



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1
2008

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDE SPECIALISEE DE
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 17 octobre 2008

Par Alexandre RIVIER

Né le 10 octobre 1978

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

Intérêt d'un milieu chromogène pour la détection des variants à petites colonies de *Staphylococcus aureus*. Epidémiologie bactérienne des patients atteints de mucoviscidose suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Nancy en 1997 et en 2007.

Membres du Jury

Présidente : Mme Janine SCHWARTZBROD, Professeur, faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M. Alain LOZNIEWSKI, PU-PH, Faculté de Médecine, Nancy (directeur de thèse)
M. Christian RABAUD, PU-PH, Faculté de médecine, Nancy
Mme Jocelyne DERELLE, PH, Pneumologie infantile, CHU, Nancy
M. Tahar HADOU, PA, Laboratoire de Bactériologie, CHU, Nancy

Membres du personnel enseignant 2007/2008

Doyen
Chantal FINANCE

Vice Doyen
Francine PAULUS

1.1. Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

1.1. Directeur des Etudes

Gérald CATAU

1.1. Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

1.1. Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

1.1. Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

1.1. PROFESSEURS HONORAIRES

Mme BESSON Suzanne
Mme GIRARD Thérèse
M. JACQUE Michel
M. LECTARD Pierre
M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand
M. MIRJOLET Marcel
M. MORTIER François
M. PIERFITTE Maurice
M. SCHWARTZBROD Louis

1.1. PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger
M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

1.1. PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
M.	BLOCK Jean-Claude	Santé publique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Virologie, immunologie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique, audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie-Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	JOUZEAU Jean-Yves	Bioanalyse du médicament
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, maintien à domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
Mme	LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme	LAURAIN-MATTAR Dominique	Pharmacognosie
M.	LEROY Pierre	Chimie physique générale
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MERLIN Jean-Louis	Biologie cellulaire oncologique
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean-Bernard	Chimie thérapeutique
M.	RIHN Bertrand	Biochimie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SIMON Jean-Michel	Economie de la santé, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

1.1. MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	BOURRA Cédric	Physiologie
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, organisation animale
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	Florence DUMARCAZ	Chimie thérapeutique
M.	François DUPUIS	Pharmacologie
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mlle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mlle	LAMBERT Alexandrine	Informatique, biostatistiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mlle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
M.	MEHRI-SOUSSI Faten	Hématologie biologique
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAPIN Anne	Pharmacie galénique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mlle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

1.1. PROFESSEUR ASSOCIE

Mme MAHEUT-BOSSER Anne Sémiologie

1.1. PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe Anglais

1.1. ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements :

Aux membres du jury

Je tiens à vous témoigner ma gratitude et mes sincères remerciements, vous me faites un immense honneur en acceptant de participer à l'évaluation de ce mémoire de DES de Biologie Médicale.

A M^{me} Janine SCHWARTZBROD, Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy.

Je vous prie d'accepter toute ma reconnaissance pour me faire l'honneur de présider ce jury.

A M. Alain LOZNIEWSKI, PU-PH, Laboratoire de Bactériologie, CHU, Nancy.

Recevez mes sincères remerciements pour m'avoir confié ce sujet, pour m'avoir aidé à valoriser mon travail et pour votre confiance.

A M. Christian RABAUD, PU-PH, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU, Nancy.

Je vous remercie pour votre présence dans ce jury et d'accepter de juger ce travail.

A M^{me} Jocelyne DERELLE, PH, Service de pneumologie infantile, CHU, Nancy.

Je tiens à vous remercier chaleureusement pour avoir accepté de juger ce travail, pour avoir su me communiquer avec enthousiasme votre expérience clinique et thérapeutique et pour m'avoir ouvert les portes du CRCM.

A M. Tahar HADOU, PA, Laboratoire de Bactériologie, CHU, Nancy.

Le premier mot qui me vient est MERCI mais il n'exprime pas tout ce que je te dois: ma formation, ta disponibilité, ta bonne humeur, ta passion pour la bactériologie, ton expérience, tes encouragements et pour m'avoir aidé à la rédaction et à la valorisation de mon travail. Sans toi, je n'aurai pu aller jusqu'au bout de ce travail. C'est avec grand plaisir que je te vois siéger dans mon jury aujourd'hui.

A tous ceux qui ont participé à ce travail

A M^{me} Sylvie MONTCOUQUIOL-KAMDEM SIMO, PH et médecin référent du CRCM-Adultes, Service de Pneumologie, CHU, Nancy.

Je tiens à vous remercier pour m'avoir accueilli, pour m'avoir apporté votre expérience clinique et thérapeutique et pour vos critiques.

A M^{me} Brigitte RECROIX, coordinatrice du CRCM-Enfants, CHU, Nancy.

Je vous remercie pour votre disponibilité et pour m'avoir ouvert vos portes.

A M^{me} Vanessa SCHLEMER, coordinatrice du CRCM-Adultes, CHU, Nancy.

Soyez sincèrement remercier pour votre aide et votre accueil.

A Marie MACHOUARD, MCU-PH, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU, Nancy.

Je te remercie pour m'avoir permis de changer de sujet de thèse et pour tes encouragements. Je suis heureux de notre future collaboration.

A Christine LION, Francine MORY, Marie-christine CONROY, Nejla AISSA, Corentine ALAUZET, Laboratoire de Bactériologie, CHU, Nancy.

Merci d'avoir participé à ma formation.

A toutes les techniciennes de la pièce de Brabois, Laboratoire de Bactériologie, CHU, Nancy.

Merci pour l'aide que vous m'avez apporté pour ce travail et pour votre expérience.

A M. Philippe Cailloux et les techniciens du laboratoire de la clinique de traumatologie et d'orthopédie.

Merci de votre soutien et de m'avoir fait partagé votre expérience.

A tous ceux qui ont marqué mon chemin...

A mes parents,

Merci d'avoir toujours soutenu mes choix et de vos encouragements. La route fut longue, pleine d'obstacles et d'abnégation mais je vous rassure, c'est maintenant terminé (enfin, peut être... ?) ! Merci de votre présence.

A ma sœur, Emilie,

Rester debout malgré les obstacles, les déceptions... Nous avons toujours cherché à se construire, à trouver ce fameux équilibre qui nous a tant manqué. Sache que je te dédie en partie ce travail et que je serais toujours là pour toi quoiqu'il advienne.

A toute ma famille : Mamie que j'aime tant, Michèle, Jean Luc, Maxime, Clotilde, Gaétan, Bernard, Sybille.... Et ceux qui ne sont plus mais qui comptent toujours beaucoup.

Merci tout simplement.

A Laetitia,

Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir supporté ces derniers mois et même jours, pour ton soutien, pour ton aide, pour ton enthousiasme et pour ton amour. Grâce à toi, tu m'as donné la confiance qui me manquait, l'envie de construire un avenir...avec toi. Je te dédie ce travail, qu'il témoigne de l'amour que je te porte !

A Sarah et Fabien,

Je vous remercie pour m'avoir supporté durant cette période et pour m'avoir libérer du temps. A charge de revanche.

