation dans les 90 jours précédents,
- une hospitalisation actuelle de plus de 5 jours,
- une durée de ventilation mécanique (VM) supérieure à 5 jours,
- une prise en charge dans un centre de dialyse ou dans un centre de long séjour ou maison médicalisée,
- une immunodépression (maladie ou traitement),
- -une prévalence élevée de BMR dans la communauté ou dans l'hôpital ou l'unité de Réanimation,
- et enfin si le malade est déjà connu comme étant colonisé par une BMR(5).

En plus de ces facteurs de risque, plusieurs travaux ont démontrés une corrélation entre l'usage de certains antibiotiques et la présence d'une souche de *P. aeruginosa* multirésistante. Ainsi les carbapénèmes (le méropénème en particulier), les fluoroquinolones et les pénicillines actives sur *P. aeruginosa* (pipéracilline- tazobactam par exemple), semblent susceptibles de sélectionner une souche multi-résistante, soit par acquisition de nouveaux mécanismes de résistances par une souche sensible colonisant ou infectant préalablement le patient, soit par acquisition directe d'une souche multi-résistante. Toutefois les molécules les plus à risque semblent être le méropénème et la ciprofloxacine (20)(25)(26). Le tableau V résume les principaux antibiotiques susceptibles de sélectionner une souche de *P. aeruginosa* multirésistante.

Tableau V. Facteurs de risque d'isolement d'une souche de P. aeruginosa multi résistante, modifié d'après Montero et al 2010 (26).

	non PA ve	non PA versus PAMDR		PAS versus PAMDR	
Antibiothérapie	OD	р	OD	Р	
Quinolones	1,79	0,001	15,25	<0,001	
Carbapénèmes	2,26	0,002	3,53	<0,001	
Anti PA pénicillines	1,09	0,816	2,79	0,035	

PA=P. aeruginosa PAMDR=P. aeruginosa Multi Résistant PAS=P. aeruginosa sensible

E. Facteurs de risque de PAVM

On retrouve comme facteurs de risques de PAVM la totalité des facteurs de risques de colonisation à *P. aeruginosa*. On s'aperçoit ainsi que les patients de Réanimation conjuguent un grand nombre de facteurs en faveur des PAVM. En effet, ils sont le plus souvent âgés, présentant des pathologies graves et donc les rendant fragiles, sont souvent infectés et donc fréquemment sous antibiothérapie et souvent sous ventilation mécanique. Ils restent hospitalisés pendant un temps généralement long dans le service et parfois viennent d'autres services (27).

F. Antibiothérapie des PAVM

Parmi les infections nosocomiales (IN) en Réanimation, les PAVM sont probablement l'une des ou la plus sévère(s). Le lien entre la mortalité et la précocité d'un traitement approprié n'est plus à démontrer. Ainsi, l'antibiothérapie probabiliste doit être mise en place « le plus rapidement possible », en pratique dès que le prélèvement bactériologique, quel qu'il soit, est réalisé, sans en attendre le résultat (5).

Le choix de l'antibiothérapie initiale dépend essentiellement de la présence ou de l'absence de facteurs de risques de présence de BMR. Concernant les PAVM tardives et/ou en cas de présence de facteurs de risque de BMR, l'antibiothérapie probabiliste initiale se doit de cibler les Entérobactéries, y compris les Entérobactéries du groupe 3, P. aeruginosa, A. baumannii et S. aureus méticilline résistant (SARM). On utilise pour cela des 4 bêta-lactamines suivantes : pipéracilline-tazobactam, ceftazidime, une carbapénèmes (imipénème, méropénème) ou céfépime, en association avec un aminoside (généralement l'amikacine). A ces antibiotiques, il est possible d'ajouter de la vancomycine si le malade est porteur de SARM, s'il existe une forte prévalence de SARM dans l'unité, si le patient vient de soins de suite/long séjour, s'il est hémodialysé chronique ou en état de choc. Une association d'antibiotiques s'impose chaque fois qu'il existe un facteur de risque de BMR, l'objectif étant d'élargir le spectre de cette antibiothérapie initiale empirique. Actuellement, l'association d'une bêta-lactamine à large spectre avec un aminoside semble la plus appropriée (5)(12). En relation avec la politique d'épargne des carbapénèmes, des recommandations formalisées d'experts parus en juin 2014 prônent l'usage de carbapénèmes comme bêta-lactamines à large spectre en probabiliste, seulement en cas d'infections bactériennes nosocomiales sévères et en présence d'au moins 2 critères parmi :

- un traitement antérieur par C3G ou fluoroquinolones ou l'association pipéracillinetazobactam dans les 3 mois,
- le portage d'une Entérobactérie productrice de BLSE ou d'un *P. aeruginosa* résistant à la ceftazidime sur un prélèvement de moins de 3 mois,
- une hospitalisation à l'étranger dans les 12 mois,
- le fait pour un patient de vivre en établissement d'hébergement pour adultes âgés dépendantes (EHPAD) ou dans un service de soins de longue durée,
- -le fait d'être porteur d'une sonde à demeure et/ou d'une gastrostomie,

- une épidémie en cours dans le secteur de soins à BMR et pour laquelle l'unique option thérapeutique est un carbapénème (12).

La durée du traitement reste encore floue, même si la plupart des PAVM peuvent être traitées en 8 jours. Pour des infections à *P. aeruginosa*, dans le but de réduire le risque de rechute, on préconise actuellement une durée allant de 10 à 14 jours. Cependant, il n'est pas certain que l'on diminue le risque de rechute en prolongeant le traitement si le patient reste soumis à une ventilation mécanique par tube endo-trachéal, il est par contre admis que le risque de sélectionner des souches plus résistantes est d'autant plus augmenté que la durée du traitement est longue (5).

II. Quelques mots sur P.aeruginosa

A. Qui est P. aeruginosa?

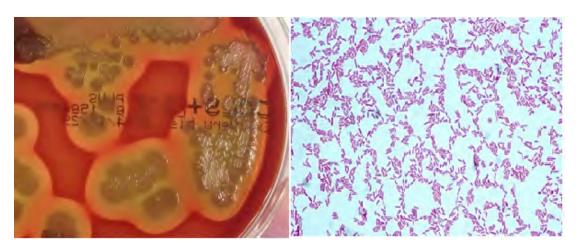


Figure 4. A) P. aeruginosa en culture sur gélose au sang, B) P. aeruginosa en coloration de Gram.

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif, aérobie strict, mobile, capable de se multiplier sur milieux usuels, oxydase négative. Sa température optimale de croissance est de 30°C mais il est capable de se développer jusqu'à 41°C contrairement aux autres Pseudomonas. Sur milieux gélosés, les colonies présentent le plus souvent un aspect dit « métallique » ou « reflet métallique », parfois elles prennent plutôt un aspect « mucoide ». Parfois bêta-hémolytiques, les colonies dégagent une odeur caractéristique de fleur de seringa et produisent le plus souvent des pigments : la pyocyanine (bleu vert) et la pyoverdine (jaune vert) et plus rarement la pyorubine (rouge). C'est une bactérie

ubiquitaire que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux. On peut occasionnellement l'isoler des flores commensales de l'homme et des animaux.

L'identification après isolement au laboratoire est plutôt aisée, en effet le plus souvent les colonies sont caractéristiques de la bactérie, l'odeur dégagée par les colonies confirme l'aspect évocateur des colonies, enfin le test de l'oxydase (positive) éliminera une Entérobactérie en cas de doute. Dans un deuxième temps, une identification par spectrométrie de masse ou par méthode biochimique/enzymatique confirmera l'identification. Enfin, si un antibiogramme est réalisé, la découverte d'un phénotype de résistance compatible avec l'identification *P. aeruginosa* entérinera définitivement l'identification de celui-ci.

B. P. aeruginosa et facteurs de virulence

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence (membranaires et extracellulaires) agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement. Ils comprennent notamment : des facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P. aeruginosa* permettant la colonisation de l'hôte, et des toxines et protéases qui provoquent des lésions tissulaires facilitant aussi la multiplication et la dissémination bactérienne dans les tissus de l'hôte.

B.1. Facteurs d'adhérence et de motilité de P. aeruginosa

De nombreuses molécules vont participer à l'adhésion et au développement de P. aeruginosa sur différents milieux comme les cellules du tractus respiratoire ou encore des surfaces abiotiques constituant les dispositifs médicaux tels que les sondes d'intubation par exemple.

L'attachement initial des bactéries mobiles sur la surface fait intervenir un certain nombre d'adhésines, dont les facteurs d'attachement de type *fimbriae* et le flagelle (28). Les bactéries se déplacent ensuite sur la surface selon le mode de déplacement de type *twitching* (en reptation) grâce à l'extension et à la rétraction des pili de type IV qui se polymérisent et se dépolymérisent successivement, permettant ainsi la colonisation de la surface et le rassemblement en micro colonies, point de départ de l'infection (29).

B.2. Facteurs de développement du processus infectieux

La synthèse et la sécrétion de la plupart des facteurs de virulence sont modulés en fonction du stade de croissance de la bactérie, du mode de développement (planctonique ou biofilm) et des conditions environnementales. Chez *P. aeruginosa*, le quorum sensing (QS) est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité. Ce système de régulation est basé sur la capacité des bactéries à communiquer entre elles, leur permettant de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire. La communication bactérienne repose sur la production de molécules diffusibles, des N-acyl-homosérine lactones (AHL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces AHL sont synthétisés par une AHL-synthase codée par un gène de type I (inducteur). Lorsque la concentration de ces molécules diffusibles atteint un certain seuil, elles se lient au régulateur transcriptionnel de type R. Le complexe ainsi formé va activer la transcription de gènes de virulence mais également du gène I, d'où le terme de molécules auto-inductrices. Deux systèmes de quorum sensing ont été caractérisés chez *P. aeruginosa*: il s'agit de LasR/Lasl et de RhIR/RhII(30). Ces systèmes sont représentés schématiquement Figure 5.

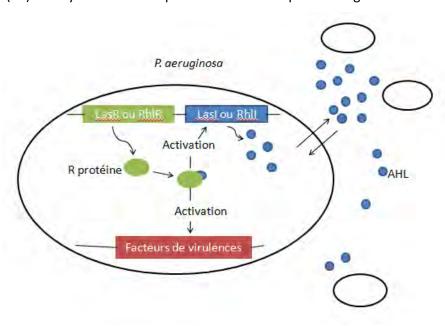


Figure 5. Schéma simplifié des systèmes LasR/LasI et RhIR/RhII.

La synthèse de nombreuses molécules est ainsi régulée comme l'exotoxine A qui entraîne un arrêt de la synthèse protéique et provoque la mort de la cellule cible par nécrose (28), ou l'élastase qui clive de très nombreuses molécules de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, fibrinogène, récepteurs d'opsonisation...) et contribue ainsi à l'invasion du parenchyme pulmonaire (31), ou encore les phospholipases C, la protéase alcaline et les protéases IV (28). Le QS régule aussi la synthèse des rhamnolipides qui sont des glycolipides extracellulaires qui perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain, et inhibent la phagocytose (28). Enfin, le QS semble réguler la synthèse de chromophores tels que la pyoverdine et la pyocyanine. La pyoverdine est une petite molécule de chélation du fer de l'environnement nécessaire au métabolisme de *P. aeruginosa*, elle joue un rôle régulateur dans la sécrétion de certains facteurs de virulence (exotoxine A, protéases). La pyocyanine possède des propriétés oxydoréductives et inactive la catalase dans les cellules épithéliales respiratoires et les cellules endothéliales, participant ainsi au stress oxydatif et entraînant une nécrose du tissu respiratoire (28).

Néanmoins, certains facteurs de virulence échappent au QS comme le système de sécrétion de type III (SST III) qui est un facteur de virulence important de P. aeruginosa. Il permet à la bactérie d'injecter directement les toxines à l'intérieur de la cellule. La translocation des toxines depuis la bactérie s'effectue en traversant la membrane bactérienne à l'aide d'un appendice ressemblant à une aiguille capable de percer la membrane de la cellule eucaryote (32). Des travaux ont ainsi montré que le SST III permettait à des souches de P. aeruginosa de résister à l'action bactéricide des neutrophiles humains et induisait leur mort cellulaire (33). Plusieurs toxines sont maintenant connues pour être sécrétées via ce système par P. aeruginosa: l'ExoS, l'ExoT, l'ExoU et l'ExoY. L'exotoxine S provoque la destruction des tissus au site d'inflammation et la dissémination bactérienne en détruisant les filaments d'actine intra cytoplasmique. Ce faisant elle induit l'apoptose cellulaire, inhibe l'adhésion cellulaire et contribue à l'effacement du tapis mucociliaire. L'exotoxine T interfère avec l'organisation des filaments d'actine et empêche l'exocytose, la progression du cycle cellulaire et la phagocytose. L'exotoxine U est une toxine nécrotique possédant une activité phospholipase, elle détruit donc les membranes cellulaires. L'exoenzyme Y provoque une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc, induisant un changement de la morphologie des cellules qui deviennent arrondies, ce qui engendre la formation de trous intercellulaires et aboutit à la détérioration des cellules endothéliales pulmonaires (28).

Enfin, les lectines solubles sont la dernière découverte en matière de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*, leurs rôles ne semblent pas clairement élucidés mais il

semblerait qu'elles interviendraient dans la reconnaissance et l'adhésion bactérie-hôte et bactérie-bactérie (34).

L'ensemble de ses facteurs de virulences associés aux capacités de résistances et d'adaptation aux antibiotiques de *P. aeruginosa* rend ainsi cette bactérie particulièrement préoccupante... Nous allons essayer de voir à présent le lien entre virulence et résistance aux antibiotiques si tant est que ce lien puisse exister.

B.3. Facteurs de virulence et résistance aux antibiotiques

Des travaux ont montré que virulence et résistance aux traitements semblent liées chez *P. aeruginosa*. En effet, les souches surexprimant les systèmes d'efflux MexAB-OprM et MexCD-OprJ produiraient moins d'élastase, de pyocyanine et de pyoverdine (35). Cette diminution s'expliquerait par la diminution intracellulaire par efflux des AHL régulatrices du QS dans les souches surexprimant le système d'efflux MexAB-OprM (36). MexEF-OprN semble être aussi capable d'effluer des composants intervenant dans l'expression du QS. De plus, la surexpression des systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexCD-OprJ semble associée à une diminution de la transcription par un probable efflux des signaux intracellulaires, des gènes du SST III (37). Il semblerait donc que la surexpression d'efflux ait une contrepartie importante pour *P. aeruginosa*. Néanmoins, on retrouve à ce jour ces souches dans des cas confirmés d'infection à *P. aeruginosa*. Ainsi, ces souches seraient capables de retrouver leur potentiel pathogène via de nouvelles mutations (38).

C. P. aeruginosa et les antibiotiques

C.1. P. aeruginosa et bêta-lactamines

Les bêta-lactamines en se fixant aux protéines liant les pénicillines, inhibe le remaniement et la synthèse de la paroi bactérienne. La sensibilité aux bêta-lactamines de *P. aeruginosa* est assez variable d'une molécule à l'autre et varie selon de nombreux paramètres. La multiplicité des mécanismes de résistances (enzymatiques, efflux, imperméabilité), leurs variabilités d'expression ainsi que leurs associations confèrent à *P. aeruginosa* un large éventail de phénotypes de résistance, rendant la détection de ces mécanismes *in vitro*, pour une souche d'intérêt clinique, parfois difficile.

C.1.1. Phénotype sauvage ou sensible

Le phénotype sauvage de *P. aeruginosa* découle de l'expression simultanée et à faible niveau de mécanismes de résistances enzymatiques et non enzymatiques (efflux et imperméabilité) à l'origine des résistances dites « naturelles » de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa produit naturellement deux bêta-lactamases : une oxacillinase (OXA-50) de spectre étroit dont la contribution au phénotype de résistance naturelle n'est pas significative et une céphalosporinase (AmpC) inductible, produite à un faible niveau, qui contribue majoritairement à la résistance naturelle aux bêta-lactamines de cette espèce (39). L'enzyme inactive la plupart des pénicillines et céphalosporines, elle est parfois capable dans une moindre mesure d'hydrolyser les carbapénèmes (40).

Parallèlement, on décrit chez *P. aeruginosa* pas moins de quatre systèmes d'efflux : MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, et MexXY-OprM. Chaque système possède une spécificité de substrat (bêta-lactamines mais aussi de nombreux autres antibiotiques). Enfin de par la faible perméabilité de sa paroi, *P. aeruginosa* présente une moindre sensibilité à de nombreuses bêta-lactamines hydrophobes.