A la WASA, à mes co-internes, ...Merci pour tout.

Sommaire

Tables des figures et des tableaux	1
INTRODUCTION	3
A. MUCOVISCIDOSE : pathogénie, aspect bactériologique et antibiothérapie	4
1. Mucoviscidose : généralités	4
1.1. Définition	4
1.2. Génétique	4
1.3. Epidémiologie	9
1.4. Diagnostic de mucoviscidose	10
2. Interactions bactéries – tractus respiratoire de l'hôte mucoviscidosique	14
2.1. Conditions liées à l'hôte	14
2.1.1. Facteurs mécaniques : impact du gène <i>CFTR</i> sur la physiologie des voies aériennes et la clairance muco- ciliaire	14

2.1.2.	Immunité des patients atteints de mucoviscidose	17
2.2.	Conditions liées aux bactéries	17
2.2.1.	Adhérence anormale des bactéries aux cellules épithéliales	18
2.2.2.	Adaptation bactérienne à l'environnement des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose	19
2.3.	Phénomène inflammatoire	21
3.	Principales bactéries impliquées dans la mucoviscidose	23
3.1.	<i>Haemophilus influenzae</i>	23
3.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.2.1.	Généralités	24
3.2.2.	Variants à petites colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.2.2.1.	Caractères auxotropes	25
a)	Mutants respiratoires	26
b)	Mutants métaboliques	27
c)	Prévalence des souches auxotropes chez les patients mucoviscidosiques	27

3.2.2.2.	Adhérence aux cellules épithéliales et pouvoir invasif	28
3.2.2.3.	Diminution de l'expression des facteurs de virulence et survie intracellulaire	30
3.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
3.4.	Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	36
3.5.	Autres bacilles à Gram négatif non fermentants	42
3.5.1.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	40
3.5.2.	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	41
3.5.3.	Autres bacilles à Gram négatifs non fermentants	42
3.6.	Mycobactéries non tuberculeuses	43
3.7.	Bactéries anaérobies	44
4.	Analyse bactériologique des prélèvements respiratoires	45
4.1.	Prélèvements	45
4.2.	Examens bactériologiques	46
4.2.1.	Examen direct et mise en culture	47

4.2.2. Identification bactérienne	48
4.2.2.1. <i>Haemophilus influenzae</i>	49
4.2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	51
a) Souches de <i>S. aureus</i> de phénotype normal	51
b) Variants à petites colonies de <i>S. aureus</i>	52
4.2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
4.2.2.4. Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	56
4.2.2.5. Autres bacilles à Gram négatif non fermentants	57
4.2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	57
4.2.4. Difficultés et limites du diagnostic bactériologique	58
4.2.4.1. Liées aux prélèvements respiratoires	58
4.2.4.2. Liées à l'identification	59
4.2.4.3. Liées à l'antibiogramme	60
5. Antibiothérapie	61
5.1. Particularités pharmacocinétiques des patients atteints de la mucoviscidose	61

5.2.	Traitement des principales bactéries impliquées dans la mucoviscidose	62
5.2.1.	<i>Haemophilus influenzae</i>	62
5.2.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	62
5.2.2.1.	Antibioprophylaxie primaire	62
5.2.2.2.	Traitement des exacerbations	62
5.2.2.3.	Antibioprophylaxie secondaire	63
5.2.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
5.2.4.	Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	65
5.2.5.	Autres bactéries	67
B.	EVALUATION D'UN MILIEU CHROMOGENE POUR LA DETECTION DES SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SMALL COLONY VARIANT	69
1.	Matériels et méthodes	70
1.1.	Prélèvements respiratoires	70
1.2.	Analyse des prélèvements respiratoires	71

1.3.	Identification des variants à petites colonies de <i>S. aureus</i>	71
1.4.	Etude de la sensibilité aux antibiotiques	71
2.	Résultats	72
C. ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE RETROSPECTIVE DES RESULTATS BACTERIOLOGIQUES EN 1997 ET EN 2007 75		
1.	Méthodes	75
2.	Résultats	76
2.1.	Patients	76
2.2.	Prélèvements respiratoires	76
2.3.	Prévalences des principales espèces bactériennes isolées	77
2.4.	Sensibilité aux antibiotiques	79
2.4.1.	<i>S. aureus</i>	79
2.4.2.	<i>P. aeruginosa</i>	80

2.5. « Primo-détection »	81
D.DISCUSSION	82
CONCLUSION	86
BIBLIOGRAPHIE	87

Liste des abréviations :

AB : Aspiration Bronchique

ABC : ATP Binding Casette

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGR : Accessory Gene Regulator

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ARNm : Acide ribonucléique messager

AsioloGM-1 : récepteur asialoganglioside-1

ANP : Aspiration Naso-Pharyngée

ASL : Airway Surface Liquid

ATP : Adénosine Triphosphate

AX : *Achromobacter xylosoxidans*

Bcc : Complexe *Burkholderia cepacia*

BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Etendue

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

CFT-1 : Cystic Fibrosis Tracheal cell -1

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

UFC : Unité Formant des Colonies

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNAMTS : Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés

CRCM : Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose

EOP : Ecouillon Oro-pharyngé

ECBE : Examen Cytobactérien des Expectorations

ENaC : Epithelial Sodium Channel

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FliD : Flagellar Cap Protein D

FnBP : Fibronectin-Binding Protein

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

HI : *Haemophilus influenzae*

HQNO : 4-hydroxy-2-Heptylquinoline-N-Oxyde

IAM-1 : Intracellular Adhesion Molecule-1

IL : *Inquilinus limosus*

IL-6 : Interleukine-6

IL-8: Interleukine-8

IL-1 β : Interleukine- 1 β

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LCFSN : Complemented Cell Line

LPS : Lipopolysaccharide

MA : *Mycobacterium abscessus*

MAC : *Mycobacterium avium intracellular*

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses

MSCRAMM : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

NaCl : Chlorure de Sodium

NAD : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide

NBD: Nucleotide Binding Domaines

NF- κ B : Facteur Nucléaire kappa B

NO : Monoxyde d'Azote

ORCC : Outwardly rectifying Cl $^-$ Channel

PAI : Peptide Auto-Inductible

pO₂ : Pression partielle en oxygène

PNN : Polynucléaire neutrophile

R : Domaine Régulateur

ROMK : Renal Outer Medullary K⁺ Channel

SA : *Staphylococcus aureus*

SAMR : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méticilline

SAMS : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méticilline

SarA : Staphylococcal Accessory Regulator A

PA SCV : *Pseudomonas aeruginosa* Small Colony Variants

SA SCV : *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants

SM : *Stenotrophomonas maltophilia*

TIR : Trypsine immunoréactive

TM : Région Transmembranaire Hydrophobe

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

TS : Test à la Sueur

Table des figures et des tableaux :