Ces systèmes (efflux et imperméabilité) n'ont pas une contribution majeure au phénotype de résistance naturelle de *P. aeruginosa* mais provoquent en association une moindre sensibilité aux antibiotiques et donc une augmentation des CMI par rapport à d'autres bacilles à Gram négatif comme les Entérobactéries. Ainsi, *P. aeruginosa* est naturellement résistant aux aminopénicillines, aux pénicillines M, aux C1G et C2G, à certaines C3G comme le céfotaxime et la ceftriaxone, et à un carbapénème : l'ertapénème. Cette espèce est naturellement sensible aux carboxypénicillines (ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique), uréidopénicillines (pipéracilline, pipéracilline-tazobactam), à l'aztréonam, à la ceftazidime, au céfépime et aux carbapénèmes (sauf l'ertapénème). Ce sont ces antibiotiques qui seront testés en laboratoire pour apprécier le phénotype de résistance de *P. aeruginosa*. Figure 6 est donné un exemple d'antibiogramme sauvage de *P. aeruginosa*.

Antibiotique	CMI	Interprétation
Ticarcilline	<= 8	S
Ticarcilline/acide clavulanique	16	S
Pipéracilline	<= 4	S
Pipéracilline/tazobactam	<= 4	S
Ceftazidime	<= 1	S
Céfépime	<= 1	S
Aztréonam	2	1
Imipénème	<= 1	S
Méropénème	<= 0,25	S

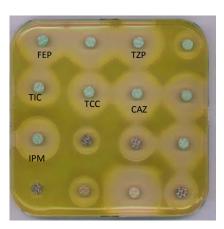


Figure 6. Exemple d'antibiogramme de P. aeruginosa sauvage A) CMI en milieu liquide (Vitek2, CHU Toulouse) et B) en diffusion (http://bacterioweb.univ-fcomte.fr).

C.1.2. Résistances enzymatiques

Rappels sur la classification des bêta-lactamases

On classifie habituellement les bêta-lactamases selon la classification de Ambler dans laquelle on distingue 4 principaux groupes (A, B, C et D) :

- Le **groupe** A comprend des pénicillinases (de type TEM ou SHV par exemple) qui hydrolysent les pénicillines A et carboxypénicillines, des BLSE (de type TEM, SHV ou CTX-M par exemple) qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et certaines céphalosporines, et des carbapénémases (de type *Klebsiella Pneumoniae* Carbapénémase (KPC) par exemple) qui hydrolysent l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception parfois des C2G. Plasmidiques ou chromosomiques, elles sont toutes sensibles aux inhibiteurs tels que l'acide clavulanique, le tazobactam, l'acide boronique ou encore l'avibactam (dernier inhibiteur mis sur le marché).
- Le **groupe B** est constitué de métallo-enzymes (de type VIM ou NDM par exemple), résistantes aux inhibiteurs mais inhibées *in vitro* par l'EDTA (car elles possèdent un atome de zinc au niveau de leur site actif). Plasmidiques ou chromosomiques, elles hydrolysent toutes les bêta-lactamines sauf l'aztréonam.
- Le **groupe C** comporte des céphalosporinases (de type AmpC par exemple) résistantes aux inhibiteurs mais inhibées *in vitro* par la cloxacilline. Autrefois considéré comme strictement chromosomiques, il en existe toutefois des plasmidiques. Elles hydrolysent l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines.

- Le **groupe D** des oxacillinases, peu sensibles aux inhibiteurs, plasmidiques le plus souvent. Ce groupe comporte des pénicillinases qui hydrolysent les pénicillines A, M et les carboxypénicillines, des BLSE qui hydrolysent en plus certaines céphalosporines et des carbapénémases (de type OXA) qui hydrolysent les carbapénèmes à un degré variable ainsi que les autres bêta-lactamines à un degré tout aussi variable. Tableau VI est présenté un résumé de la classification d'Ambler.

Tableau VI. Classification d'Ambler.

Classe	Site actif	Activité	Situation	Inhibiteurs	Exemples
Α	Sérine	Pénicillinase BLSE Carbapénémase	Chromosomique Plasmidique	Ac. clavu. Ac. boronique	TEM, SHV CTX-M KPC
В	Zinc	Carbapénémase	Plasmidique	EDTA Ac. dipicoliniq	NDM VIM
С	Sérine	Céphalosporinase	Chromosomique Plasmidique	Cloxacilline	AMPc DHA
D	Sérine	Oxacillinase Carbapénémase	Plasmidique	Aucun	OXA23 OXA48

a. Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique

L'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC est le mécanisme de résistance aux C3G le plus fréquent chez *P. aeruginosa*. Même si les mécanismes précis d'expression restent à découvrir, on retrouve chez *P. aeruginosa* un mécanisme de régulation similaire aux Entérobactéries. Des mutations du système de régulation de la production de l'enzyme peuvent survenir à des fréquences qui varient de 10⁻⁷ à 10⁻⁹ (41)et provoquer ainsi une production stable et à haut niveau de l'enzyme AmpC qui affecte alors la sensibilité à l'ensemble des bêta-lactamines.

L'hyperproduction d'AmpC confère à *P. aeruginosa* une résistance à la ticarcilline, aux associations ticarcilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam, à la ceftazidime, au céfépime et à l'aztréonam. Les céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) comme le céfépime, en théorie plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse par les céphalosporinases sont en fait rarement efficaces sur les souches surexprimant AmpC du fait d'un certain niveau de résistance naturel de *P. aeruginosa* à ces molécules (42). Un exemple d'antibiogramme d'une souche surexprimant AmpC est donné Figure 7.

Antibiotique	CMI	Interprétation			
Ticarcilline	>= 128	R			
Ticarcilline/acide clavulanique	>= 128	R			
Pipéracilline	>= 128	R			
Pipéracilline/tazobactam	>= 128	R			
Ceftazidime	>= 64	R			
Céfépime	>= 64	R			
Aztréonam	>= 64	R			
Imipénème	4	S			
Méropénème	1	S			

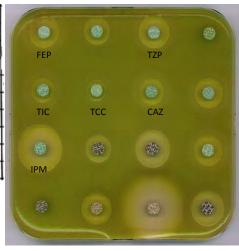


Figure 7. P. aeruginosa avec une hyperproduction d'AmpC isolée. Exemples d'antibiogramme A) CMI en milieu liquide (Vitek2, CHU de Toulouse) et B) en diffusion (http://bacterioweb.univ-fcomte.fr).

Ce mécanisme de résistance, en association avec d'autres : altération de la porine D2 le plus souvent, ou surexpression d'un système d'efflux (MexAB-OprM ou MexCD-OprJ) voire parfois les deux, explique couramment la résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes. En effet, la céphalosporinase naturelle de *P. aeruginosa* possède une capacité d'hydrolyse des carbapénèmes (faible pour le méropénème, plus importante, jusqu'à 25 fois plus, pour l'imipénème) qui provoque une diminution de la sensibilité aux carbapénèmes lorsqu'elle est surexprimée (43). Par exemple, l'altération de la porine OprD associée à l'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC provoque une augmentation des CMI de quatre à seize fois pour l'imipénème mais aussi pour le méropénème (44). En ce sens, une étude réalisée en 2013 dans 14 pays européens et du pourtour méditerranéen sur 529 souches résistantes à l'imipénème et au méropénème retrouve 44% des souches de *P. aeruginosa* hyperproductrices de céphalosporinase, ce chiffre montait à 54,8% si l'on ne considère que les souches françaises (72 souches) (43). De telles souches présentent alors une résistance à toutes les bêta-lactamines disponibles.

La détection de l'hyperproduction d'AmpC doit s'envisager en cas de résistance à la ceftazidime. Pour cela; le CNR des Résistances aux Antibiotiques préconise de s'aider de géloses Mueller-Hinton additionnées de cloxacilline à 1000 mg/L. Sur ce milieu, les mutants "déréprimés", surproduisant la céphalosporinase naturelle AmpC, retrouvent

toute ou partie de leur sensibilité aux β -lactamines (agrandissement des diamètres d'inhibition). C'est cette technique que nous avons utilisée dans notre étude.

Un exemple de test avec et sans cloxacilline est donné Figure 8.

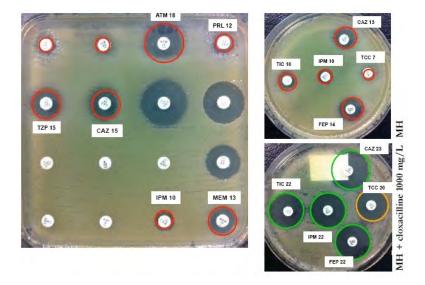


Figure 8. P. aeruginosa - hyperproduction d'AmpC + perte de la porine D2 (CHU Toulouse).

Antibiogramme en diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH) : récupération des diamètres de TIC-TCC-CAZ-FEP et IPM sur gélose Mueller-Hinton additionnée en cloxacilline 1000mg/L.

b. Bêta-lactamases à spectre restreint

Habituellement plasmidiques, ce sont soit des pénicillinases (PSE, TEM, SHV...) sensibles aux inhibiteurs (bêta-lactamases de classe A), soit des oxacillinases (bêta-lactamases de classe D). Les pénicillinases provoquent une diminution plus ou moins importante de la sensibilité aux carboxypénicillines et uréidopénicillines, ainsi *P. aeruginosa* sera résistant à la ticarcilline et aura une moindre sensibilité aux associations ticarcilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam. Un niveau élevé de production peut être associé à une résistance aux associations avec les inhibiteurs et même à une diminution parfois importante de la sensibilité au céfépime. Les oxacillinases à spectre étroit ont un spectre difficile à définir pour *P. aeruginosa*, néanmoins elles seraient pour la plupart associées à une résistance aux carboxypénicillines (ticarcilline seule et associée avec l'acide clavulanique) et uréidopénicillines (pipéracilline seule ou associée avec le tazobactam), certaines hydrolyseraient fortement le céfépime sans toucher la ceftazidime (45).

c. Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

On retrouve chez *P. aeruginosa* deux types de BLSE, toutes deux plasmidiques: des bêta-lactamases de classes A et des bêta-lactamases de classes D (oxacillinases). En France, ce type de mécanisme de résistance n'est pas le plus répandu. En effet, en 2010, une étude multicentrique faite sur des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime ne retrouvait que dans 9,3% des cas une acquisition d'une bêta-lactamase (BLSE ou carbapénèmase) (46), l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC étant nettement prépondérante. Cependant, de par leur mode de dissémination plasmidique, on peut penser que dans le futur on rencontrera un nombre croissant de ces enzymes parfois à l'origine de petites épidémies (47).

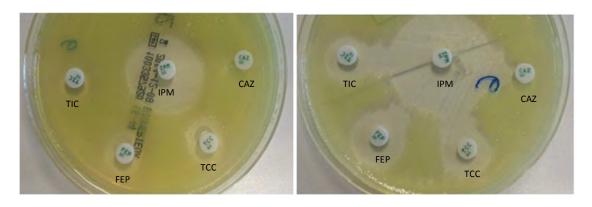
On décrit de nombreuses **bêta-lactamases de classes A à spectre étendu** (TEM, SHV, CTX-M, GES par exemple), celles-ci ont une grande variabilité et un spectre étendu aux C3G telle que la ceftazidime ainsi qu'aux C4G comme le céfépime. Associée aux mécanismes de résistances naturels déjà importants de *P. aeruginosa*, elles entraînent une résistance de *P. aeruginosa* à la totalité des bêta-lactamines en dehors des carbapénèmes.

Les bêta-lactamases de classe D (oxacillinases) à spectre étendu ont un phénotype de résistance comparable aux BLSE de classe A. Elles hydrolysent cependant à des degrés variables la ceftazidime et l'aztréonam alors que l'hydrolyse du céfépime est souvent marquée. La présence d'oxacillinases à large spectre hydrolysant fortement les C3G n'a été identifiée pour l'instant que chez *P. aeruginosa* (45).

Classiquement, la détection d'une BLSE passe par la mise en évidence de synergies entre une C3G ou C4G et un inhibiteur tel que l'acide clavulanique. Pour *P. aeruginosa*, la visualisation de ces synergies est difficile en raison des nombreux mécanismes de résistance associés (principalement la céphalosporinase inductible) (48) qui masque les synergies ainsi que de la faible activité des inhibiteurs sur certaines de ces enzymes (49). Afin de faciliter la détection de ces enzymes, on peut s'aider de boîtes Mueller-Hinton additionnées de cloxacilline pour tenter de dévoiler une synergie masquée par la céphalosporinase AmpC (50), mais certaines oxacillinases seraient inhibées par la cloxacilline (47). Hocquet *et al.* proposent ainsi de réaliser deux tests de synergie concomitants en optimisant la distance entre les disques, une synergie est recherchée avec des disques de ceftazidime et de céfépime proche de disques d'acide clavulanique et d'imipenème, les disques étant disposés de manière à avoir une distance de 5±1mm entre les deux diamètres d'inhibition (49). Il est ainsi possible de dépister la plupart des

BLSE, la confirmation et l'identification de celle-ci sera effectuée par des techniques de biologie moléculaire. Ce sont ces tests de synergie qui seront utilisés dans notre étude.

Les Figures 9 à 13 montrent des exemples de tests sur gélose avec et sans cloxacilline (ces photos ont été prises à partir de souches incluses dans notre étude; les tests ont été réalisés au laboratoire).

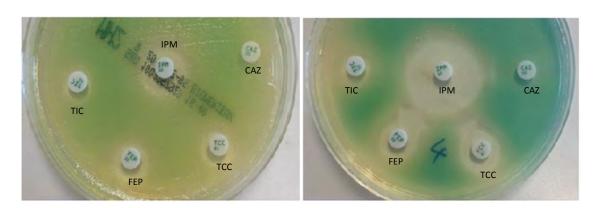


Mueller-Hinton

Mueller-Hinton+ cloxacilline 1000 mg/L

Figure 9. P. aeruginosa - BLSE GES-1 et surproduction d'AmpC (CHU de Toulouse).

Synergies TIC-IPM, TCC-IPM, CAZ-IPM et FEP-IPM.



Mueller-Hinton

Mueller-Hinton+ cloxacilline 1000 mg/L

Figure 10. P. aeruginosa - BLSE GES-1, surproduction AmpC et perte porine D2 (CHU de Toulouse). Synergies TCC-IPM, CAZ-IPM et FEP-IPM

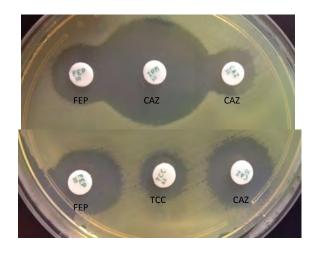
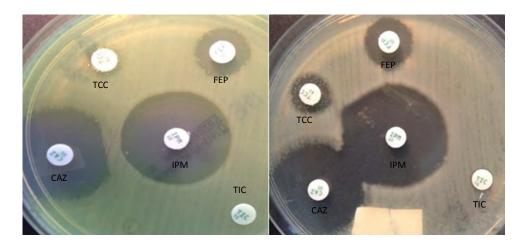


Figure 11. P. aeruginosa - BLSE SHV-2a et surproduction d'AmpC (CHU de Toulouse). Test de synergie sur Mueller-Hinton optimisation de la distance entre les disques. Synergie TCC-FEP.



Mueller-Hinton

Mueller-Hinton+ cloxacilline 1000 mg/L

Figure 12. P. aeruginosa -OXA-19 et Surproduction d'AmpC (CHU Toulouse).

Barre d'induction d'AmpC IPM-CAZ sur gélose MH seule, synergie IPM-FEP sur gélose additionnée de cloxacilline.

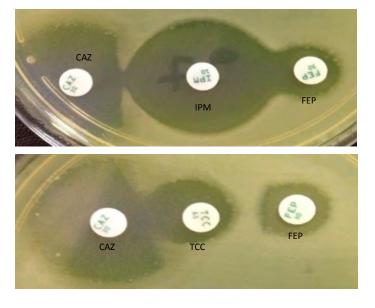


Figure 13. P. aeruginosa -OXA-19 et Surproduction d'AmpC Test de synergie sur MH avec optimisation distance entre les disques (CHU Toulouse).

Barre d'induction d'AmpC IPM-CAZ et TCC-CAZ, synergie IPM-FEP, TCC-FEP et TCC-CAZ

La grande majorité des souches de P. aeruginosa porteuse d'une BLSE ou d'une métallobêta-lactamase présenteront des résistances associées aux autres classes d'antibiotiques utilisées contre P. aeruginosa. Par exemple, Fournier et al. ont remarqué dans leur étude que la totalité de ces souches sont résistantes aussi à la tobramycine (44). Ainsi, une telle association de résistances doit évoquer une possible résistance enzymatique en dehors de l'hyperproduction d'AmpC.

d. Carbapénémases

L'acquisition d'une carbapénémases comme mécanisme de résistance aux carbapénèmes n'est pas le mécanisme le plus répandu chez *P. aeruginosa* (6,4% des souches résistantes aux carbapénèmes en France) (44). La combinaison de mécanismes de résistances intrinsèques à savoir: la surexpression de la céphalosporinase chromosomique AmpC, la surexpression des systèmes d'efflux et l'altération de la porine D2 en sont les principales raisons (43). Cependant, durant les dernières décennies, on a observé un nombre grandissant de souches de *P. aeruginosa* productrices de carbapénémases (44) ainsi qu'une augmentation des résistances de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes (51), ce qui laisse envisager pour le futur un rôle essentiel de ces enzymes.