<u>Figure 1</u> : Structure du gène et de la protéine CFTR.	5
<u>Figure 2</u> : Fonctionnement du canal CFTR.	6
<u>Figure 3</u> : Classification des mutations du gène <i>CFTR</i> .	8
<u>Figure 4</u> : Prévalence de la mucoviscidose par département en 2004.	10
<u>Figure 5</u> : Structure du liquide de surface des voies aériennes.	15
<u>Figure 6</u> : Propriétés du liquide de surface des voies aériennes chez le sujet sain et chez le patient atteint de mucoviscidose.	16
<u>Figure 7</u> : Impact des mutants <i>CFTR</i> sur la physiologie de la cellule épithéliale.	18
<u>Figure 8</u> : Effets de l'élastase neutrophile sur les mécanismes de défense de l'hôte et sur l'inflammation.	22
<u>Figure 9</u> : Examen direct d'une expectoration.	47
<u>Figure 10</u> : Aspect des colonies d' <i>Haemophilus influenzae</i> non capsulée sur la gélose Haemophilus [®] .	49
<u>Figure 11</u> : Aspect de satellitisme autour du disque X + V de <i>H. influenzae</i> .	50
<u>Figure 12</u> : Aspect des staphylocoques à coagulase négative et de <i>S. aureus</i> sur un milieu Chapman [®] .	51
<u>Figure 13</u> : Aspect des colonies de SA SCV et de <i>S. aureus</i> de phénotype normal sur gélose Columbia [®] .	53
<u>Figure 14</u> : Aspect des colonies mucoïdes de <i>P. aeruginosa</i> sur le milieu Cétrimide [®] .	54
<u>Figure 15</u> : Aspect des colonies de <i>B. cepacia</i> sur la gélose cepacia [®] .	56
<u>Figure 16</u> : Exemple d'un examen direct (coloration de Gram).	58

<u>Graphique 1</u> : Prévalence de la mucoviscidose par sexe et par classe d'âge en 2004.	9
<u>Tableau 1</u> : Symptômes respiratoires évocateurs de la mucoviscidose.	12
<u>Tableau 2</u> : Prévalence des souches de SA SCV.	28
<u>Tableau 3</u> : Incidence des patients mucoviscidosiques colonisés ou infectés par <i>P. aeruginosa</i> .	33
<u>Tableau 4</u> : Prévalence des patients mucoviscidosiques colonisés ou infectés par <i>P. aeruginosa</i> .	33
<u>Tableau 5</u> : Définition des différents stades de colonisation/infection par <i>P. aeruginosa</i> .	36
<u>Tableau 6</u> : Données épidémiologiques françaises du complexe <i>B. cepacia</i> .	38
<u>Tableau 7</u> : Milieux d'ensemencement recommandés pour la détection et l'isolement des principales espèces bactériennes isolées chez les patients mucoviscidosiques.	48
<u>Tableau 8</u> : Caractéristiques des cinq patients colonisés par SA SCV.	72
<u>Tableau 9</u> : Caractéristiques de souches SA SCV isolées chez les cinq patients.	74
<u>Tableau 10</u> : Caractéristiques des patients mucoviscidosiques en 1997 et en 2007.	76
<u>Tableau 11</u> : Prélèvements respiratoires réalisés en 1997 et en 2007.	76
<u>Tableau 12</u> : Répartition des souches bactériennes isolées en 1997 et en 2007.	77
<u>Tableau 13</u> : Prévalence des principales espèces bactériennes en 1997 et en 2007.	78
<u>Tableau 14</u> : Sensibilité des souches de <i>S. aureus</i> aux principales familles d'antibiotiques en 1997 et en 2007.	80
<u>Tableau 15</u> : Sensibilité des souches de <i>P. aeruginosa</i> aux principales familles d'antibiotiques en 1997 et en 2007.	81

INTRODUCTION

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est une maladie complexe requérant une prise en charge du patient dans sa globalité. La surinfection broncho-pulmonaire représente le problème majeur auquel sont confrontés les malades atteints de mucoviscidose. Elle est pratiquement constante au cours de la mucoviscidose et est caractérisée par des exacerbations aiguës intercurrentes ayant pour conséquence une détérioration des fonctions respiratoires. Cette surinfection est très particulière puisque deux espèces bactériennes dominent tour à tour la scène clinique : tout d'abord *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) puis, et surtout, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), responsable en grande partie de l'aggravation de l'affection. Cependant, d'autres espèces bactériennes sont retrouvées avec une fréquence et une implication clinique variable.

Dans une première partie, nous rappellerons quels sont les éléments physiopathologiques de la maladie et les principales bactéries impliquées dans la mucoviscidose ainsi que leurs traitements antibiotiques.

Les variants à petites colonies de *S. aureus* sont impliquées dans la persistance des infections dues à ce micro-organisme. Depuis 2007, l'utilisation d'un milieu sélectif et spécifique est recommandée pour la recherche de ces variants. Ceci m'a conduit, dans un premier temps, à évaluer les performances d'une gélose chromogène, spécifique de *S. aureus* (ChromID™ *S. aureus*) pour la détection et l'isolement des variants à petites colonies de *S. aureus*.

Puis, j'ai étudié l'épidémiologie des bactéries isolées chez les patients suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de Nancy. Le but de ce travail était de comparer la prévalence de la colonisation par les différentes espèces bactériennes du tractus pulmonaire chez les patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Nancy en 1997 et 2007. La résistance aux antibiotiques de *S. aureus* et *P. aeruginosa*, qui sont, parmi les principales espèces isolées, celles pour lesquelles une antibiothérapie codifiée a été définie, a également été étudiée en 1997 et 2007.

A. MUCOVISCIDOSE : pathogénie, aspect bactériologique et antibiothérapie

1. Mucoviscidose : généralités

1.1 Définition

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est une maladie génétique à transmission autosomique récessive. Il s'agit de la maladie la plus fréquente dans la population caucasienne, engendrant une diminution de l'espérance de vie. La première description date de 1936 mais déjà au Moyen Age, des cas de mort prématurée d'enfants dont les mères avaient remarqué le « baiser salé » ont été rapportés.

La mucoviscidose résulte du dysfonctionnement du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), responsable d'anomalies des échanges ioniques transmembranaires (ions sodium et chlorure). Ceci est à l'origine d'une modification de la concentration saline de la sueur et de l'apparition de diverses altérations tissulaires expliquant la survenue de maladie pulmonaire et pancréatique et d'infertilité masculine.

1.2 Génétique

Le gène de la mucoviscidose a été découvert en 1989 par Tsui. Il se situe sur le bras long du chromosome 7 au niveau de la région q 31.2. Il s'étend sur un territoire génomique d'environ 250 kilobases et contient 27 exons.

Il est transcrit en un acide ribonucléique messager (ARNm) de 6,5 kilobases et code une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés ; il s'agit d'un canal ionique nommé protéine (ou canal) CFTR, qui appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette).

Ce canal est constitué de deux régions transmembranaires hydrophobes (TM) contenant chacune six hélices α , de deux domaines de liaisons aux nucléotides (NBD : Nucleotide Binding Domains) contenant des séquences de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) et d'un domaine régulateur cytoplasmique (R) contenant de nombreux résidus chargés et la majorité des sites de phosphorylation (Figure 1) (2, 4).