On retrouve chez *P. aeruginosa* des **carbapénémases de classe A** (KPC), sensible aux inhibiteurs tel que l'acide clavulanique, elles hydrolysent l'ensemble des bêta-lactamines en dehors des C2G (45).

Les **carbapénémases de classe B** (Métallo-Bêta-Lactamases ou MBL) sont les plus représentées chez *P. aeruginosa* (NDM, VIM par exemple). En France, les plus fréquentes sont VIM1-2-4 (44). Résistantes aux inhibiteurs mais inhibées *in vitro* par l'EDTA, elles hydrolysent l'ensemble des bêta-lactamines en dehors de l'aztréonam (45). Cette sensibilité ou moindre résistance à l'aztréonam peut être un point d'appel sur l'antibiogramme pour chercher une métallo-enzyme.

Enfin, les **carbapénémases de classe D** (certaines OXA) sont parfois retrouvées chez *P. aeruginosa*. Peu sensibles aux inhibiteurs, elles hydrolysent à un degré extrêmement variable les bêta-lactamines (45).

En pratique, ces souches associent le plus souvent plusieurs mécanismes de résistances aux bêta-lactamines, et sont donc résistantes à toutes les bêta-lactamines.

La présence de telles enzymes doit être suspectée et recherchée en cas de résistance conjuguée à la ceftazidime et à l'imipenème surtout si la tobramycine est elle aussi touchée (44). L'absence de récupération du diamètre d'inhibition de l'imipénème sur une gélose Mueller-Hinton additionnée de cloxacilline est un argument supplémentaire en faveur d'une carbapénèmase car elle élimine la cause la plus fréquente de résistance aux carbapénèmes à savoir l'association de la surexpression de la céphalosporinase chromosomique AmpC et l'altération de la porine D2 (52). Les tests (double disque ou Etest) comparant l'activité de l'imipénème seul et de l'imipénème associé avec de l'EDTA confirmeront (récupération du diamètre d'inhibition ou de la CMI avec l'EDTA) ou infirmeront (absence de récupération) la présence d'une métallo-bêta-lactamase (53).

Figure 14 est présenté un exemple de E-test imipénème/imipénème-EDTA.



Figure 14. P. aeruginosa : métallo-bêta-lactamase de type VIM (CHU de Toulouse).

Test de synergie Imipénème (IP) et imipénème + EDTA (IPI) en bandelette E-test ; récupération de la CMI avec l'EDTA.

L'identification définitive de l'enzyme sera apportée par des techniques de biologie moléculaire.

C.1.3. Résistances non-enzymatiques

a. Imperméabilité

On distingue chez *P. aeruginosa* deux types d'imperméabilité: spécifique par une altération soit qualitative de la porine OprD2 (on parle alors de perte de la porine D2, phénomène le plus fréquent) (44), soit quantitative (diminution d'expression); et non spécifique, très large, elle touche un grand nombre d'antibiotiques.

La porine OprD2 forme un canal spécifique qui favorise l'entrée des carbapénèmes mais d'aucune autre bêta-lactamine. Une modification qualitative ou quantitative de la porine OprD2 entraine une résistance sélective à l'imipénème (54); *a contrario* la résistance au méropénème nécessite une association de mécanismes de résistances (hyperproduction d'AmpC ou surexpression d'efflux) en dehors de la présence d'une carbapénèmase (43). C'est le principal mécanisme de résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa*. Celle-ci résulte d'une baisse de pénétration de la molécule à travers la membrane externe associée à une hydrolyse partielle par la céphalosporinase naturelle. Le méropénème conserve une CMI correcte (entre 2 et 4 µg/mL) car beaucoup plus stable à l'hydrolyse par la céphalosporinase et pénétrant par d'autres porines(45).

Antibiotique	CMI	Interprétation
Ticarcilline	32	R
Ticarcilline/acide clavulanique	16	S
Pipéracilline	8	S
Pipéracilline/tazobactam	8	S
Ceftazidime	2	S
Céfépime	4	S
Aztréonam	4	
Imipénème	>= 16	R
Méropénème	2	S



Figure 15. Exemples d'antibiogramme de P. aeruginosa avec altération de la porine D2 isolée. A) CMI en milieu liquide (vitek2, CHU Toulouse) et B) en diffusion (http://bacterioweb.univ-fcomte.fr).

L'association de l'altération de la porine D2 et de l'hyperproduction de céphalosporinase AmpC est la cause principale des résistances de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes. Castanheira *et al.* retrouve pour des souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes une altération de la porine D2 dans 89,5% des cas (43). Une étude similaire menée par le CNR à Besançon retrouve à peu près la même chose en France (82,6%) (44).

On ne sait malheureusement que peu de choses concernant les évènements génétiques conduisant à la diminution de l'expression de la porine D2. Cependant, certaines souches surexprimant les systèmes d'efflux semblent moins exprimer OprD2. Il semblerait notamment y avoir un lien avec l'hyperexpression des systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexXY-OprM et la diminution d'expression d'OprD2 (42).

b. Surexpression des systèmes d'efflux

Quatre systèmes d'efflux ont été décrits chez *P. aeruginosa*: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, et MexXY-OprM. Ils sont constitués chacun de trois protéines: une protéine de transport dans la membrane cytoplasmique (Mex B, D, F et Y), une protéine de transport dans la membre externe (Opr M, J et N), et une protéine de liaison entre les deux première (Mex A, C, E et X) (55)(45).

Chaque système a une spécificité de substrat, MexAB-OprM efflue la quasi-totalité des bêta-lactamines sauf l'imipénème, mais aussi les quinolones, les macrolides, la lincomycine, la tétracycline, le triméthoprime, le chloramphénicol et la novobiocine (55). Sa surexpression semble être la plus fréquente avec celle de MexXY-OprM (56), et provoque une résistance à la ticarcilline, à l'aztréonam et une augmentation des CMI, variable selon son degré de surexpression pour les autres molécules concernées.

Antibiotique	CMI	Interprétation
Ticarcilline	64	R
Ticarcilline/acide clavulanique	>= 128	R
Pipéracilline	16	S
Pipéracilline/tazobactam	16	S
Ceftazidime	4	S
Céfépime	8	S
Aztréonam	16	1
Imipénème	2	S
Méropénème	1	S

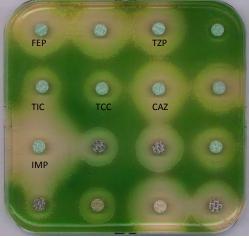


Figure 16. P. aeruginosa surexpression MexAB-OprM isolée. Exemple d'antibiogramme A) CMI en milieu liquide (Vitek2, CHU Toulouse) et B) en diffusion (http://bacterioweb.univ-fcomte.fr).

MexXY-OprM élimine les aminoglycosides, les quinolones, les bêta-lactamines zwitterioniques (présentant un même nombre de charges électriques de signes opposées) telles que le céfépime, les macrolides et la tétracycline (57). Il ne participe pas à la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* mais provoque une augmentation des CMI parfois importante (entre 2 et 16 fois), pour les antibiotiques qu'il prend en charge, lorsqu'il est surexprimé (57). La régulation de sa surexpression semble interconnectée avec d'autres mécanismes de résistance non enzymatique. En effet, on retrouve des souches pour lesquelles, via des systèmes complexes de régulation qui semblent être commun, on observe une surexpression associée de MexXY-OprM et MexEF-OprN, avec une diminution drastique de l'expression de la porine D2 (44), ainsi qu'une modification des lipopolysaccharides (LPS) constitutifs de la paroi, à l'origine de la résistance par imperméabilité à la colistine (57). L'association de l'ensemble de ces mécanismes

conduisant à une souche multirésistante de *P. aeruginosa*. Ces mêmes antibiotiques éliminés par MexXY-OprM provoqueraient la sélection du mécanisme de résistance en question (58). Ainsi via des mécanismes de régulation extrêmement complexes et interconnectés, il semblerait qu'un traitement par ciprofloxacine puisse provoquer la sélection de souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes y compris aux carbapénèmes (59).

MexEF-OprN efflue les quinolones, les aminoglycosides, le triméthoprime, le chloramphénicol et certaines bêta-lactamines comme les carbapénèmes mais aussi la ceftazidime, le céfépime, la ticarcilline ou l'aztréonam. Son hyperexpression contribue à une faible élévation des CMI de ces antibiotiques. Associé à d'autres mécanismes, MexEF-OprN participe à la multi-résistance de *P. aeruginosa* (60).

Enfin, MexCD-OprJ élimine les quinolones, les bêta-lactamines zwitterioniques telles que le céfépime, les macrolides, la tétracycline, le chloramphénicol et le triméthoprime (61)(55). Sa surexpression participe à élever les CMI pour l'ensemble de ces antibiotiques mais rendrait les souches plus sensibles à la ticarcilline, à l'aztréonam, à l'imipénème et aux aminosides (61).

En conclusion, la ceftazidime semble être la bêta-lactamine la plus résistante vis-à-vis du phénomène d'efflux chez *P. aeruginosa* (45).

c. Modification de la cible

Rare chez *P. aeruginosa*, la modification des protéines liant les pénicillines (PLP) est responsable de résistance acquise aux carbapénèmes, le plus souvent associée à d'autres mécanismes de résistances (45).

C.1.4. Synthèse : traitement de *P. aeruginosa* par bêta-lactamines

La multiplicité des mécanismes de résistances intrinsèques et extrinsèques de *P. aeruginosa* vis-à-vis des bêta-lactamines ne permet pas de dégager une bêta-lactamine « Anti-*P. aeruginosa* ». Malgré tout, la relative résistance de la ceftazidime aux mécanismes d'efflux, et la moindre sensibilité du méropénème à l'altération de la porine D2, font de ces deux bêta-lactamines les principaux agents pour le traitement de *P. aeruginosa* (42).

C.2. P. aeruginosa et aminosides

Les aminosides sont des composés importants du traitement de *P. aeruginosa*, souvent utilisés en association avec les bêta-lactamines. Ils agissent en ciblant l'ARN 16S ribosomal bactérien et inhibent ainsi la traduction et donc la synthèse des protéines. Par ailleurs, ils désorganisent le système de transport des électrons de la chaîne respiratoire, provoquent des désordres ioniques, altèrent les enveloppes bactériennes et affectent indirectement la réplication de l'ADN (62). Malheureusement, comme pour les bêta-lactamines, leur large utilisation a contribué à l'émergence de souches résistantes et ce dans toutes les régions du monde.

C.2.1. Phénotype sauvage

P. aeruginosa possède naturellement une enzyme modificatrice des aminosides : APH(3')-II qui est la principale cause de la résistance naturelle de P. aeruginosa à la kanamycine, streptomycine et néomycine (63). Il possède aussi deux systèmes d'efflux capables d'éliminer les aminosides de la bactérie (MexEF-OprN et MexXY-OprM). Cependant, ces systèmes ne semblent pas jouer de rôle dans la résistance intrinsèque de P. aeruginosa.

C.2.2. Résistances acquises

Comme pour les bêta-lactamines, *P. aeruginosa* dispose de nombreux mécanismes de résistances vis-à-vis des aminosides. Le principal est l'acquisition via des éléments génétiques mobiles d'enzymes modifiant les aminosides. En plus de ces enzymes, les éléments génétiques mobiles transportent parfois d'autres enzymes telles que des bêta-lactamases (pénicillinases, BLSE, métallo-bêta-lactamases) conférant à *P. aeruginosa* un phénotype multi-résistant (63). Associé à ce mécanisme principal, *P. aeruginosa* dispose de nombreux autres moyens pour réduire sa sensibilité aux aminosides : surexpression des systèmes qui effluent les aminosides, acquisition d'enzymes modificatrices de la cible des aminosides ou encore imperméabilité.

a. Modification de l'antibiotique

Les enzymes modificatrices des aminosides ont été regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent : acétylation du groupement aminé (N-acétyltransférase, AAC), phosphorylation ou nucléotidylation d'un groupement hydroxyle (O-phosphotransférase,

APH et O-nucléotidyltransférase, ANT), suivi de la numérotation du résidu sur lequel se produit la réaction (62). Chaque enzyme reconnaît un certain nombre d'aminosides qu'elle modifie, sa présence ne traduisant pas obligatoirement une résistance. Il existe de très nombreuses enzymes dont les profils de substrats se chevauchent et bien souvent en cas de multi-résistance plusieurs de ces enzymes sont impliquées rendant délicat la déduction du contenu enzymatique responsable de la résistance (62).

Toutefois, chez *P. aeruginosa* on retrouve de manière assez fréquente trois familles d'enzymes : les AAC6', les AAC3 et ANT2 ". A l'intérieur même de ces familles, les profils de résistances peuvent être différents (63).

b. Modification de cible

Le mode d'action des aminosides laisse présager la mutation de l'ARN 16S comme moyen de résistance. Toutefois la présence de multiples copies de l'opéron ARN ribosomal limite l'effet de ce mécanisme (62). Cependant, la méthylation de l'ARN 16S par des méthylases semble provoquer une résistance à haut niveau à l'ensemble des aminosides (63). Ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* les gènes *rmtA* et *rmtB* mais aussi *rmtD* codant pour des méthylases responsables de ces méthylations, plasmidiques, ils sont parfois accompagnés d'autres gènes codant pour des bêta-lactamases par exemple (64).

c. Surexpression d'efflux

La surexpression des systèmes d'efflux extrudant les aminosides à savoir MexEF-OprN et MexXY-OprM est un autre mécanisme auquel a accès *P. aeruginosa* afin de mieux résister aux aminosides. Cependant, ce mécanisme ne provoque qu'une faible élévation des CMI et doit être associé à d'autres comme l'imperméabilité pour provoquer une réelle résistance (65).

d. Imperméabilité

Chez *P. aeruginosa* la résistance aux aminosides par imperméabilité peut s'expliquer d'une part par la production de lipopolysaccharides défectueux altérant ainsi l'absorption des aminosides à travers la membrane externe (66) et d'autre part par des anomalies sur la chaine de transport des électrons provoquant une diminution de l'absorption des aminosides au niveau de la membrane cytoplasmique, limitant ainsi l'accumulation intracellulaire des aminosides ne permettant pas d'atteindre un seuil d'inhibition des ribosomes suffisant (65).

Comme pour la surexpression d'efflux, l'imperméabilité de *P. aeruginosa* vis à vis des aminosides ne provoque pas une résistance de haut niveau, c'est l'association des mécanismes de résistances (surexpression d'efflux, imperméabilité et modification de cible mutationnelle) qui donnera à *P. aeruginosa* une résistance de haut niveau à tous les aminosides sans acquérir une enzyme provenant d'un élément génétique mobile (65).

C.2.3.Synthèse axe de traitement de *P. aeruginosa* par aminosides

En routine, la distinction des différents mécanismes de résistance chez *P. aeruginosa* visà-vis des aminosides, du fait de leur nombre et du chevauchement des profils de résistances, est quasiment impossible. Dans ces conditions, la prédiction du phénotype le plus probable est plus qu'hasardeux. Malgré tout, on peut remarquer la faible activité des système d'efflux sur la tobramycine qui rendrait ainsi la tobramycine aminoside de référence à utiliser sur *P. aeruginosa* (42).

C.3. P. aeruginosa et quinolones

Les quinolones exercent une inhibition de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur 2 enzymes : l'ADN topoisomérase de type II ou ADN gyrase et l'ADN topoisomérase de type IV. On distingue les quinolones urinaires (acide nalidixique et norfloxacine par exemple) des quinolones systémiques (ofloxacine et ciprofloxacine) qui ont une activité plus importante sur les Entérobactéries, et des quinolones respiratoires (lévofloxacine et moxifloxacine) qui présentent un spectre élargi au pneumocoque notamment (67). Encore une fois, leur large utilisation a conduit à une rapide émergence de résistances y compris chez *P. aeruginosa*.

C.3.1.Phénotype sauvage

P. aeruginosa à l'état sauvage présente trois principaux systèmes d'efflux capable d'éliminer les quinolones : MexAB-OprM, MexXY-OprM et MexEF-OprN qui en dehors de leur surexpression ne provoquent pas de résistance particulière. Ainsi, P. aeruginosa est sensible naturellement aux quinolones dites urinaires, systémiques et respiratoires, seul l'acide nalidixique est inactif par imperméabilité (68).

C.3.2. Résistances acquises

La résistance acquise de *P. aeruginosa* aux quinolones est majoritairement liée à des mécanismes de résistance à support chromosomique. Le plus connu est la modification de cible. Cependant, on retrouve comme autres mécanismes la surexpression d'efflux ainsi que la protection de cible (67).

La **modification des cibles** des quinolones que sont les complexes ADN gyrase et ADN topoisomérase IV, la plus fréquente étant la modification de la sous unité A de l'ADN gyrase pour *P. aeruginosa*, se dévoile comme pour les Entérobactéries suite à l'accumulation d'évènements mutationnels (69). Ce mécanisme de résistance est essentiellement sélectionné lors d'un traitement par quinolones. La lévofloxacine est la fluoroquinolone utilisée comme marqueur pour détecter ce type de résistance, car c'est la 1^{ère} touchée. Ainsi, la ciprofloxacine ne doit pas être utilisée chez une souche présentant une résistance à la lévofloxacine.

La surexpression d'efflux via les systèmes MexAB-OprM, MexXY-OprM et MexEF-OprN semble provoquer une élévation variable des CMI (au minimum cela multiplie par deux les CMI) à l'ensemble des guinolones(70).

Enfin, depuis peu de temps, on décrit, un mécanisme de résistance plasmidique par protection de cible. Le plasmide apportant un ou des gènes à l'origine de la production de protéines à motifs pentapeptidiques répétés qui protègent les complexes ADN gyrase et topoisomérase de l'action des fluoroquinolones. Ce nouveau mécanisme est à l'origine d'un faible niveau de résistance à l'encontre des quinolones (71). L'élément génétique mobile apportant ce mécanisme à *P. aeruginosa* amène avec lui bien souvent d'autres gènes, codant pour des enzymes modificatrices des aminosides mais aussi des BLSE ou métallo-bêta-lactamases, à l'origine de souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes (72).

C.3.3. Synthèse axe de traitement de *P. aeruginosa* par quinolones

Pour conclure, malgré les fréquentes résistances de *P. aeruginosa* aux quinolones, cellesci restent un élément essentiel pour son traitement. Dans le cas où un traitement par quinolones est envisagé, la ciprofloxacine semble avoir la meilleure activité sur *P. aeruginosa* et doit donc être utilisée en première intention(72).

PARTIE II: MECANISMES DE RESISTANCE DE *P. AERUGINOSA* ET EVOLUTION AU COURS DE L'HOSPITALISATION EN REANIMATION, 2013-2014

I. Objectifs

L'objectif principal de l'étude était d'évaluer les résistances ainsi que les mécanismes de résistance chez les souches de *P. aeruginosa* en réanimation. Les résistances étudiées étaient celles vis-à-vis des principaux antibiotiques d'intérêt thérapeutique utilisés en Réanimation, à savoir, l'association pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime, l'imipénème, le méropénème, l'amikacine, la tobramycine, la ciprofloxacine et la colistine. Secondairement, l'étude avait pour but de rechercher les antibiotiques susceptibles de sélectionner un mécanisme de résistance donné responsable de la résistance à la ceftazidime et/ou à l'imipénème et/ou au méropénème chez une souche de *P. aeruginosa* ayant un phénotype au préalable dit « sensible » et qui serait devenu résistante par la suite.

II. Matériels et méthodes

A. Type étude et comité d'éthique

L'étude clinique observationnelle monocentrique, rétrospective mais aussi prospective fut menée de janvier 2013 à fin décembre 2014 (rétrospective de janvier 2013 à mai 2014, prospective de mai 2014 à décembre 2014) dans le service de Réanimation Polyvalente de l'hôpital Rangueil du CHU de Toulouse.

Ont été inclus l'ensemble des patients ayant eu au moins une fois une souche de *P. aeruginosa* isolée quel que soit le site de prélèvement.

Ce projet a été approuvé par le Comité d'Ethique et de la Recherche des Hôpitaux de Toulouse (cf. Annexe I).

B. Recueil des souches

Les souches de *P. aeruginosa* ont été recueillies quel que soit le type de prélèvement. Les souches collectées sur les prélèvements effectués de début 2013 à fin avril 2014 ont été recueillies de manière rétrospective via la souchothèque du laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse. Celles isolées des prélèvements datant de début mai 2014 à fin décembre 2014 ont été recueillies de manière prospective.

L'identification de *P. aeruginosa* au laboratoire a été effectuée en méthode automatisée, après culture sur milieu gélosé, en milieu liquide par le Vitek 2 Biomérieux durant l'année 2013 puis par spectrométrie de masse (BrukerMaldiBiotyper) à partir de janvier 2014.

B. Etude des résistances

Pour chaque souche isolée, un antibiogramme a été effectué afin de déterminer le phénotype de résistance aux bêta-lactamines et d'évaluer l'évolution des résistances dans le temps chez un même patient au gré des traitements par antibiothérapie que celui-ci a reçu au cours de son hospitalisation dans le service de Réanimation de Rangueil.

C.1. Recueil des concentrations Minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI pour la ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam, ceftazidime, céfépime, imipénème, méropénème, aztréonam, amikacine, tobramycine, ciprofloxacine et colistine ont été relevées pour chaque souche isolée, après réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide par méthode automatisée sur le Vitek 2 Biomérieux. En cas de souche mucoïde de *P. aeruginosa*, l'antibiogramme en milieu liquide n'étant pas réalisable, un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé a été réalisé (lecture automatisée sur SIRSCAN, I2A). L'interprétation des CMI ou des diamètres a été effectuée selon les recommandations du CASFM 2013 (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) (73). Les concentrations et les diamètres critiques sont rappelés dans le *Tableau VII*.

Tableau VII. Concentrations critiques et diamètres critiques pour les Pseudomonas d'après le CASFM 2013

	Concent	rations	Charge	Diamètres		
	critic	ues	du	criti	ques	
	(mg	/L)	disque	(mm)		
	S≤	R >	(μg)	S≥	R <	
Pipéracilline	16	16	30	18	18	
Pipéracilline-tazobactam	16	16	30-6	18	18	
Ticarcilline	16	16	75	18	18	
Ticarcilline-clavulanate	16	16	75-10	18	18	
Céfépime	8	8	30	19	19	
Ceftazidime	8	8	10	16	16	
Imipénème	4	8	10	20	17	
Méropénème	2	8	10	24	18	
Aztréonam	1	16	30	50	16	
Ciprofloxacine	0,5	1	5	25	22	
Lévofloxacine	1	2	5	20	17	
Amikacine	8	16	30	18	15	
Gentamicine	4	4	10	15	15	
Nétilmicine	4	4	10	12	12	
Tobramycine	4	4	10	16	16	
Colistine	2	4				

C.2. Interprétation de l'antibiogramme et mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistance aux bêta-lactamines ont été déduits à partir de l'antibiogramme seul lorsque cela a été possible. C'est-à-dire en cas d'absence de résistance aux antibiotiques testés, en cas de présence d'une pénicillinase et en cas de surexpression d'efflux ou d'imperméabilité. Concernant la surexpression d'efflux et l'imperméabilité, chez *P. aeruginosa* l'identification avec certitude de la présence de ces mécanismes nécessite la mise en place de techniques de biologie moléculaire complexes (nombreux mécanismes à rechercher ainsi que leur niveau d'expression). N'ayant pas à disposition ces techniques au laboratoire, les souches présentant un phénotype correspondant avec la surexpression d'efflux et/ou avec l'acquisition d'une imperméabilité ont été caractérisées comme présentant un phénotype « surexpression d'efflux et/ou imperméabilité » (mécanisme le plus plausible au vu de l'antibiogramme) (*Tableau VIII*). Pour les autres mécanismes de résistances comme la surexpression de la céphalosporinase AmpC ou l'acquisition d'enzymes comme les BLSE, oxacillinases et carbapénémases, d'autres test décrits par la suite ont été nécessaires. Ces tests ont été réalisés en cas de résistances à la ceftazidime.

Tableau VIII. Phénotypes de résistance et leur interprétation n'ayant pas fait l'objet de tests complémentaires.

Phénotype	TIC	TCC	TZP	CAZ	FEP	IPM	MER	ATM
Sensible	S	S	S	S	S	S	S	S/I
Efflux	R	R	S/R	S	S	S	S	I/R
Efflux +/- modification porine D2	R	R	S/R	S	S	R	R	R
Pénicillinase	R	R	R	S	S	S	S	S/I

Selon le protocole préalablement mis en place dans le laboratoire de Bactériologie Hygiène du CHU de Toulouse, pour différencier chez les souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime, les résistances dues à l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, de celles dues à des mécanismes émergents : carbapénémases, oxacillinases à spectre étendu ou BLSE, nous avons mis en place de façon hiérarchique :

- la comparaison des diamètres d'inhibition et les tests de synergie sur gélose Mueller-Hinton et Mueller-Hinton additionnée de cloxacilline à 1000 mg/L,
- et enfin la recherche de métallo-bêta-lactamase par E-test imipénème et imipénème avec EDTA.L'algorithme est donné *Figure 17*.

Pour l'ensemble des souches résistantes à la ceftazidime, nous avons donc comparé dans un premier temps les diamètres d'inhibition de l'imipénème, de la ceftazidime, du céfépime, de la ticarcilline, et de la ticarcilline-acide clavulanique, sur gélose Mueller-Hinton et Mueller-Hinton additionné de cloxacilline à 1000 mg/L. Pour cela, nous avons ensemencé les géloses avec une suspension à 0,5 Mac Farland en sérum physiologique diluée au dixième obtenue préalablement à partir de colonies de la souche de *P. aeruginosa* à tester. Une fois ensemencées, les géloses ont été placées en incubation à 36 +/- 2°C pendant 18 à 24 heures pour une lecture interprétative le lendemain. La récupération des diamètres était considérée comme présente si l'on observait une augmentation minimale du diamètre d'inhibition de 3mm pour la ticarcilline, l'association ticarcilline-acide clavulanique, la ceftazidime et le céfépime et de 10mm pour l'imipénème sur la gélose Mueller-Hinton additionné de cloxacilline par rapport à la gélose Mueller-Hinton seule. L'arrêt ou la poursuite des tests dépendait de ces premiers résultats, comme décrit dans le logigramme qui suit (*Figure 17*).

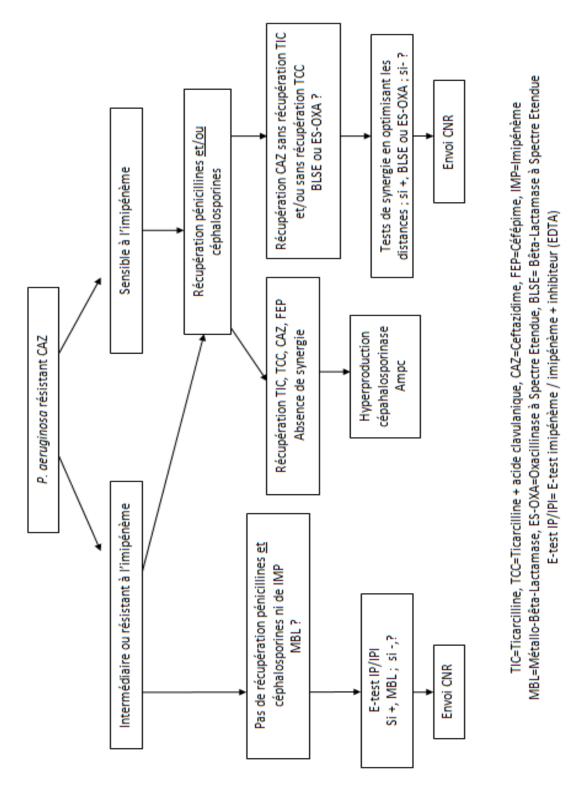


Figure 17 : Algorithme décisionnel pour l'exploration des mécanismes de résistance chez les souches de P. aeruginosa résistantes à la ceftazidime.

C.3. Phénotypes de résistance

Pour chaque patient :

- pour la 1^{ère} souche isolée R ou I à un des antibiotiques suivants : ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam, ceftazidime, imipénème ou méropénème, ont été relevées les CMI de ces différents antibiotiques (détection des mécanismes de résistance), ainsi que les CMI d'antibiotiques d'autres familles (détection des résistances associées) : amikacine, tobramycine, ciprofloxacine et colistine.
- de ces CMI et des profils de résistance, ont été déduits (imperméabilité, efflux) ou recherchés (céphalosporinase, BLSE, oxacillinase, carbapénémase) les mécanismes de résistance.
- Pour chaque 1^{ère}souche exprimant une enzyme telle qu'une BLSE, une oxacillinase à spectre élargi ou une carbapénèmase responsable de résistance à la ceftazidime et/ou au céfépime et/ou à l'imipénème et/ou au méropénème, ont été relevées les CMI à l'amikacine, la tobramycine, la ciprofloxacine et à la colistine afin d'évaluer les résistances aux autres classes d'antibiotiques associées à la présence de telles enzymes.

C.4. Cinétique des résistances

Les patients ont été répartis en trois groupes :

- **groupe A**: patients ne présentant que des souches sensibles à la ceftazidime, à l'imipénème et au méropénème
- -groupe B : patients ne présentant que des souches résistantes à la ceftazidime et/ou à l'imipénème et/ou au méropénème
- -groupe C: patients présentant une évolution des résistances de *P. aeruginosa* (souches sensibles devenant résistantes ou l'inverse) vis-à-vis de la ceftazidime et/ou de l'imipénème et/ou du méropénème.

Les patients du groupe C ont permis une étude des facteurs pouvant être à l'origine du changement (acquisition ou perte de résistance) du phénotype de résistance de *P. aeruginosa.*

NB: La comparaison des souches par technique MLST, afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'une seule et même souche qui évolue, est en cours. Nous ne pouvons donc dire, à ce

stade, s'il s'agit de l'évolution d'une souche ou de sélection de différentes souches (aux profils de résistance différents) par les antibiotiques administrés.

D. Recueil de renseignements cliniques

Afin d'observer la présence ou non de facteurs influençant le phénotype de résistance des souches de *P. aeruginosa* au cours de l'hospitalisation en service de Réanimation, ont été répertoriés pour l'ensemble des patients des 3 groupes: la durée d'hospitalisation, la durée de ventilation mécanique s'il y en a eu, la notion d'hospitalisation antérieure (patient transféré d'un service ou provenant de son domicile), la notion de colonisation ou d'infection par *P. aeruginosa* et/ou par un autre germe (isolé sur le même site de prélèvement et de manière concomitante avec une souche de *P. aeruginosa*) et enfin la mortalité. L'objectif étant de comparer ces facteurs entre les 3 groupes, et d'éventuellement en déduire si certains de ces facteurs pouvaient favoriser la sélection de souches de *P. aeruginosa* résistantes ou multi-résistante, seules ou associées avec d'autres BMR. L'infection par *P. aeruginosa* ou par un autre germe n'a été relevée qu'en cas de mention spécifique dans le dossier patient ou en cas de présence des bactéries dans un site où la seule présence de bactéries définit une infection. La colonisation a été relevée en cas de mention spécifique dans le dossier patient ou par défaut en cas d'absence d'arguments de certitude pour une infection.

Seulement dans le groupe C, les traitements antibiotiques reçus ont été relevés ainsi que leur durée; cela nous a permis de placer sur un axe chronologique l'évolution des souches en fonction des antibiotiques administrés. L'objectif était de savoir si certains antibiotiques pouvaient favoriser la sélection de certains mécanismes de résistance; et si c'était le cas, lesquels.

III. Résultats

A. Nombre de souches - sites de prélèvement

Durant l'étude, **425 souches** de *P. aeruginosa* ont été isolées quel que soit le site de prélèvement parmi les **142 patients inclus**. Le *Tableau IX* détaille l'ensemble des sites de prélèvements rencontrés et le nombre de fois où *P.aeruginosa* a été isolé.

Tableau IX. Nombre d'isolements de P. aeruginosa selon le site de prélèvement

Prélèvements	Nombre	%
Respiratoires		
Aspiration trachéale	259	60,9
Fibro-aspiration	26	6,1
Expectoration	13	3,1
LBA	6	1,4
Liquide pleural	6	1,4
Hémocultures		
Ponction veineuse directe	32	7,5
Voie veineuse centrale	26	6,1
Cathéter artériel	1	0,2
Cathéter périphérique	2	0,5
Matériels		
Cathéter artériel	3	0,7
Cathéter central	9	0,2
Cathéter autre	3	0,7
Pace-maker	2	0,5
Liquides biologiques		
Urine	6	1,4
Liquide de drain	4	0,9
Liquide péritonéal	2	0,5
Liquide ascite	1	0,2
Autres liquides	4	0,9
Autres (divers)		
Cutané	5	1,2
Pièce opératoire	4	0,9
Plaie chirurgicale	3	0,7
Pus	3	0,7
Hématome	2	0,5
Coproculture	1	0,2
Fosses nasales	1	0,2
Verge	1	0,2
Total	425	

Les **prélèvements** respiratoires sont très largement représentés (**72,3% des prélèvements**) avec en chef de file l'aspiration trachéale (60,9% des prélèvements). La réalisation hebdomadaire (2 fois/semaine) d'aspirations trachéales en Réanimation explique cette surreprésentation. Loin derrière figurent les hémocultures (14,3%) et les prélèvements sur matériel (4%).