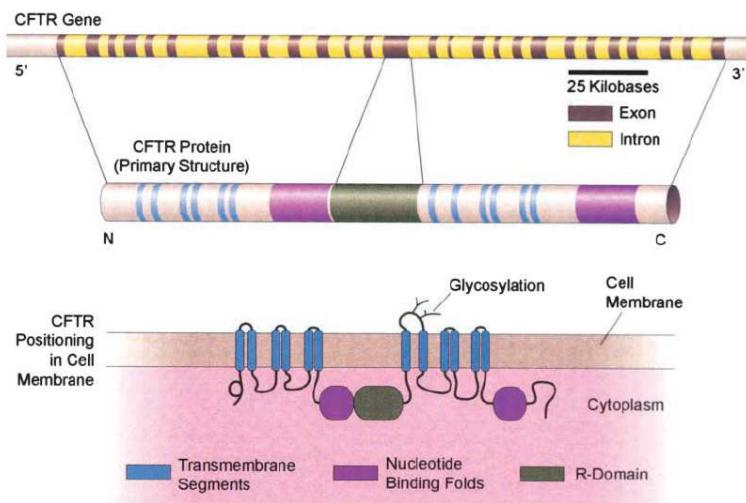


Figure 1 : Structure du gène et de la protéine CFTR (1).

La principale fonction de la protéine CFTR est le transport des ions chlorures de l'intérieur de la cellule vers la lumière au travers de la membrane apicale des cellules épithéliales (Figure 2). Ce canal est retrouvé dans de nombreux organes ou tissus tels que les glandes sudorales, les glandes salivaires, les voies aériennes, l'épithélium nasal, les canaux déférents masculins, le foie, l'épithélium intestinal et le pancréas. Le canal CFTR contrôle donc la composition et le pH du liquide de surface des voies aériennes (ou Airway Surface Liquid : ASL) et régulé par une protéine kinase A AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) - dépendante. La protéine CFTR est également impliquée dans divers processus intracellulaires comme :

- la régulation d'autres types de canaux ioniques, comme les canaux ENaC (Epithelial Sodium Channel).

- le trafic et le recyclage des membranes.
- la régulation du pH des organelles intracellulaires.
- la stimulation de l'endocytose et de l'exocytose.
- la régulation de la sécrétion de glycoprotéines et de mucines
- le transport de l'ATP et du glutathione.
- la régulation de la production de cytokines pro et anti-inflammatoires.

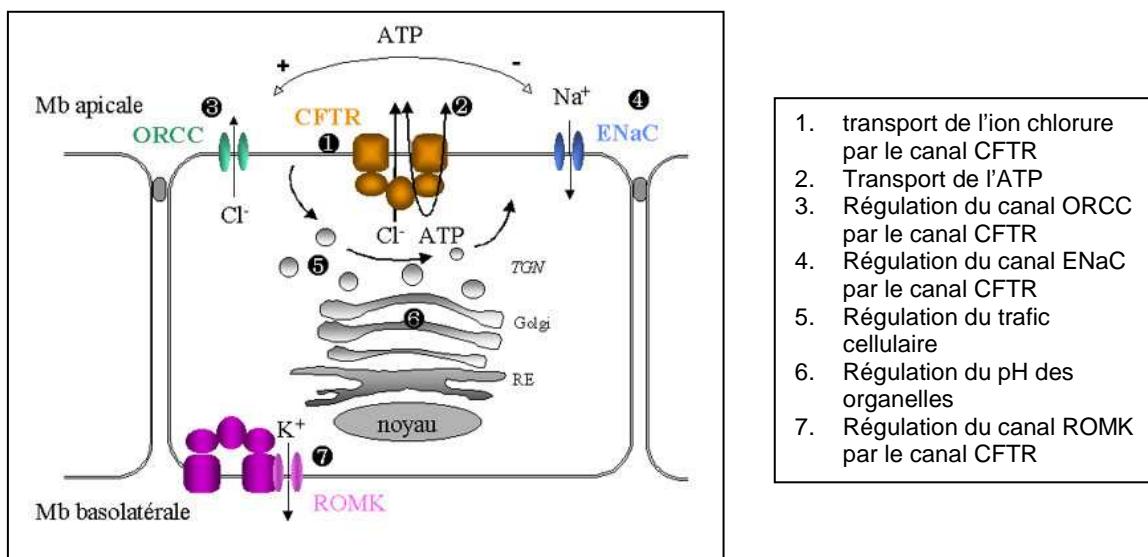


Figure 2 : Fonctionnement du canal CFTR (d'après Schwiebert et coll. 1999).

Depuis l'identification de l'anomalie moléculaire de la maladie, plus de 1600 mutations ont été documentées et répertoriées au sein d'un consortium international d'étude des mutations du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://genet.sickkids.on.ca/cftr>) (2). La mutation la plus fréquente est une délétion de trois nucléotides dans l'exon 10 entraînant l'absence de l'acide aminé phénylalanine, normalement situé en position 508 sur la protéine CFTR et ainsi nommée $\Delta F508$. Sa fréquence est en moyenne de 70 % mais varie selon les pays entre 18 % en Tunisie et 90 % au Danemark (3, 4).

Cette mutation induit un mauvais repliement de la molécule entraînant un défaut de maturation et de transport (classe II) mais aussi un temps d'ouverture plus réduit du canal ionique (classe IV) (Figure 3). En France, environ la moitié des malades sont homozygotes pour cette mutation et les deux tiers ont une hétérozygotie composite incluant cette mutation (8). L'immense majorité des mutations responsables de la mucoviscidose sont essentiellement des mutations ponctuelles (2). Bien que la distribution de ces mutations varie de manière significative selon la région et/ou le pays d'origine des patients atteints de mucoviscidose, la très grande majorité des mutations, en dehors de la vingtaine de mutations qui ont une fréquence supérieure à 0,1 %, sont rares, parfois même rapportées dans une seule famille. Les premières études visant à caractériser les conséquences moléculaires et biochimiques des variations nucléotidiques sur la synthèse, la structure et le fonctionnement de la protéine ont permis d'établir une répartition des mutations en six classes (2, 7) (Figure 3) :

- **Classe I** : elle regroupe les mutants affectant la synthèse de la protéine CFTR. Il en résulte une absence de la protéine CFTR au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales.
- **Classe II** : elle concerne les mutations altérant le processus de maturation et/ou le trafic intracellulaire de la protéine CFTR. Très peu de protéines CFTR fonctionnelles parviennent à la membrane apicale. La mutation Δ F508 appartient à cette classe et il est intéressant de noter que la protéine en résultant possède une activité résiduelle.
- **Classe III** : les mutants altèrent la régulation de l'activité du canal CFTR. Il en résulte une quantité normale de protéine CFTR non fonctionnelle au niveau de la membrane apicale.
- **Classe IV** : elle regroupe les mutations altérant la conductance et la sélectivité ionique du canal CFTR. Il en résulte une quantité normale de protéine CFTR mutée ayant une activité résiduelle. La mutation Δ F508 appartient aussi à cette classe.