B. Mécanismes de résistances et phénotypes de résistances associés

Pour cette évaluation des mécanismes de résistance, nous nous sommes placés selon différents points de vus : en sélectionnant les souches résistantes soit à l'association ticarcilline-acide clavulanique, soit à l'association pipéracilline-tazobactam, soit à la ceftazidime, soit à l'imipénème, soit au méropénème. Nous avons ensuite regardé les corésistances au sein de la même famille et les résistances associées. Ceci avait pour objectif d'évaluer les mécanismes rencontrés quand une résistance donnée est observée sur l'antibiogramme.

B.1. Souches résistantes à la ticarcilline-acide clavulanique

Cent six patients sur les 142 inclus soit 74,6% ont présenté au moins une souche résistante à l'association ticarcilline-acide clavulanique. Cette résistance est le plus souvent associée à une résistance à la ticarcilline, à l'aztréonam, et parfois à l'association pipéracilline-tazobactam dans 46,2% des cas. Pour ces souches, la ceftazidime est sensible dans 68,9% des cas, le céfépime dans 74%, l'imipénème dans 67,9%, le méropénème dans 66% (*Tableau X*). Les résistances associées sont les suivantes : amikacine 17%, tobramycine 15,1%, la ciprofloxacine dans 35,8% et la colistine 0%.

Tableau X. Distribution des CMI chez les souches de P. aeruginosa résistantes à l'association ticarcilline-acide clavulanique.

CNAL	0.2	0.5	4	2	_	8	16	22	CA	120	256		Di	amèt	re
CMI	0,2	0,5	1		4	8	16	32	64	128	256	nr	S	I	R
TIC								19	5	1	16	63	1		1
TZP				3		44	8	11	3	2	31	2	1		1
CAZ		1		2	60	6	9	3	1	19			4		1
FEP			5	33	11	27	15	4		8		2	1		
IPM	1		10	60		6		27					1		1
MER	31	8	24	6	7	4		24					1		1
ATM				1	11	17	50	10	1	14				1	1
AN			63		14	10	11	1		5			1	1	
TM		88						16					2		
CIP	65	3	3	4	2	27									2
CS	78		18	8								2			

^{*} Les cases rouges correspondent aux CMI/diamètres de la catégorie R et en jaune de la catégorie I.

➡ Ce profil de résistance est compatible avec un mécanisme d'efflux associé ou non à une imperméabilité.

L'imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux semble être le mécanisme prépondérant à l'origine de la résistance à l'association ticarcilline-acide clavulanique (*Tableau XI*). Le phénotype de résistance le plus souvent rencontré à savoir une résistance associée à la ticarcilline, à l'aztréonam et parfois à la pipéracilline-tazobactam concorde avec ce résultat.

La surexpression d'AmpC, systématiquement associée à de l'imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux est retrouvée dans 28,3% des cas. Ceci correspond aux souches qui sont d'emblées multi-résistantes, c'est-à-dire les souches retrouvées chez les patients du groupe B.

Tableau XI. Fréquence des mécanismes de résistance supposés (déduits de l'antibiogramme) à l'origine de la résistance à l'association ticarcilline-acide clavulanique.

Mécanisme de résistance	Nombre	%	Mécanisme
IE	74	69,8	Déduit de l'antibiogramme
IE + Surproduction AmpC	26	24,5	Confirmé par test complémentaire
IE + Surproduction AmpC + BLSE	3	2,9	Confirmé par test complémentaire
IE + Surproduction AmpC + OXA 19	1	0,9	Confirmé par test complémentaire
Carbapénémase GES 5	1	0,9	Confirmé par test complémentaire

Pour une souche, le mécanisme n'a pas pu être déterminé.

B.2. Souches résistantes à la pipéracilline-tazobactam

Soixante trois patients sur les 142 inclus soit 44,4% ont présenté au moins une souche résistante à l'association pipéracilline-tazobactam. Cette résistance est systématiquement associée à une résistance à la ticarcilline, à l'association ticarcilline-acide clavulanique ainsi qu'à l'aztréonam. Pour ces souches la ceftazidime est sensible dans 34,9% des cas, le céfépime dans 45,2%, l'imipénème dans 60,3% et le méropénème dans 50,8% (*Tableau XII*).

Les résistances associées sont les suivantes : amikacine 23,8%, tobramycine 20,6%, ciprofloxacine dans 52,9% des cas. Seule la colistine est systématiquement sensible.

Tableau XII. Distribution des CMI chez les souches de P. aeruginosa résistantes à l'association pipéracilline-tazobactam

CDAL	0.2	0.5	1	2	4	8	16	22	64	128	256	ND	D	iamètr	e
CMI	0,2	0,5	1	2	4	0	16	32	04	128	250	NR	S	- 1	R
TIC								5	3	2	14	38			1
TCC								2	7	7	46				1
CAZ					12	6	12	3	1	24			4		1
FEP		1		1	2	22	20	5		9		1	2		
IPM			4	34		4		20							1
MER	3	7	16	6	7	2		21							1
ATM				1	1	4	25	9	1	21					1
AN			31		9	7	9	1		5			1		
TM		49						13					1		
CIP	26	4	4	3		25								1	
CS	48		7	7				,				1			

^{*} Les cases rouges correspondent aux CMI/diamètres de la catégorie R et en jaune de la catégorie I.

➡ Ce profil de résistance est compatible avec un mécanisme d'efflux associé ou non à une imperméabilité. Il est présent dans 65,1% des cas.

Vient ensuite la surproduction d'AmpC (présente dans 58,8% des cas). Ces mécanismes de résistances sont associés dans 27% des cas (*Tableau XIII*).

Tableau XIII. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistance à l'association pipéracilline-tazobactam

Mécanisme de résistance	Nombre	%	Mécanisme
IE	24	38,1	Déduit de l'antibiogramme
AmpC	16	25,4	Confirmé par test complémentaire
IE + AmpC	17	27	Confirmé par test complémentaire
AmpC + BLSE	3	4,8	Confirmé par test complémentaire
AmpC + OXA19	1	1,6	Confirmé par test complémentaire
Carbapénèmase GES-5	1	1,6	Confirmé par test complémentaire

B.3 Souches résistantes à la ceftazidime

Quarante-deux patients sur les 142 inclus soit 29,6% ont présenté au moins une souche résistante à la ceftazidime. La résistance à la ceftazidime est systématiquement associée à une résistance à ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam. Pour ces souches, le céfépime est sensible seulement dans 17,1% des cas, cependant les souches sensibles présentent toutes une CMI à 8 (souche R à partir d'une CMI = 16 mg/L). La résistance aux carbapénèmes est fréquente : imipénème dans 47,6%, le méropénème 52,4% (*Tableau XIV*).

Les résistances associées sont les suivantes : amikacine 43,3%, tobramycine 28,6%, ciprofloxacine 22,4%. Une nouvelle fois seule la colistine est systématiquement sensible.

Tableau XIV. Distribution des CMI chez les souches de P. aeruginosa résistantes à la ceftazidime

CDAL	0.3	0.5	1	2	4	0	10	22	CA	120	356		D	iamètr	e
CMI	0,2	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	nr	S	ı	R
TIC								2	1	2	13	23			1
TCC								1	2	3	35				1
TZP								3	1	4	33				1
FEP						7	18	6		10		1			
IPM			2	20		4		15							1
MER		7	11	2	3	2		16							1
ATM						2	14	6		19					1
AN			18		6	3	8	1		5			1		
TM		29						12					1		
CIP	16	3	1	3		18									1
CS	29	2	6	4								1			

Les cases rouges correspondent aux CMI/diamètres de la catégorie R et en jaune de la catégorie I.

▶Le profil le plus fréquemment retrouvé en cas de résistance à la ceftazidime est la surproduction de la céphalosporinase AmpC (confirmé par test complémentaire sur gélose à la cloxacilline). Ce mécanisme de résistance a été retrouvé dans 97,5% des cas.

L'imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux est associée dans 48,8% des cas à la surproduction d'AmpC (*Tableau XV*). Cette association entraîne une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines, y compris les carbapénèmes. En effet, respectivement 22 souches (52,4%) résistantes à la ceftazidime sont résistantes ou de sensibilité intermédiaire au méropénème et 20 (47,6%) à l'imipénème. Cette association surproduction d'AmpC+imperméabilité et/ou surexpression d'efflux, est bien décrite dans la littérature comme responsable des résistances aux carbapénèmes (43)(44).

Tableau XV. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistance à la ceftazidime

Mécanisme de résistance	Nombre	%	Mécanisme
Surproduction AmpC	16	39	Confirmé par test complémentaire
Surproduction AmpC + IE	20	48,8	Confirmé par test complémentaire
Surproduction AmpC + BLSE	3	7,3	Confirmé par test complémentaire
Carbapénèmase	1	2,4	Confirmé par test complémentaire
Surproduction AmpC + OXA 19	1	2,4	Confirmé par test complémentaire

Pour une souche, le mécanisme n'a pas pu être déterminé.

B.4 Souches résistantes à l'imipénème

Cinquante-deux patients sur les 142 inclus soit 36,6% ont présenté au moins une souche résistante ou de sensibilité intermédiaire à l'imipénème. Ces souches sont sensibles à l'association ticarcilline-acide clavulanique dans 7,7% des cas, à l'association pipéracilline-tazobactam dans 45,1%, à la ceftazidime dans 61,5%, au céfépime dans 66,7%, et au méropénème dans 13,5% (*Tableau XVI*).

Les résistances associées sont les suivantes : amikacine 48,5%, tobramycine 25,4%, la ciprofloxacine dans 53,8%. La colistine reste encore le seul antibiotique systématiquement efficace.

Tableau XVI. Distribution des CMI chez les souches de P. aeruginosa résistantes à l'imipénème

CDAL	0.3	0.5	1	2	4	0	16	22	CA	120	356		Di	iamèt	re
CMI	0,2	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	nr	S	- 1	R
TIC							1	7	3	1	9	29	1		1
TCC					1		2	10	7	1	29		1		1
TZP				3		12	7	7		3	17	1	1		1
CAZ		2		1	22	4	4	3	1	11			3		1
FEP		1		8	9	14	8	2		6		2	2		
MER		2	4		5	5		34					1		1
ATM		1			2	5	25	7		10				1	1
AN			25		9	6	7	1		2			2		
TM		42						8					2		
CIP	19	4		4		23							1		1
CS	35		8	7								2			

Les cases rouges correspondent aux CMI/diamètres de la catégorie R et en jaune de la catégorie I.

▶Ce profil de résistance est compatible avec un mécanisme d'imperméabilité associé ou non à la surexpression d'efflux (supposé présent dans 96,1% des cas). La résistance à l'imipénème est en effet généralement due à une modification de la porine D2 (43)(44).

Associées à la surproduction d'AmpC dans 31,4% des cas, ces deux mécanismes exprimés en même temps expliquent probablement que les souches résistantes à l'imipénème soient aussi résistantes à la ceftazidime (38,5%).

Tableau XVII. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistance à l'imipénème

Mécanisme de résistance	Nombre	%	Mécanisme
Surproduction AmpC + IE	16	31,4	Confirmé par test complémentaire
Surproduction AmpC + BLSE	1	2	Confirmé par test complémentaire
IE	33	64,7	Déduit de l'antibiogramme
Carbapénèmase	1	2	Confirmé par test complémentaire

Pour une souche, le mécanisme n'a pas pu être déterminé.

B.5 Souches résistantes au méropénème

Cinquante-deux patients sur les 142 inclus soit 36,6% ont présenté au moins une souche résistante ou de sensibilité intermédiaire au méropénème. Ces souches sont systématiquement résistantes à la ticarcilline-acide clavulanique ainsi qu'à la ticarcilline et l'aztréonam. Ces souches sont sensibles à la pipéracilline-tazobactam dans 33,3%, à la ceftazidime dans 61,5%, au céfépime dans 66,7%, et à l'imipénème dans seulement 15,4% (*Tableau XVIII*).

Les résistances associées sont les suivantes : amikacine 36,5%, tobramycine 25,4%, ciprofloxacine 53,8%, et enfin toutes les souches sont sensibles à la colistine.

Tableau XVIII. Distribution des CMI chez les souches de P. aeruginosa résistantes au méropénème.

CDAL	0.3	0.5					16	22		120	356		Dia	amèti	re
CMI	0,2	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	nr	S	1	R
TIC								7	3	1	9	30			2
TCC								9	7	1	34				1
TZP				1		9	7	11		3	18	2			1
CAZ		1			22	5	4	3	1	11			4		1
FEP				8	8	16	9	2		6		1	2		
IPM				8		5		38							1
ATM					2	5	27	5		12					1
AN			25		9	8	6	1		2			1		
TM		43						8					1		
CIP	20	4	2	3		22									1
CS	38		9	4								1			

^{*} Les cases rouges correspondent aux CMI/diamètres de la catégorie R et en jaune de la catégorie I.

▶Ce profil de résistance est compatible avec un mécanisme de surexpression de systèmes d'efflux associé ou non à des mécanismes d'imperméabilité (présent dans 96,1% des cas).

Associée à la surproduction d'AmpC dans 31,4%, ces deux mécanismes exprimés en même temps, comme pour les souches résistantes à l'imipénème, expliquent probablement les souches résistantes au méropénème mais aussi à la ceftazidime (38,5% des souches résistantes au méropénème sont résistantes à la ceftazidime) (*Tableau XIX*).

Tableau XIX. Fréquence des mécanismes de résistance à l'origine de la résistance au méropénème

Mécanisme de résistance	Nombre	%	Mécanisme
Surproduction AmpC + IE	16	31,4	Confirmé par test complémentaire
Surproduction AmpC + BLSE	1	2	Confirmé par test complémentaire
IE	33	64,7	Déduit de l'antibiogramme
Carbapénèmase	1	2	Confirmé par test complémentaire

Pour une souche, le mécanisme n'a pas pu être déterminé.

B.6. Résistances associées

Les résistances associées en fonction de la résistance aux bêta-lactamines sont résumées dans le *Tableau XX*. La tobramycine semble être la molécule hors bêta-lactamine la plus souvent efficace à l'encontre de *P. aeruginosa*. Sauf dans le cas où la ceftazidime est R, c'est-à-dire où le mécanisme de résistance prépondérant est la surproduction de la céphalosporinase AmpC, dans ce cas la ciprofloxacine semble la plus souvent efficace.

Tableau XX. Résistances associées (%) selon la résistance des bêta-lactamines étudiées

	R TCC	R TZP	R CAZ	R IPM	R MER
AN	17	23,8	43,3	48,5	36,5
TM	15,1	20,6	28,6	25,4	25,4
CIP	35,8	52,9	22,4	53,8	53,8
CS	0	0	0	0	0

B.7. Acquisition d'enzyme et phénotypes de résistances associées

Au cours de l'étude, une carbapénémase GES-5, 2 BLSE GES-1, une BLSE SHV-2a et une oxacillinase à spectre élargie (OXA-19) ont été détectées (confirmation par envoi des souches au CNR). Pour ces 5 souches, à l'exception de la colistine, toutes les souches étaient résistantes aux antibiotiques autres que les bêta-lactamines étudiés.

Tableau XXI. Phénotype de résistance des souches de P. aeruginosa ayant acquis une enzyme telle qu'une BLSE, oxacillinase à spectre élargi, carbapénèmase (CMI en mg/L).

Enzymes	TIC	TCC	TZP	CAZ	FEP	IMP	MER	AN	TM	CIP	CS
Carbapénèmase GES-5	NT	>128	>128	>64	16	>16	>16	>64	>16	>4	<0,5
OXA-19	NT	>128	256	4	>64	1	1,5	>64	>16	>4	<0,5
BLSE SHV-2a	>128	>128	>128	16	>64	2	2	>64	>16	>4	<0,5
BLSE GES-1	>128	>128	>128	>64	>64	2	1	>64	>16	>4	1
BLSE GES-1	>128	>128	64	>64	>64	2	1	>64	>16	>4	1

NT : non testé

C. Cinétique de résistance

C.1. Caractéristiques des patients colonisés-infectés à P. aeruginosa

Le groupe A était composé de 68 patients, 38 pour le groupe B et 36 pour le groupe C. Les caractéristiques des 3 groupes sont résumées dans le *Tableau XXII*.