- **Classe V** : les mutants réduisent la quantité de canaux CFTR fonctionnels et sont appelés « mutants quantitatifs ».
- **Classe VI** : elle concerne les mutants produisant des protéines CFTR instables.

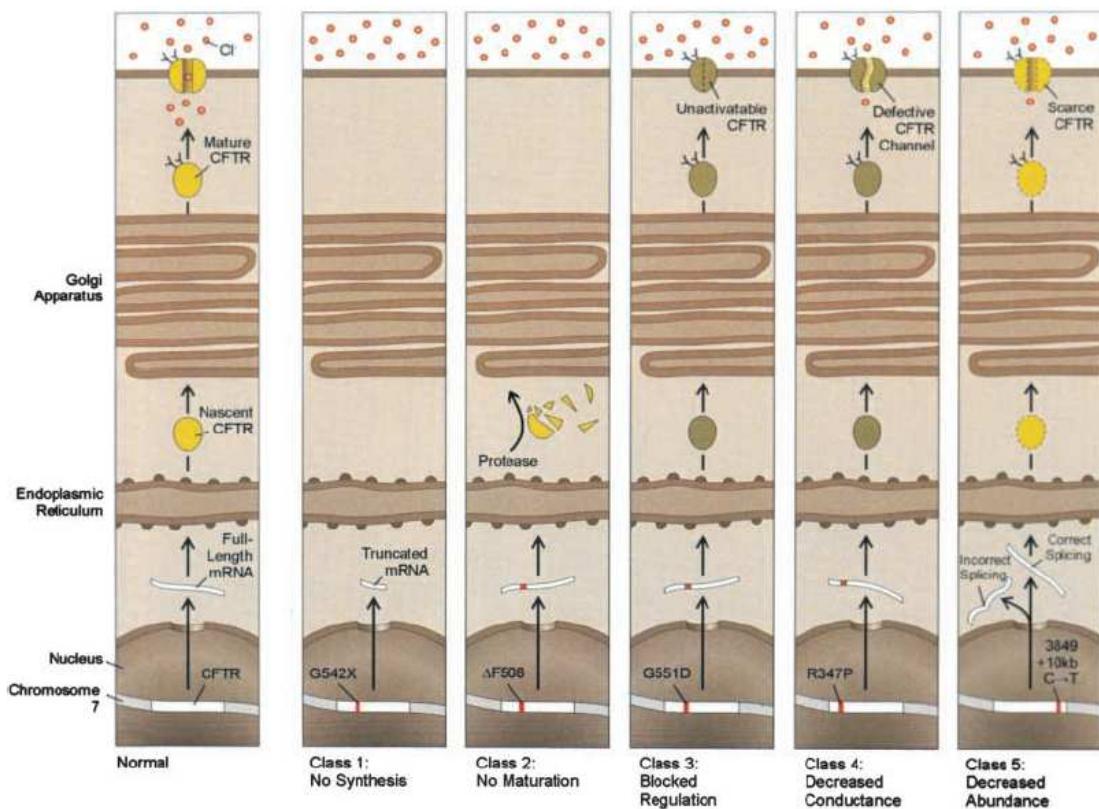


Figure 3 : Classification des mutations du gène *CFTR* (1).

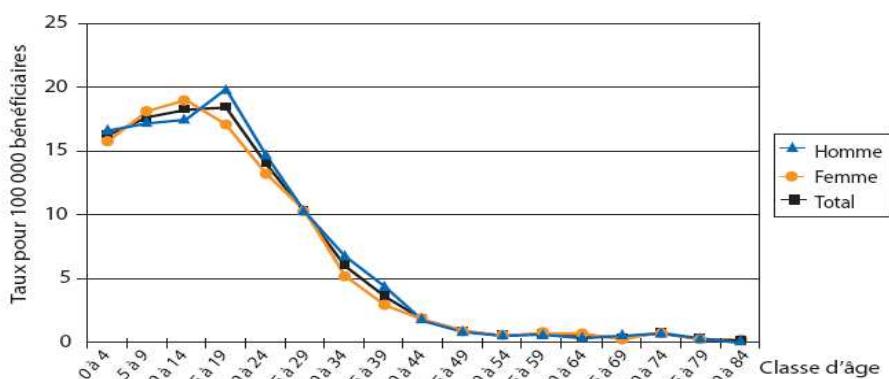
Les mutations appartenant aux classes I, II, III et VI sont dites « sévères » et celles appartenant aux classes IV et V sont dites « modérées ». Les études de corrélation entre les génotypes identifiés et les phénotypes observés ont permis de proposer une deuxième classification en fonction du statut pancréatique auquel elles sont associées. Les mutations identifiées chez les patients présentant une insuffisance pancréatique exocrine sont étiquetées comme mutations « sévères » ; cela représente 85 % des patients. Les mutations n'altérant pas la fonction pancréatique représente 15 % de ces derniers (2).

De nombreux patients sont hétérozygotes composites c'est à dire qu'ils portent deux mutations différentes sur les allèles maternels et paternels. Or, les mutations modérées ont, au niveau moléculaire, un effet dominant sur les mutations sévères, ce qui signifie qu'une mutation de classe IV ou V peut améliorer les conséquences d'une mutation sévère.

Enfin, dans certains organes comme le pancréas, le génotype est bien corrélé au phénotype c'est à dire qu'un génotype modéré s'accompagne rarement d'insuffisance pancréatique mais dans les poumons la relation génotype – phénotype est moins nette. Le phénotype respiratoire semble être modulé en plus par d'autres facteurs génétiques non encore identifiés.

1.3 Epidémiologie

D'après l'observatoire national de la mucoviscidose (5) et la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (Cnamts) (6), le nombre de personnes atteintes de mucoviscidose en France est d'environ 5500. Actuellement, les adultes représentent 40 % des patients, ce qui signifie qu'il ne s'agit plus d'une maladie exclusivement pédiatrique. La répartition selon le sexe est équilibrée (52 % d'hommes et 48 % de femmes). En 2004, la prévalence lors des premières années de vie de la mucoviscidose est de 16 pour 100 000 pour croître à 20 ans à 18 pour 100 000, ce qui reflète les formes plus modérées de la maladie. La prévalence décroît après 20 ans en lien direct avec la mortalité prématuée sous le seuil de 5 pour 100 000 après 35 ans (Graphique 1).



Source : Cnamts

Graphique 1 : Prévalence de la mucoviscidose par sexe et par classe d'âge en 2004 (6).

Les taux régionaux de mucoviscidose varient en France : la prévalence régionale la plus élevée est observée en Bretagne avec 14,3 pour 100 000. Les régions les moins touchées se situent au niveau de la Méditerranée et de l'Île de France (Figure 4).

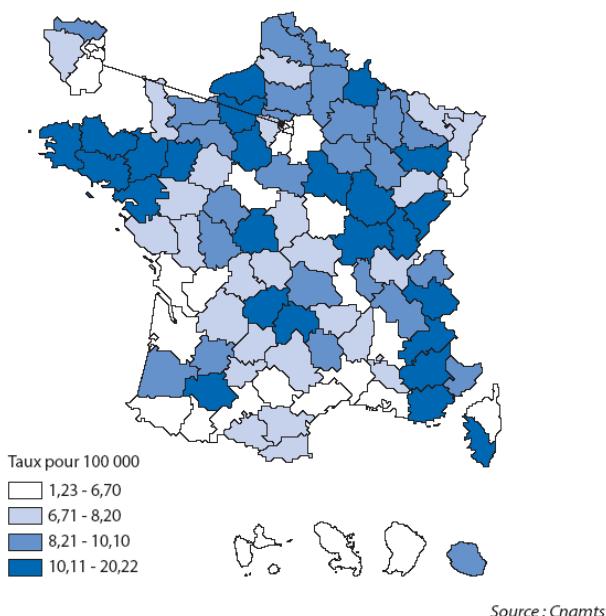


Figure 4 : Prévalence de mucoviscidose par département en 2004 (6).

Au cours de l'année 2005, 47 décès sont survenus (taux annuel : 1,1 %) dont l'âge moyen de décès était de 27 ans. Grâce aux traitements axés principalement sur la prise en charge respiratoire, digestive et nutritionnelle, le pronostic des patients atteints de mucoviscidose a largement été amélioré. Ainsi, pour les enfants naissant en 2007, l'espérance de vie est de 46 ans alors qu'elle n'était que de 7 ans en 1965 (6).

1.4 Diagnostic de mucoviscidose

Les circonstances du diagnostic de mucoviscidose ont beaucoup changé en France depuis la généralisation du dépistage en 2002 (circulaire DHOS OPRC/2001 n° 502, 22 octobre 2001). Afin de respecter la législation française concernant les études génétiques, le consentement parental spécifique au génotype *CFTR* doit être recueilli auprès des familles.

L'étude génétique ne sera effective que pour les nouveaux-nés « suspects », soit 0,5 à 0,6 % des nouveaux-nés (9). Au préalable, une information globale et suffisamment explicite doit être fournie aux parents.

Le dépistage néonatal est réalisé au troisième jour de vie par prélèvement de sang sur papier buvard (carton de Guthrie) concomitamment aux autres dépistages. Il repose sur le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR). En cas de valeur supérieure au seuil d'alerte ($> 55 \mu\text{g/L}$), le prélèvement est adressé au laboratoire interrégional de biologie moléculaire accrédité pour réaliser l'étude génétique. Celle-ci porte sur trente mutations (CF Kit[®] 30) (8, 9). En pratique, cette étude sur les trente mutations couvre environ 85 à 90 % des allèles mutés chez les patients (8). L'identification d'une ou de deux mutations conduit le nouveau-né et sa famille au CRCM pour un test de confirmation, le test à la sueur (TS). Les nouveau-nés sans mutation décelée ou dont l'étude de l'acide désoxyribonucléique (ADN) n'a pas été réalisée, auront un contrôle de la TIR à J 21. Toutefois, l'iléus méconial reste une circonstance diagnostique classique, survenant avant le résultat du dépistage (8).

Pour les enfants nés avant 2002, les critères diagnostiques sont basés sur l'association de manifestations cliniques évocatrices (Tableau 1) et d'un test biologique documentant le dysfonctionnement de la protéine CFTR. En pratique, il s'agit d'un TS positif, éventuellement d'une anomalie des différences de potentiel nasal ou de l'identification d'une double mutation du gène *CFTR* (8).

Tableau 1 : Symptômes respiratoires évocateurs de la mucoviscidose (7).

	a) toux chronique et obstructive
	b) obstruction bronchique (wheezing)
Symptômes sino-respiratoires chroniques	c) Colonisation/infection chronique par des pathogènes typiques de la mucoviscidose
	d) anomalies radiologiques persistantes (distension, bronchiectasie)
	d) polypes nasaux
	e) hippocratisme digital
	a) intestinales : iléus méconial, syndrome d'obstruction intestinale distale, prolapsus rectal
Anomalies gastro-intestinales et nutritionnelles	b) pancréatiques : diarrhée graisseuse, pancréatites récurrentes
	c) hépatiques : atteinte chronique se manifestant par des signes cliniques ou d'anatomopathologie de cirrhose focale ou multilobaire
	d) nutritionnelles : retard de croissance staturo-pondérale, hypoprotéinémie avec œdèmes, complications secondaires liées aux carences aux vitamines liposolubles
	a) syndrome de perte de sel : déplétion sodée aiguë, alcalose métabolique chronique
Autres	b) anomalies urogénitale masculines responsable d'azoospermie obstructive (ABCD = absence bilatérale des canaux déférents)

Le TS reste donc un élément clé du diagnostic de mucoviscidose et reste indispensable lorsque la génétique ne permet pas d'affirmer le diagnostic. Ce test est réalisé selon la technique de Gibson et Cooke, méthode de référence, qui se déroule en trois étapes (7, 10) :

- Stimulation de la sudation : la sueur est obtenue après iontophorèse à la pilocarpine.

- Recueil de la sueur : à l'aide d'un papier filtre, d'un tube capillaire ou d'un patch. Pour que le test soit fiable, le poids minimal de l'échantillon recueilli est de 100 mg.
- Dosage des ions chlorures dans la sueur.

Les valeurs de référence, pour les patients d plus de trois mois de la concentration en ions chlorure dans la sueur sont les suivantes :

- < 40 mmol/L = le test est normal
- entre 40 et 60 mmol/L = le test est douteux. Il faudra répéter le test et s'aider des arguments cliniques et paracliniques pour affirmer ou non le diagnostic.
- 60 mmol/L = le test est positif. Il devra être répété à un moment différent pour conclure. Il faut noter que la valeur seuil est à 30 mmol/L pour les enfants de moins de trois mois.

Cette technique a une sensibilité de 98 %, une spécificité de 83 % et une valeur prédictive positive de 99,5 % (7). Cependant, il existe des faux positifs (15 % des cas : erreurs techniques, patients déshydratés, ayant un eczéma, un rash) ainsi que des faux négatifs (12 % des cas : erreurs techniques, les patients oedémateux ou traités par minéralocorticoïde) (10).

Outre les diagnostics méconnus pendant l'enfance qui sont devenus rares, il existe d'authentiques révélations tardives de la maladie. Il s'agit classiquement mais non constamment de formes cliniques moins sévères. La bronchectasie est la présentation clinique la plus fréquente à l'âge adulte. Ces formes tardives représentent 15 à 20 % des cas (4).

Avant la mise en place du dépistage néonatal systématique, l'âge moyen du diagnostic de mucoviscidose était en moyenne de 30 mois (7). Les premiers résultats du dépistage néonatal obtenu sur 1 143 248 nouveaux-nés, entre 2002 et 2003, montre que l'âge médian à la première consultation au CRCM (en dehors des cas d'iléus méconial) est de 37 jours avec 52 % des enfants qui sont symptomatiques. Les symptômes sont majoritairement digestifs (32 %) ou staturo-pondéraux (20 %) ou mixtes (18 %). Seul 30 % ont une composante respiratoire (9). Enfin, la communauté médicale s'attend à ce que 95 % des malades soient détectés en période néonatale grâce au dépistage (9).