Tableau XXII. Résumé des caractéristiques étudiées dans les 3 groupes.

	Groupe A (n=68)	Groupe B (n=38)	Groupe C (n=36)	p¹	p ²	p³
Age (années) (moyenne)	65,3	63,8	57,9	ns	ns	ns
Sex ratio (F/M)	0,48	0,46	0,2	ns	ns	ns
Durée d'hospitalisation (j) (moyenne)	24,4	36,6	61,6	ns	<0,001	<0,05
Hospitalisation antérieure (%)	41,2	65,8	66,7	0,026	0,023	ns
Durée VM (j) (moyenne)	19,5	18,8	46,2	ns	<0,001	<0,001
Réintubation (%)	11,8	18,4	38,9	ns	0,003	ns
Infection PA (%)	50	55,3	83,3	ns	0,0011	ns
Colonisation PA (%)	61,8	44,7	22,2	ns	0,0011	ns
Infection autres (%)	35,3	31,6	52,8	ns	ns	ns
Colonisation autres (%)	60,3	60,5	75	ns	ns	ns
Mortalité (%)	27,9	31,6	27,8	ns	ns	ns

 p^1 : Comparaison entre les groupes A et B; p^2 : Comparaison entre les groupes A et C; p^3 : Comparaison entre les groupe B et C Le test ANOVA unilatéral a été réalisé pour les variables quantitatives continues, et le test du chi² pour variables catégorielles, avec le logiciel graphad prism version 6.00

Il ne semble pas y avoir de différences significatives d'âge et de sexe entre les 3 groupes.

La durée d'hospitalisation et le nombre de jour de ventilation semblent significativement supérieures, dans le groupe C par rapport au groupe A, ainsi que par rapport au groupe B.

La fréquence de ré-intubation après échec d'extubation, d'infection et de colonisation par P. aeruginosa, est significativement supérieure dans le groupe C par rapport au groupe A.

La fréquence d'hospitalisation antérieure semble elle significativement supérieure dans les groupes B et C (respectivement 65,8% et 66,7%), par rapport au groupe A (41,2%).

Enfin, concernant la mortalité, il ne semble pas y avoir de différences significatives entre les 3 groupes.

C.2. Cinétique de résistance et antibiothérapie

Vingt-neuf axes chronologiques de l'évolution des souches en fonction des antibiotiques administrés ont été créés sur les 36 patients du groupe C (seuls les plus probants ont été réalisés). Ces axes sont présentés en *Annexe II*. Les axes n'ont pu être réalisés pour 7 patients en raison d'une absence de renseignements cliniques ou en raison d'isolements des souches sur des sites anatomiques de prélèvements différents.

L'objectif était de relever les antibiotiques reçus durant l'intervalle de temps entre deux prélèvements avec isolement de souches de *P. aeruginosa* avec profils de résistance différents.

Deux mécanismes de résistances ont été étudiés ainsi : l'imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux (dont l'acquisition a été observée 22 fois) ainsi que la surproduction d'AmpC (dont l'acquisition a été observée 13 fois). Les antibiotiques prescrits durant cette période ainsi que le nombre de jour de traitement reçus selon les mécanismes de résistances mis à jour sont résumés dans les tableaux XXII et XXIV.

Pour l'acquisition du mécanisme de résistance : imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux, le traitement le plus retrouvé est le méropénème.

Pour l'acquisition du mécanisme de résistance : surproduction d'AmpC, les antibiotiques les plus souvent retrouvés sont <u>la pipéracilline-tazobactam et la</u> ceftazidime.

Tableau XXIII. Antibiotiques reçus et nombre de jours de traitement chez les patients ayant sélectionnés comme mécanisme de résistance l'imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux (n=22)

A) Bêta-lactamines

	TCC	TZP	CAZ	FEP	IPM	MER
Nb fois prescrit	1/22	3/22 (13.6%)	5/22 (27,3%)	2/22	2/22	12/22 (54,5%)
(%)	(4,5%)	-, (, -, -,	-7 (7-7-7	(9,1%)	(9,1%)	, (0 1,070)
Nb jours avant apparition de la résistance (médiane) (min-max)	12	8,5 (3-14)	11 (5-14)	14	8,5 (3-14)	7,5 (3-14)

B) Autres antibiotiques

	AN	TM	GM	CIP	CS	A.CS	SXT	LZD	VA
Nb de fois prescrit	5/22	4/22	1/22	3/22	3/22	3/22	1/22	1/22	2/22
(%)	(27,3%)	(18,2%)	(4,5%)	(13,6%)	(13,6%)	(13,6%)	(4,5%)	(4,5%)	(9,1%)
Nb j avant apparition de la résistance (médiane) (min-max)	3,5 (3-7)	4	5	14 (6-14)	5 (4-5)	12 (11-30)	8	14	5

Tableau XXIV. Antibiotiques reçus et nombre de jours de traitement chez les patients ayant sélectionnés comme mécanisme de résistance une surproduction d'AmpC (n=13)

A) Bêta-lactamines

	TZP	CAZ	IPM	MER
	7/13	5/13	2/13	3/13
Nb fois prescrit	(53,8%)	(38,5%)	(15,4%)	(23,1%)
Nb jours avant				
apparition de la	7	9,5	10	14
résistance (médiane)	(3-10)	(7-14)	10	(9-11)
(min-max)				

B) Autres antibiotiques

	AN	TM	CS	Aérosols CS	Aérosols TM
	4/13	4/13	2/13	1/13	1/13
Nb fois prescrit	(30,8%)	(30,8%)	(15,4%)	(7,7%)	(7,7%)
Nb jours avant apparition de la résistance (médiane) (min-max)	4	4 (3-4)	16	11	11

D. <u>Infections et colonisations associées par des germes autres que P.</u> aeruginosa

Nous avons noté les colonisations et infections, par des germes autres que *P. aeruginosa*, concomitantes à une colonisation ou à une infection par *P. aeruginosa* pour un même site de prélèvement. L'objectif étant d'identifier de possibles BMR autres que *P. aeruginosa* sélectionnées en même temps que *P. aeruginosa*. Nous avons considéré comme BMR seulement les Entérobactéries productrices d'une BLSE, et/ou carbapénèmase, et/ou céphalosporinase déréprimée et les SARM.

D.1. Infections associées

Une infection associée a été retrouvée chez 52 patients soit dans 36,6% des cas. En intégrant les groupes, une infection associée était présente chez 21 patients du groupe A soit dans 35,3% des cas, chez 12 patients du groupe B soit 31,6% des cas et chez 19 patients du groupe C soit dans 52,8% des cas. Le détail des germes selon les groupes est résumé dans le tableau XXV.

Tableau XXV. Germes autres que P. aeruginosa responsables d'une infection sur le même site de prélèvement (nombre de fois ou le germe est retrouvé).

	Groupe A (n=68)		Groupe B (n=38)		Groupe C (n=36)	
	TOTAL	BMR*	TOTAL	BMR*	TOTAL	BMR*
Entérobactéries	13	3	10		13	5
- Groupe 1*	4	1(BLSE)	1		4	
- Groupe 2*	2		5		4	3(2 BLSE, 1Carbapénèmase)
- Groupe 3*	8	2 (1 BLSE, 1 Case)	4		7	2 (2BLSE)
Non fermentants	1		4		6	
Dont S. maltophilia	1		3		3	
S. aureus	4	2	1	1	4	
Streptocoques	2				2	
Entérocoques	4		3		2	
Anaérobies	3					
Levures	1					

^{*} les BMR considérées sont : BLSE ou céphalosporinase déréprimée (Case) ou carbapénémase pour les Entérobactéries ; résistance à la méticilline pour S. aureus

^{*} Entérobactérie du groupe 1 : E. coli, Shigella spp., P. mirabilis, Salmonella spp.

^{*} Entérobactéries du groupe 2 : K. pneumoniae, K. oxytoca, C. koseri

^{*} Entérobactérie du groupe 3 : Enterobacter spp., Serratia spp., Morganella spp., Pantoea spp., Hafnia spp., C. freundii, Providencia spp.

Les Entérobactéries semblent être les germes associées au *P. aeruginosa* le plus souvent responsable d'infections du même site et ce dans les 3 groupes patient. On retrouve plus de BMR dans le groupe C que dans les autres groupes (A et B) et plus de BGN non fermentants dont notamment le *S. maltophilia* dans le groupe C par rapport au groupe B et dans le groupe B par rapport au groupe A.

D.2. Colonisations associées

Une colonisation associée a été retrouvée chez 91 patients soit 64,1% des cas. En intégrant les groupes une colonisation associée était présente chez 41 patients du groupe A soit 60,3% des cas, chez 23 patients du groupe B soit 60,5% des cas, et chez 27 patients du groupe C soit 75% des cas.

Les Entérobactéries semblent les colonisant les plus fréquemment rencontrés avec *P. aeruginosa* sur un même site de prélèvement dans le groupe A et B. Dans le groupe C, les BGN non fermentants ainsi que les levures semblent plus fréquent avec en chef de file le *S.maltophilia*. Le détail des germes selon les groupes est résumé dans le tableau *XXV*.

Tableau XXVI. Germes autres que P. aeruginosa responsables d'une colonisation associée sur le même site de prélèvement (nombre de fois ou le germe est retrouvé).

	Groupe A		Groupe B		Groupe C	
	TOTAL	BMR	TOTAL	BMR	TOTAL	BMR
Entérobactéries	18	1	11		10	1
- Groupe 1	3		5		5	
- Groupe 2	5		2		1	
- Groupe 3	10	1 (1Case)	4		3	1 (1 BLSE)
Non fermentants	6		3		13	
Dont S. maltophilia	3		3		10	
S. aureus	3		4	2	6	1
Streptocoques						
Entérocoques	5		2		7	
Anaérobies						
Levures	16		9		15	

IV. Discussion

L'acquisition exogène, c'est-à-dire la transmission via un réservoir, semble être le modèle le plus fréquent concernant l'acquisition de *P. aeruginosa* en Réanimation (19). Le risque de colonisation à *P. aeruginosa* ainsi que le phénotype de résistance de départ de la souche dépendent donc pour beaucoup de l'écologie du service.

Epidémiologie des résistances

Dans notre étude, c'est à dire dans le service de Réanimation de l'hôpital Rangueil, 24,4% des patients ont eu des souches de *P. aeruginosa* sensibles à l'ensemble des bêta-lactamines utilisées sur cette bactérie. Une majorité de patients (74,6%), ont présenté une souche résistante à l'association ticarcilline-acide clavulanique le plus souvent par surexpression d'efflux associée ou non à de l'imperméabilité, et une résistance dans 46,2% des cas à la pipéracilline-tazobactam. Ainsi, la surexpression d'efflux associée ou non à l'imperméabilité semble être le mécanisme de résistance aux bêta-lactamines d'intérêt médical le plus fréquemment retrouvé dans notre étude.

Concernant les souches de *P.aeruginosa* résistantes à la ceftazidime, 29,6% des patients ont présenté ce type de résistance, un résultat similaire (23,6% en 2012 et 20,8% en 2013) a été retrouvé par l'étude « Réa-raisin 2012 » (2)(74). Nous retrouvons comme dans la littérature (41)(75) son explication par la surproduction de la céphalosporinase AmpC présente dans 97,5% des cas, responsable d'une résistance à toutes les bêta-lactamines en dehors des carbapénèmes. Associée à de l'imperméabilité et/ou de la surexpression d'efflux dans 48,8% des cas, les carbapénèmes deviennent à leurs tour inutilisables.

Dans 12,1% des cas, les souches ceftazidime résistantes possédaient soit une BLSE, soit une ES-OXA, soit une carbapénèmase. Ce résultat est concordant avec l'étude réalisée en France par Hocquet *et al.* (46) qui retrouvaient dans 9,3% de cas ces enzymes en cas de résistance à la ceftazidime. Parmi ces enzymes, une OXA-19 a été retrouvée; ce mécanisme étant décrit comme émergent : 33% des BLSE ou ES-OXA ou carbapénèmase seraient des oxacillinases (46)(47).

Pendant leur hospitalisation, 36,6% des patients ont présenté une souche résistante à l'imipénème, on retrouve cette même fréquence pour les souches résistantes au méropénème. Ce résultat est supérieur à ceux trouvés dans la littérature et notamment

l'étude « Réa-raisin » qui retrouvait cette résistance dans 23,4% des cas en 2012 et 24,7% en 2013 (2)(43)(74). Le mécanisme de résistance le plus fréquent (uniquement déduit de l'antibiogramme, ce qui est un des principaux biais de cette étude) semble être l'imperméabilité associée ou non avec une surexpression d'efflux retrouvée dans 96,1% des cas, résultat compatible avec la littérature. En effet, Castanheira et al. retrouve dans 89,5% des cas une modification d'OprD en cas de résistance à l'imipénème (43),Rojo-Beazres et al. dans 98,2% des cas (76), et Fournier et al. 86,2% en cas de résistance au doripénème (44). Dans 31,4% des cas, l'imperméabilité associée ou non avec une surexpression d'efflux est associée à la surproduction de la céphalosporinase AmpC. Ce résultat est inférieur aux données de précédentes études (43)(77)(78) qui retrouve des fréquences allant de 44% à 65%. Ainsi, nous retrouvons, plus de résistances aux carbapénèmes provoquées par l'association imperméabilité et surexpression d'efflux, association présente sans autre mécanisme de résistance dans 64,7% des cas. Ceci paraît concordant avec l'étude de la cinétique des résistances au court de l'hospitalisation qui a vu un nombre d'acquisition du mécanisme de résistance imperméabilité et/ou surexpression d'efflux plus important (observé22 fois) que le nombre d'acquisition du mécanisme de résistance surproduction de la céphalosporinase AmpC (observé13 fois). Les raisons de cette surreprésentation de l'imperméabilité et/ou de la surexpression de l'efflux chez les souches de P. aeruginosa des patients de la Réanimation Rangueil pourrait être lié à une écologie particulière du service, avec des souches de P. aeruginosa présentant cette résistance ou l'acquérant au court de l'hospitalisation. Une seule carbapénèmase a été retrouvée, ce qui représente 2% des souches de P. aeruginosa résistantes aux carbapénèmes. Malgré un effectif faible de notre étude (deuxième biais), ce résultat est cohérent avec ceux d'études précédentes en France (43)(44) qui en retrouvaient 6,4%.

Il est à noter que, comme décrit par *Fournier et al.* (44), les souches de *P. aeruginosa* exprimant une enzyme telle qu'une BLSE, ou une OXA ou une carbapénèmase retrouvées dans notre étude sont toutes résistantes à la tobramycine. L'observation des résistances associées, et en particulier d'une résistance à la tobramycine pourrait être un point d'appel sur l'antibiogramme pour la recherche de ces résistances.

Comparaison des caractéristiques des patients

Si on considère les caractéristiques des patients colonisés-infectés par *P. aeruginosa,* les patients du groupe C, c'est à dire présentant une évolution des résistances de

P. aeruginosa vis-à-vis de la ceftazidime et/ou de l'imipénème et/ou du méropénème semblent plus jeunes et sont plus fréquemment des hommes (cependant différence non significative par rapport aux autres groupes). Par contre, ils ont une durée d'hospitalisation et de ventilation mécanique plus importante, une fréquence de réintubation plus importante que les patients du groupe A (ne présentant que des souches sensibles à la ceftazidime, à l'imipénème et au méropénème) et du groupe B (patients ne présentant que des souches résistantes à la ceftazidime et/ou à l'imipénème et/ou au méropénème). Ils ont aussi une fréquence d'hospitalisation antérieure similaire aux patients du groupe B mais supérieure aux patients du groupe A. C'est-à-dire que les patients des groupe B et C provenaient plus d'autres services de soins que les patients du groupe A qui provenaient plus de leur domicile. Enfin, malgré une fréquence d'infection et de colonisation par P. aeruginosa plus importante dans le groupe C par rapport aux 2 autres groupes (différence significative), et ce par une souche résistante, on ne note pas de différence de mortalité entre les 3 groupes. En conclusion, les patients du groupe C, plus jeunes, doivent avoir une histoire médicale moins lourde que les patients des autres groupes (moins d'antécédents d'hospitalisation, de traitement par antibiotiques, de vie en institution) expliquant la ou les premières souches de P.aeruginosa sensibles isolées au début de l'hospitalisation. Ils entrent très probablement dans un premier service avant d'être transférés en Réanimation expliquant la fréquence élevée d'hospitalisation antérieure. Par la suite, ils sont exposés à de nombreux facteurs connus comme étant des facteurs de risques de sélection de BMR (5) : durée d'hospitalisation et de ventilation fréquence importante des réintubations et antibiothérapies mécanique élevée, multiples. L'exposition importante à ces facteurs serait à l'origine de la sélection, secondairement, d'une souche de P. aeruginosa résistante.

Les patients du groupe B, semblaient plus âgés et avec un équilibre hommes/femmes plus important que les patients du groupe C. Ils ont donc probablement déjà connus plusieurs d'hospitalisations ou vivent en institution pour certains et ont possiblement déjà reçu de multiples antibiothérapies. Ces facteurs connus comme favorisant la sélection de BMR(5) expliqueraient la présence d'une souche de *P. aeruginosa* résistante dès le début de l'hospitalisation. Il serait donc nécessaire d'évaluer les antécédents des patients afin de vérifier la présence ou l'absence de ces facteurs dans les 3 groupes. Ceci est une des limites de notre étude rétrospective : nous n'avons pas eu accès, dans les dossiers des patients, aux antécédents d'hospitalisation, ni aux services dans lesquels ils avaient été

précédemment hospitalisés, s'ils vivaient en institution, et nous n'avions pas de données non plus sur les antibiothérapies antérieures. Il est donc difficile de comparer les 3 groupes de patients sur ces données.

Ce qui est intéressant à noter, c'est que la mortalité semble identique dans les 3 groupes (différence non significative). Ainsi, dans notre étude la présence d'une souche de P. aeruginosa résistante dès le début de l'hospitalisation, ou sa sélection au cours de l'hospitalisation ne semble pas avoir une influence directe sur la mortalité. La relation entre la résistance de P. aeruginosa et la mortalité est complexe. En effet, il est établi aujourd'hui que la rapidité d'installation d'une antibiothérapie efficace est un facteur essentiel pour la survie du patient (13). Ainsi la présence d'une souche de P. aeruginosa multi-résistante en retardant la mise en place d'une antibiothérapie adaptée devrait augmenter la mortalité. Cependant, les patients infectés par de telles souches présentent déjà de nombreux facteurs augmentant leur mortalité (nombreuses comorbidités notamment) par rapport aux patients infectés par des souches plus sensibles. Ainsi, certaines études expliquent l'augmentation de la mortalité chez les patients infectés par une souche de P. aeruginosa multi-résistante par la présence de comorbidités et non par la présence de la souche résistante infectante (18). Au final, une importante méta-analyse réalisée par l'American Society for Microbiology retrouve une augmentation de la mortalité liée à la résistance de P. aeruginosa aux antibiotiques lorsque celui-ci est résistant à 4 antibiotiques « anti P. aeruginosa » ou plus (79). Ici, l'effectif de notre étude est faible, et un suivi prospectif des patients chez lesquels on isole des souches de P. aeruginosa serait intéressant afin de confirmer cette observation. Il serait intéressant aussi de regarder les autres bactéries isolées chez le patient, les délais d'adaptation de l'antibiothérapie mais aussi l'adéquation de l'antibiothérapie probabiliste, les motifs d'hospitalisation ou encore les comorbidités, afin d'avoir des groupes homogènes et de pouvoir réellement comparer la mortalité entre les groupes en tenant compte de tous ces facteurs.

Les infections associées semblent être le plus souvent dues à des Entérobactéries de phénotype sauvage. On note toutefois dans le groupe C un nombre plus important d'Entérobactéries définis comme étant une BMR, c'est-à-dire exprimant une BLSE ou une carbapénèmase ou ayant déréprimé leur céphalosporinase inductible pour celle qui en sont capable. Ceci est concordant avec l'hypothèse que les patients du groupe C, fréquemment infectés par *P. aeruginosa* et par d'autres germes reçoivent de nombreuses

antibiothérapies qui associées avec les facteurs de risques de BMR déjà décrit dans ce groupe semble sélectionner des BMR autres que *P. aeruginosa* résistante à la ceftazidime et/ou à l'imipénème et/ou au méropénème.

Les colonisations associées semblent être le plus souvent causées par des Entérobactéries de phénotype sauvage et des levures. Le groupe C semble présenter comme colonisant fréquent en plus des Entérobactéries et des levures, *Stenotrophomonas maltophilia*. La présence de cette bactérie comme colonisant fréquent des patients du groupe C est concordant avec le scénario envisagé pour ce groupe à savoir : un groupe de patients fréquemment infectés par *P. aeruginosa* ainsi que par d'autres germes, recevant de nombreuses antibiothérapies dirigées principalement contre *P. aeruginosa* et les autres germes causant l'infection (Entérobactéries +++). *S. maltophilia* est une bactérie naturellement résistante aux bêta-lactamines habituellement utilisées dans ces infections, de faible pathogénicité, connue comme pouvant être un colonisant de l'arbre trachéo-bronchique. Les prélèvements respiratoires étant très largement représentés dans l'étude, la sélection de *S. maltophilia* suite aux multiples antibiothérapies inefficaces à son encontre semble cohérente.

Evolution des résistances au cours de l'hospitalisation et influence de l'antibiothérapie

Les axes chronologiques, effectués chez 29 patients, nous ont permis d'observer plus fréquemment l'acquisition d'imperméabilité et/ou de surexpression d'efflux (22 fois) que la surproduction d'AmpC (13 fois). En cas d'acquisition d'imperméabilité et/ou de surexpression d'efflux, un traitement par méropénème a été retrouvé le plus souvent (12 fois soit 54,2% des cas), pour une durée médiane de traitement de 7,5 jours. Lors de l'acquisition de la surproduction d'AmpC, l'association pipéracilline-tazobactam a été retrouvée 7 fois soit dans 53,8% des cas pour une durée médiane de traitement de 7 jours et la ceftazidime retrouvée 5 fois soit 38,5% des cas pour une durée médiane de traitement de 9,5 jours. Ces deux antibiotiques semblent donc être les traitements le plus fréquemment administrés lorsqu'on sélectionne la surproduction d'AmpC. Ce relevé présente cependant comme principales limites :

- son caractère rétrospectif (données potentiellement incomplètes sur les antibiothérapies)
- son faible nombre de patients pour lesquels fut observé un passage d'une souche dite « sensible » à une souche dite « résistante ».

Au vu de ces limites, il semblerait que les antibiotiques sélectionnant des souches résistantes soient plutôt les bêta-lactamines : méropénème pour l'imperméabilité et/ou la surexpression d'efflux, pipéracilline-tazobactam et ceftazidime pour la surproduction de la céphalosporinase AmpC. Les autres antibiotiques (aminosides et fluoroquinolones principalement) ne semblent pas sélectionner des résistances particulières. On retrouve des données proches de celles déjà publiées dans la littérature pour les bêta-lactamines mais pas pour les autres antibiotiques (20)(25)(26). En effet, dans la littérature la ciprofloxacine est décrite comme une molécule favorisant nettement la sélection de souches de *P. aeruginosa* résistantes. La faible prescription de la ciprofloxacine dans le service de Réanimation de Rangueil par souci d'épargne des fluoroquinolones pourrait expliquer cette absence.

Une des limites importantes de l'étude est l'absence de comparaison par MLST des souches de *P. aeruginosa* chez les patients du groupe C afin de s'assurer que l'évolution de la résistance observée l'effet d'une même souche et non pas la sélection de souches différentes de *P. aeruginosa* avec un profil de résistance différent. Ainsi la comparaison de ces souches pourrait permettre de conforter les résultats retrouvés.

CONCLUSION

L'exposition aux bêta-lactamines: ceftazidime ou pipéracilline-tazobactam ou méropénème semble être un facteur de risque prédictif de sélection d'une souche de P. aeruginosa résistante aux bêta-lactamines et aux autres antibiotiques. Cette résistance étant le plus souvent la conséquence d'une modification d'expression de mécanismes de résistances dit naturels de P. aeruginosa, c'est-à-dire la surexpression d'efflux et/ou l'imperméabilité et la surproduction de la céphalosporinase inductible AmpC. La ceftazidime et la pipéracilline-tazobactam favorisant la sélection d'une souche résistante via la surproduction d'AmpC et le méropénème par la surexpression d'efflux et/ou l'imperméabilité. Dans notre étude, l'acquisition d'enzymes telles que des carbapénémases, BLSE et oxacillinases à spectre élargi reste faible. Néanmoins, lorsque de telles enzymes sont retrouvées, elles sont associées à l'acquisition d'autres mécanismes de résistance rendant la souche résistante aux aminosides et aux fluoroquinolones. Enfin, la sélection d'une souche de P. aeruginosa résistante aux bêtalactamines peut s'accompagner de la sélection d'autres bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques, comme des Entérobactéries ayant acquis une BLSE ou une carbapénèmase, ou présentant une dérépression de leur céphalosporinase inductible, ou de S. maltophilia.

Les caractéristiques des patients semblent différentes en fonction de la présence en début d'hospitalisation d'une souche de *P. aeruginosa* résistante, ou de sa sélection au cours de l'hospitalisation. Une étude plus approfondie des caractéristiques cliniques, démographiques, du séjour en Réanimation, et des thérapeutiques, permettrait de mieux comprendre la dynamique de colonisation et d'évolution des résistances chez *P. aeruginosa* en Réanimation. Une étude prospective est prévue pour répondre à ces différentes questions.

Touloux, le 15.04.2016

Vu permis d'imprimer Le Doyen de la Faculté de médecine Ranguel Elie SERRANO

79

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements antiinfectieux en établissement de santé, France, mai-juin 2012. Réseau D'alerte D'investigation Surveill Infect Nosocomiales.
- 2. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. Réseau REA-Raisin Fr. 2012;
- 3. Chastre J, Fagon J. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. :2002.
- 4. ROGUES A-M. La visite de risque appliquée à l'hygiène hospitalière: Evaluer le risque infectieux autrement. [cited 2015 Sep 28]; Available from: http://aurore.unilim.fr/theses/nxfile/default/651a0add-36e1-46f6-be81-a4de678c99e3/blobholder:0/P20133315.pdf
- 5. Trouillet J-L. Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. Sociète Fr Anesth Réanimation. 2009;
- 6. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-Associated Pneumonia: The Clinical Pulmonary Infection Score as a Surrogate for Diagnostics and Outcome. Clin Infect Dis. 2010 Aug;51(S1):S131–5.
- 7. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens J, Lew P, Suter P. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "'blind'" bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis. 1991;
- 8. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Feb 15;171(4):388–416.
- Klompas M. Does this patient have ventilator-associated pneumonia? Jama 2007;297(14):1583–93.
- 10. Fagon J. Diagnostic des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. Réanimation. 2006 Feb;15(1):36–42.
- 11. Société Française de Microbiologie. Rémic. 2015.
- 12. Stratégie de réduction de l'utilisation des antibiotiques en réanimation (adulte et pédiatrique). 2014.
- 13. Di Pasquale M, Ferrer M, Esperatti M, Crisafulli E, Giunta V, Li Bassi G, et al. Assessment of Severity of ICU-Acquired Pneumonia and Association With Etiology: Crit Care Med. 2014 Feb;42(2):303–12.
- 14. Behnia M, Logan SC, Fallen L, Catalano P. Nosocomial and ventilator-associated pneumonia in a community hospital intensive care unit: a retrospective review and analysis. BMC Res Notes. 2014;7(1):232.
- 15. Charles MP. Ventilator-associated pneumonia. Australas Med J. 2014 Aug 31;334–44.
- 16. Charles MP. Aetiological agents of ventilator-associated pneumonia and its resistance. Australas Med J. 2013 Oct 1;6(9):430–4.
- 17. Vincent J, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin C, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. JAMA. 2009;

- 18. Depuydt PO, Vandijck DM, Bekaert MA, Decruyenaere JM, Blot SI, Vogelaers DP, et al. Determinants and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated-pneumonia. Crit Care. 2008;12(6):R142.
- 19. Venier A-G, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, et al. Risk factors for Pseudomonas aeruginosa acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. J Hosp Infect. 2014 Oct;88(2):103–8.
- Cobos-Trigueros N, Solé M, Castro P, Torres JL, Hernández C, Rinaudo M, et al. Acquisition of Pseudomonas aeruginosa and its resistance phenotypes in critically ill medical patients: role of colonization pressure and antibiotic exposure. Crit Care [Internet]. 2015 Dec [cited 2015 Oct 7];19(1). Available from: http://ccforum.com/content/19/1/218
- 21. Boyer A, Doussau A, Thiébault R, Venier AG, Tran V, Boulestreau H, et al. Pseudomonas aeruginosa acquisition on an intensive care unit: relationship between antibiotic selective pressure and patients' environment. Crit Care. 2011;15(1):R55.
- 22. Martinez J, Delgado E, Marti S, Marco F, Vila J, Mensa J, et al. Influence of antipseudomonal agents on Pseudomonas aeruginosa colonization and acquisition of resistance in critically ill medical patients. Intensive Care Med. 2009 Mar;
- 23. Nseir S, Blazejewski C, Lubret R, Wallet F, Courcol R, Durocher A. Risk of acquiring multidrugresistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. Clin Microbiol Infect. 2011 Aug;17(8):1201–8.
- 24. Lucena A, Dalla Costa LM, Nogueira KS, Matos AP, Gales AC, Paganini MC, et al. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. J Hosp Infect. 2014 Aug;87(4):234–40.
- 25. Nakamura A, Miyake K, Misawa S, Kuno Y, Horii T, Kondo S, et al. Meropenem as predictive risk factor for isolation of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. J Hosp Infect. 2013 Feb;83(2):153–5.
- 26. Montero M, Sala M, Riu M, Belvis F, Salvado M, Grau S, et al. Risk factors for multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa acquisition. Impact of antibiotic use in a double case—control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Mar;29(3):335–9.
- 27. Fourrier F. Caractéristiques actuelles des patients admis en Réanimation en France. Société Française d'Anesthésie Réanimation; 2011.
- 28. Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, Haloui N, Attarassi B. FACTEURS DE VIRULENCE ET EPIDEMIOLOGIE LIES AU PSEUDOMONAS AERUGINOSA VIRULENCE FACTORS AND EPIDEMIOLOGY RELATED TO PSEUDOMONAS AERUGINOSA. Rev Tunis D'Infectiologie-Oct. 2009;2:7–14.
- 29. Xu B, Wozniak DJ. Development of a Novel Method for Analyzing Pseudomonas aeruginosa Twitching Motility and Its Application to Define the AmrZ Regulon. Kaufmann GF, editor. PLOS ONE. 2015 Aug 26;10(8):e0136426.
- 30. Smith RS, Iglewski BH. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target. J Clin Invest. 2003 Nov 15;112(10):1460–5.
- 31. Van 't Wout EFA, van Schadewijk A, van Boxtel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, et al. Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Induce Both the Unfolded Protein and

- Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells. Parsek MR, editor. PLOS Pathog. 2015 Jun 17;11(6):e1004946.
- 32. Shrestha M, Xiao Y, Robinson H, Schubot FD. Structural Analysis of the Regulatory Domain of ExsA, a Key Transcriptional Regulator of the Type Three Secretion System in Pseudomonas aeruginosa. Korolev S, editor. PLOS ONE. 2015 Aug 28;10(8):e0136533.
- 33. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, et al. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas aeruginosa bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. J Infect Dis. 2003;188(4):512–8.
- 34. Grishin AV, Krivozubov MS, Karyagina AS, Gintsburg AL. Pseudomonas Aeruginosa Lectins As Targets for Novel Antibacterials. Acta Naturae. 2015;7(2):29.
- 35. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plesiat P. Resistance and Virulence of Pseudomonas aeruginosa Clinical Strains Overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jul 1;52(7):2455–62.
- 36. Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 1998;180(20):5443–7.
- 37. Linares JF, Lopez JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martinez JL. Overexpression of the Multidrug Efflux Pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN Is Associated with a Reduction of Type III Secretion in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 2005 Feb 15;187(4):1384–91.
- 38. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. Pseudomonas aeruginosa May Accumulate Drug Resistance Mechanisms without Losing Its Ability To Cause Bloodstream Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Oct 1;51(10):3531–6.
- 39. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jun 1;48(6):2043–8.
- 40. Rodriguez-Martinez J-M, Poirel L, Nordmann P. Extended-Spectrum Cephalosporinases in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2009 May 1;53(5):1766–71.
- 41. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JIA, Givskov M, Hoiby N. Constitutive High Expression of Chromosomal -Lactamase in Pseudomonas aeruginosa Caused by a New Insertion Sequence (IS1669) Located in ampD. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Nov 1;46(11):3406–11.
- 42. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 2002;34(5):634–40.
- 43. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible Pseudomonas aeruginosa collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother. 2014 Jul 1;69(7):1804–14.
- 44. Fournier D, Richardot C, Muller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plesiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2013 Aug 1;68(8):1772–80.