2. Interactions bactéries – tractus respiratoire de l'hôte

2.1. Conditions liées à l'hôte

2.1.1. Facteurs mécaniques : impact du gène CFTR sur la physiologie des voies aériennes et la clairance muco-ciliaire

De nombreuses études se sont focalisées sur l'impact du dysfonctionnement du gène *CFTR* sur la composition du liquide de surface des voies aériennes (ASL) dont les modifications observées au cours de la mucoviscidose sont à l'origine de la cascade physiopathologique conduisant à une progressive dégradation de la fonction pulmonaire (1).

L'ASL est composé de deux couches situées au dessus de la surface de l'épithélium respiratoire (1) :

- une couche de mucus : composée de mucine de haut poids moléculaire dont les propriétés varient en fonction du contenu en eau, de la concentration en ions et du pH. Les chaînes latérales des oligosaccharides présentes à ce niveau représentent, de par leur grande diversité, des sites de liaison à une large variété de ligands qui peuvent être ensuite éliminés par clairance muco-ciliaire.

- une couche de liquide périciliaire de faible viscosité qui permet un battement optimal des cils et une lubrification des mucines.

Chez les individus sains, la faible viscosité de la couche périciliaire permet une clairance muco-ciliaire efficace (Figure 5).

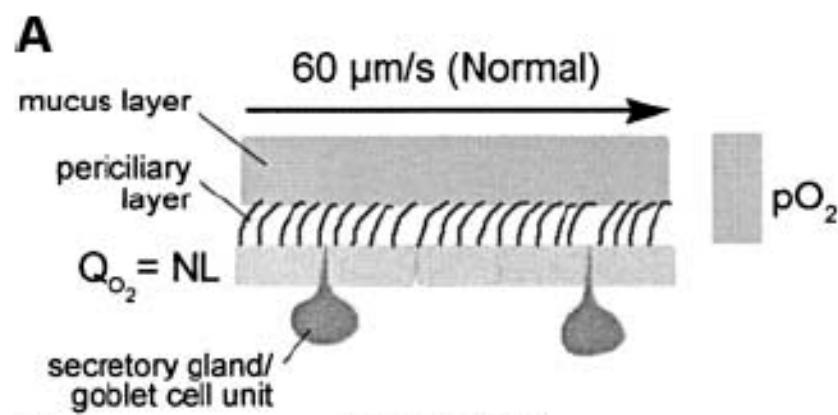


Figure 5 : Structure du liquide de surface des voies aériennes (ASL) (1).

Il existe trois hypothèses pour expliquer la différence de propriétés de l'ASL entre les individus sains et ceux atteints de mucoviscidose (1, 12) :

- la première hypothèse propose un modèle où l'ASL a un volume plus faible par rapport aux sujets sains mais une composition isotonique comparable à celle du plasma (Figure 6 A1). En effet, la mesure de la composition ionique et de l'osmolalité de l'ASL et du plasma chez des souris saines et des souris atteints de mucoviscidose a montré des résultats comparables (1). Or, dans cette hypothèse, le dysfonctionnement du canal CFTR affecterait d'autres canaux tels que les canaux sensibles au sodium (ENaC) responsables de la réabsorption des ions sodium et de l'eau au niveau de l'épithélium pulmonaire. Ces canaux ENaCs sont régulés négativement par la protéine CFTR chez les sujets sains. Ainsi, chez les patients atteints de mucoviscidose, l'activité de ces canaux ENaCs est augmentée ce qui aboutit à une réabsorption isotonique en eau et en sels plus importante. Ceci empêche le bon fonctionnement des cils et donc réduit la clairance muco-ciliaire (Figure 6 A2).

- la deuxième hypothèse propose un modèle où l'ASL a une concentration en sels plus élevée que la population saine. Chez les sujets sains, l'épithélium pulmonaire est perméable à l'eau et régule grâce au canal CFTR la concentration en sel (NaCl) (Figure 6 B1). Or, chez les patients atteints de mucoviscidose, l'eau reste piégée dans la couche épithéliale et le sel est peu absorbé augmentant ainsi la concentration en sel, ce qui aboutit à une déshydratation du mucus et donc à une diminution de la clairance muco-ciliaire (Figure 6B2).

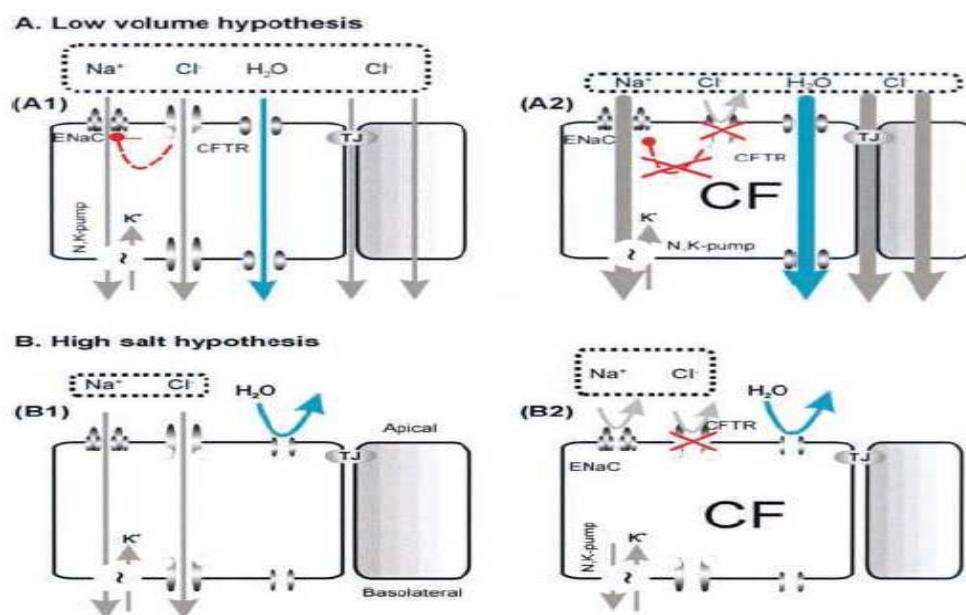


Figure 6 : Propriétés du liquide de surface des voies aériennes chez le sujet sain et chez le patient atteint de mucoviscidose (1).

- des preuves scientifiques sont en faveur d'un rôle important des glandes sous muqueuses dans la physiopathologie de la mucoviscidose. En effet, le gène *CFTR* est fortement exprimé dans les cellules épithéliales séreuses des glandes sous muqueuses par rapport aux autres tissus pulmonaires (1). Ainsi, la perte de la fonction de la protéine CFTR peut engendrer un changement de la composition macromoléculaire des sécrétions de ces glandes ce qui aboutirait à une augmentation de la viscosité, à une diminution de l'hydratation et donc une diminution de la clairance muco-ciliaire.

Bien que ces hypothèses puissent expliquer en partie la précocité et la persistance des infections endo-bronchiques, il n'est pas certain que la composition en sel de l'ASL varie le long du tractus respiratoire. Mais, Gibson et coll. (1) ont mesuré la concentration en NaCl de l'ASL, à l'aide d'une nouvelle technique isotopique, chez des sujets sains et des sujets atteints de mucoviscidose. Ces auteurs ont observés une différence de concentration en sel entre les sujets sains et ceux atteint de mucoviscidose (50 millimoles versus 100 millimoles respectivement). Par conséquent, la deuxième hypothèse ne peut pas être réfutée et d'autres études de l'ASL sont nécessaires afin de mieux comprendre l'influence du dysfonctionnement du canal CFTR.

2.1.2. Immunité des patients atteints de mucoviscidose

L'altération du transport ionique se produit à la naissance. Puis, rapidement, les voies aériennes des nouveaux nés sont soumises de manière répétée à de faibles inoculum bactériens. Ordinairement, les défenses non spécifiques des poumons telles que les défensines, les lysozymes et le monoxyde d'azote (NO) permettent d'éliminer la colonisation ou l'infection bactérienne. Or, chez les patients atteints de mucoviscidose, ces défenses semblent compromises, en particulier la production de NO (Figure 7) (12).

De plus, il n'existe pas de preuves pour une immunodépression des patients atteints de mucoviscidose pour expliquer les infections chroniques (1). En effet, ces patients n'ont pas d'infections plus fréquentes ou plus sévères, en dehors du tractus respiratoire, que les sujets sains.

2.2. Conditions liées aux bactéries

La composition et les propriétés anormales des sécrétions bronchiques ne permettent pas à elles seules d'expliquer pourquoi les patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par un nombre limité d'espèce bactérienne, en particulier *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ceci suppose l'existence de facteurs d'adaptation spécifiques de certaines espèces bactériennes.

2.2.1. Adhérence anormale des bactéries aux cellules épithéliales

L'asialoganglioside-1 (asialoGM-1) est un récepteur surexprimé au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales exprimant le mutant *CFTR*. *Haemophilus influenzae* (HI), *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont capables de se lier à ce récepteur par leurs adhésines (pilis et flagelles) (1, 12). La liaison au récepteur asialoGM-1 active la transcription de facteurs pro-inflammatoires tels que NF-κB (facteur nucléaire kappa B) et induit la production de substances chimio-attractantes sécrétées par les polynucléaires neutrophiles (PNN) telles que l'interleukine-8 (IL-8).

Il est à noter que la capacité de *P. aeruginosa* à se lier au récepteur asialoGM-1 est supérieure chez les patients porteurs de la mutation Δ F508 sur les deux allèles par rapport aux patients hétérozygotes pour cette mutation. Cependant, certains auteurs réfutent, en partie, cette hypothèse, en particulier pour les souches mucoïdes de *P. aeruginosa*. En effet, ces souches ne peuvent pas utiliser l'asialoGM-1 comme récepteur du fait de la perte de leurs adhésines. Par contre, celles-ci peuvent se lier à l'héparane sulfate protéoglycane sur la surface basolatérale des cellules épithéliales qui servirait alors de récepteur chez les patients infectés chroniquement par des souches mucoïdes de *P. aeruginosa* (1) (Figure 7).

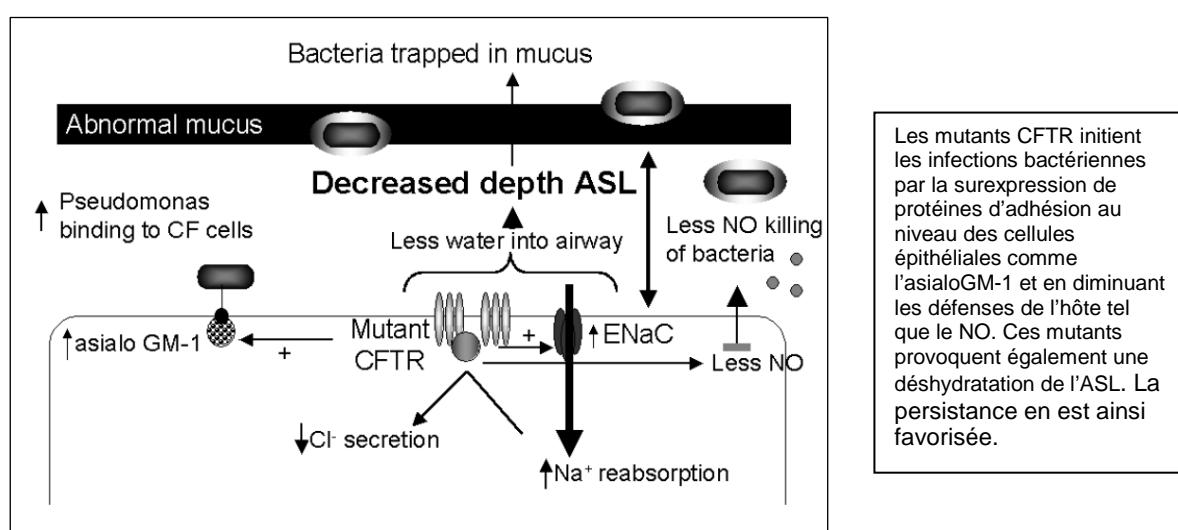


Figure 7 : Impact des mutants *CFTR* sur la physiologie de la cellule épithéliale (12).

Certaines études ont suggéré que la protéine CFTR pouvait servir de récepteur à *P. aeruginosa* pour permettre la phagocytose de celui-ci (1). Par conséquent, la clairance de *P. aeruginosa* serait diminuée dans la mucoviscidose. Il est à souligner que ce serait le lipopolysaccharide (LPS) de *P. aeruginosa* qui servirait de ligand. Toutefois, les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* ne pourraient pas se lier à la protéine CFTR puisqu'elles ont perdu en partie ou en totalité leur LPS. Enfin, *P. aeruginosa* possède de nombreuses adhésines s'exprimant à la surface bactérienne. Elles permettent la rétention de *P. aeruginosa* au niveau des voies pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose, en se liant aux oligosaccharides des mucines via une protéine FliD (FliD : Flagellar Cap Protein D) et aux cellules épithéliales ce qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires.

2.2.2. Adaptation bactérienne à l'environnement des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose

L'une des particularités de la mucoviscidose est le passage, après un certain temps plus ou moins long, à la colonisation ou l'infection chronique. Cette chronicité concerne surtout *P. aeruginosa* mais aussi *S. aureus*. Les causes de ce passage à la chronicité commencent à être élucidées et comprises.

S. aureus est capable de modifier son métabolisme afin de pénétrer dans les cellules et d'y rester en quiescence. Cette capacité lui permet non seulement de persister dans les voies aériennes et d'engendrer des infections récurrentes mais aussi d'échapper aux défenses de l'organisme et aux traitements antibiotiques.

Au début de la colonisation ou de l'infection à *P. aeruginosa*, les souches ont usuellement un phénotype non mucoïde mais, rapidement, certaines souches ont la capacité de muter. Elles produisent un biofilm qui leur donne un aspect typique, les souches mucoïdes.

Un gradient d'oxygène entre la lumière des poumons et l'intérieur du