- 45. Courvalin P, Leclerq R. Beta-lactamines et Pseudomonas aeruginosa. In: Antibiogramme troisième édition. ESKA.
- 46. Hocquet D, Plesiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X, et al. Nationwide Investigation of Extended-Spectrum -Lactamases, Metallo- -Lactamases, and Extended-Spectrum Oxacillinases Produced by Ceftazidime-Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains in France. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug 1;54(8):3512–5.
- 47. Cholley P, Hocquet D, Alauzet C, Cravoisy-Popovic A, Talon D, Aissa N, et al. Hospital outbreak of Pseudomonas aeruginosa producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. J Med Microbiol. 2010 Jul 1;59(7):866–9.
- 48. Mugnier P, Podglajen I, Goldstein FW, Collatz E. Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel, integron-encoded β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology. 1998;144(4):1021–31.
- 49. Hocquet D, Dehecq B, Bertrand X, Plésiat P. Strain-Tailored Double-Disk Synergy Test Detects Extended-Spectrum Oxacillinases in Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. 2011 Jun;49(6):2262–5.
- 50. Aubert D, Girlich D, Naas T, Nagarajan S, Nordmann P. Functional and Structural Characterization of the Genetic Environment of an Extended-Spectrum -Lactamase blaVEB Gene from a Pseudomonas aeruginosa Isolate Obtained in India. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Sep 1;48(9):3284–90.
- 51. on behalf of the ONERBA, Slekovec C, Robert J, Trystram D, Delarbre JM, Merens A, et al. Pseudomonas aeruginosa in French hospitals between 2001 and 2011: back to susceptibility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Oct;33(10):1713–7.
- 52. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, Mille A, Gomez A-S, Plésiat P. A Convenient Method To Screen for Carbapenemase-Producing Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. 2013 Nov;51(11):3846–8.
- 53. Kali A. Detection of metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in intensive care units. Australas Med J. 2013 Dec 31;6(12):686–93.
- 54. Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(1):52–7.
- 55. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(12):3322–7.
- 56. Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo J-D, Plesiat P. MexAB-OprM- and MexXY-Overproducing Mutants Are Very Prevalent among Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa with Reduced Susceptibility to Ticarcillin. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Apr 1;51(4):1582–3.
- 57. Muller C, Plesiat P, Jeannot K. A Two-Component Regulatory System Interconnects Resistance to Polymyxins, Aminoglycosides, Fluoroquinolones, and -Lactams in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar 1;55(3):1211–21.
- 58. Hocquet D, Muller A, Blanc K, Plesiat P, Talon D, Monnet DL, et al. Relationship between Antibiotic Use and Incidence of MexXY-OprM Overproducers among Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Mar 1;52(3):1173–5.

- 59. Montero M, Sala M, Riu M, Belvis F, Salvado M, Grau S, et al. Risk factors for multidrugresistant Pseudomonas aeruginosa acquisition. Impact of antibiotic use in a double case control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Mar;29(3):335–9.
- 60. Llanes C, Kohler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plesiat P. Role of the MexEF-OprN Efflux System in Low-Level Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Dec 1;55(12):5676–84.
- 61. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plesiat P. Resistance and Virulence of Pseudomonas aeruginosa Clinical Strains Overproducing the MexCD-OprJ Efflux Pump. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jul 1;52(7):2455–62.
- 62. Courvalin P, Leclerq R. Aminosides et Bactérie à Gram négatifs. In: Antibiogramme troisième édition. ESKA.
- 63. Poole K. Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Feb 1;49(2):479–87.
- 64. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase RmtD and Metallo--Lactamase SPM-1 in a Panresistant Pseudomonas aeruginosa Isolate from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Mar 1;51(3):852–6.
- 65. El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plesiat P. Cumulative Effects of Several Nonenzymatic Mechanisms on the Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Mar 1;51(3):1016–21.
- 66. Bryan LE, O'hara K, Wong S. Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 1984;26(2):250–5.
- 67. Courvalin P, Leclerq R. Quinolones et bactéries à Gram négatif. In: Antibiogramme troisième édition. ESKA.
- 68. Rella M, Haas D. Resistance of Pseudomonas aeruginosa PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. Antimicrob Agents Chemother. 1982;
- 69. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa Isolated in 1998 and 1999: Role of Target Enzyme in Mechanism of Fluoroquinolone Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Aug 1;45(8):2263–8.
- 70. Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, et al. Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. Infect Chemother. 2015;47(2):98.
- 71. Belotti P, Thabet L, Laffarque A, André C, Coulange-Mayonnove L, Arpin C, et al. Description of an original integron encompassing blaVIM-2, qnrVC1 and genes encoding bacterial group II intron proteins in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother. 2015 May 14;70.
- 72. Yang X, Xing B, Liang C, Ye Z, Zhang Y. Prevalence and fluoroquinolone resistance of pseudomonas aeruginosa in a hospital of South China. Int J Clin Exp Med. 2015;8(1):1386.
- 73. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de micobiologie. Recommandations 2014. 2014.

- 74. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte. Réseau REA-Raisin Fr. 2013;
- 75. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, Dehecq B, Plésiat P, Talon D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant Pseudomonas aeruginosa in a French university hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Oct;28(10):1217–22.
- 76. B. Rojo-Bezares, Cavalié L, Dubois D, Oswald E, Torres C, Saenz Y. Characterisation of carbapenem resistance mechanism and intergrons in Peudomonas aeruginosa strains from blood samples in French hospital. J Med Microbiol. 2016 fevrier;
- 77. Riera E, Cabot G, Mulet X, Garcia-Castillo M, del Campo R, Juan C, et al. Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. J Antimicrob Chemother. 2011 Sep 1;66(9):2022–7.
- 78. Rodriguez-Martinez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov 1;53(11):4783–8.
- 79. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistat Gram-Negative Bacilli. Antibicrobial Agents Chemother. 2008 Mar;

ANNEXES

Annexe I: Avis du comité d'éthique de la recherche des Hôpitaux de Toulouse



COMITE D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE

Toulouse,

Le 15 Décembre 2014

A l'attention de

Monsieur le Docteur Bernard GEORGES

Madame Stephanie DRUGE

Madame le Docteur Marion GRARE

Monsieur le Docteur Pierre COUGOT

Monsieur le Docteur Thierry SEGUIN

Madame le Docteur Laure CROGNIER

Madame le Docteur Stéphanie RUIZ

Monsieur le Docteur Antoine ROUGET

Lors de la séance du Jeudi 27 Novembre 2014, le comité d'éthique de la recherche des Hôpitaux de Toulouse a examiné le projet (n° 85-1114) intitulé «Evaluation du risque d'émergence de résistances de Pseudomonas aeruginosa à différents antibiotiques antipyocyaniques en réanimation.» que vous lui avez soumis en tant qu'investigateurs.

Etaient présents: Dr JM CONIL - Pr P. PAYOUX - Dr ME LLAU - Mme D ARAVIT - Mme MC VALLEJO.

Après examen du dossier, le comité émet un avis favorable à la mise en œuvre de cette recherche. Je vous prie d'agréer Madame, Monsieur, l'assurance de ma considération distinguée.



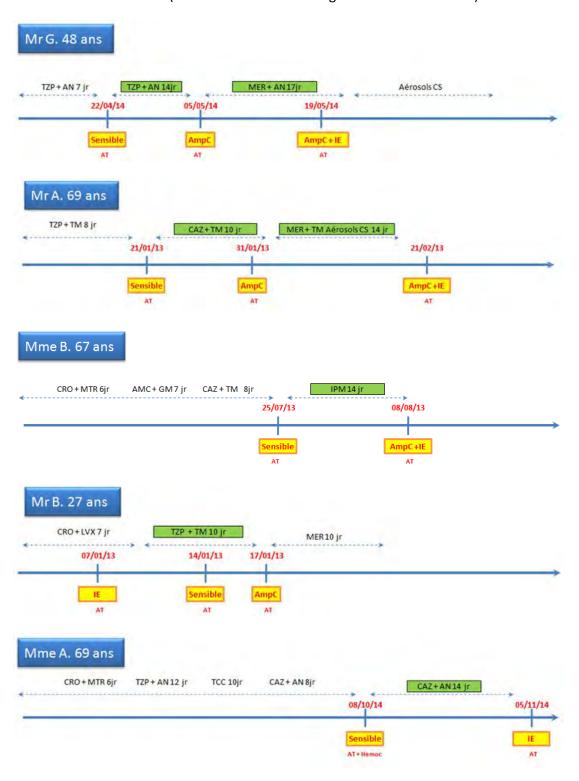
Dr Jean-Marie CONIL

Président du Comité d'Ethique de la Rocherche des Hépitaux de Toulouie. PH - Survice de Péantination - Hépital de Ronguell Département d'Anasthèse et de Péantination - CHITOulium

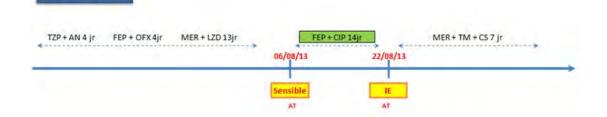
05 61 32 24 h5 cm 05 61 32 27 99

65 cmil. jm@dru-stratouw.ft

Annexe II : Axes chronologiques de l'évolution des souches en fonction des antibiotiques administrés (seuls les traitements surlignés ont été considérés).



Mr C. 59 ans TZP+AN14 jr CS+ CIP14 jr 13/01/13 02/02/13 Sensible IE AT Mr H. 56 ans CS + Aérosols CS + CIP 17jr MER+SXT AMC5jr 13/12/13 02/12/13 Sensible IE Mr F. 54 ans MER+AN3 jr TZP 21 jr CAZ14 jr 15/10/13 18/10/13 JE Sensible AT Expecto Mr F. 49 ans Aérosols CS + Aérosols TM MER 21 jr TZP+AN 10 jr 01/12/14 12/12/14 AmpC+IE

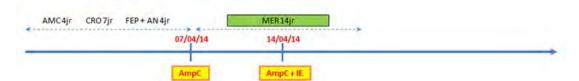


Mr L. 40 ans

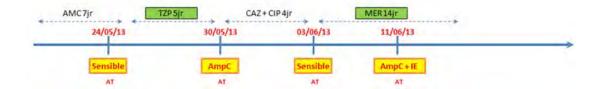
Mr L. 60 ans



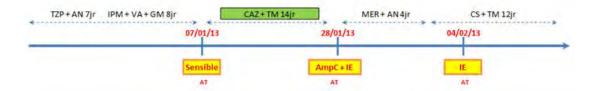
Mme L. 84 ans



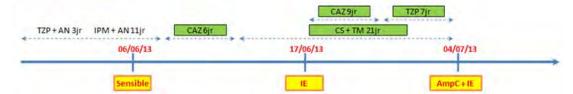
Mr M. 85 ans



Mr M. 65 ans

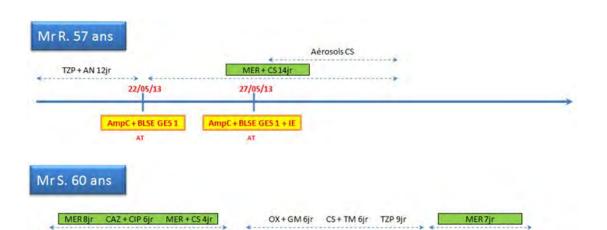


Mme O.49 ans



Mme P. 34 ans





23/09/13

Sensible

AT

04/10/13

AT

05/09/13



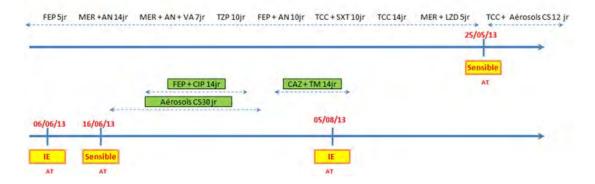
25/07/13

Sensible

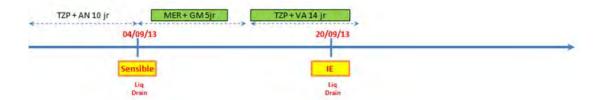
AT

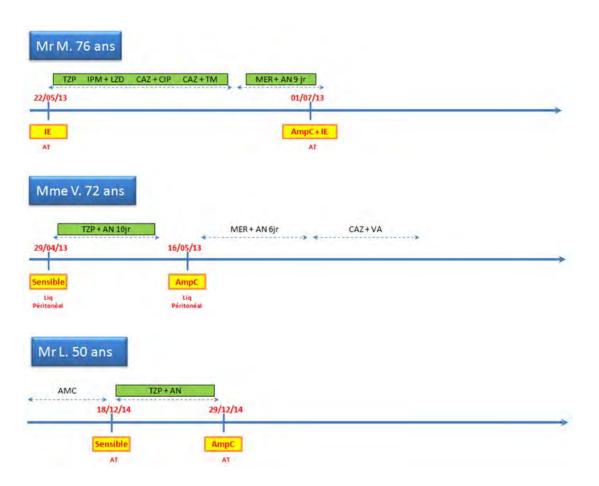


MrT. 70 ans

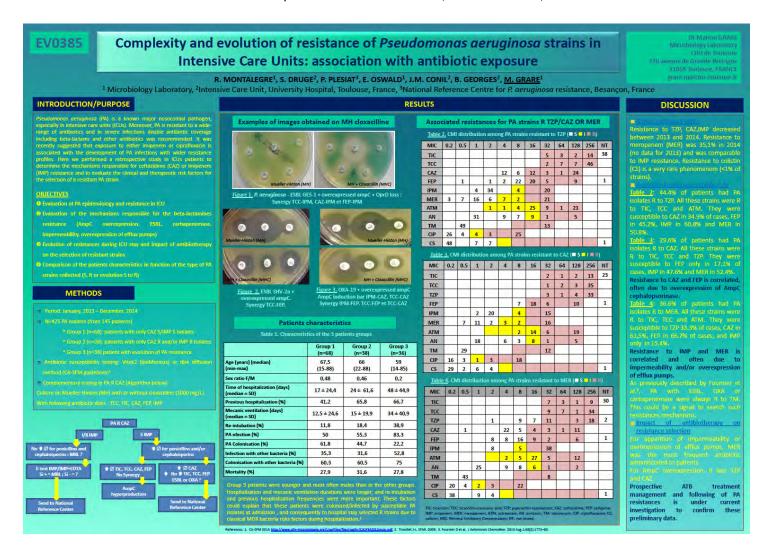


Mr V. 72 ans





Annexe III : Poster présenté lors de l'ECCMID, 9-12 avril 2016, Amsterdam.



Evaluation of the risk of emergence of *P. aeruginosa* resistant to antibiotics in Reanimation Unit.

RESUME

The study aimed to assess the resistance mechanisms of P. aeruginosa to ceftazidime and carbapenems as well as identifying the antibiotic therapy associated with these acquired resistance mechanisms. The study included 142 patients of Reanimation Unit (Rangueil, CHU Toulouse, France) over 2 years. For every patient, the antibiotic therapy, resistance mechanism and its evolution (if any) were recorded. Exposition ceftazidime/piperacilline-tazobactam (which leads to AmpC-mutant selection) or to meropenem (efflux selection) seems to be a predictive risk factor to B-lactaminesresistant P. aeruginosa mutants. The number and duration of both hospitalization and mechanical ventilation, and the re-intubation frequency were also highlighted as other risk factors of resistant strains selection.

Evaluation du risque d'émergence de résistances de P. aeruginosa à différents antibiotiques antipyocyaniques en Réanimation

Discipline administrative : Biologie médicale

Présente et soutenu publiquement par : MONTALEGRE Romain

le 12/05/2016 à Toulouse

Directeur de thèse : GRARE Marion, MCU-PH Bactériologie

Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse, Place du Dr Baylac 31059 Toulouse Cedex 9

2016 TOU3 1702

RÉSUMÉ

Les objectifs étaient : d'évaluer les mécanismes de résistance de P. aeruginosa à la ceftazidime et aux carbapénèmes, et de dégager les traitements anti-infectieux reçus favorisant l'acquisition de ces mécanismes. Durant 2 ans dans le service de Réanimation de Rangueil (CHU Toulouse), pour chaque patient ont été relevés les mécanismes de résistance, leur évolution durant l'hospitalisation et les traitements anti-infectieux reçus. L'exposition la ceftazidime/pipéracilline-tazobactam (sélection AmpC) ou au méropénème (sélection efflux) semble être un facteur de risque prédictif de sélection d'une souche de P. aeruginosa résistante aux bêta-lactamines. La durée d'hospitalisation et de ventilation mécanique ainsi que la fréquence de ré-intubation et le nombre d'hospitalisations antérieures sont aussi des facteurs de risques.

Mots-Clés: P. aeruginosa - résistance - Ceftazidime - Imipénème - Méropénème - Réanimation -Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique.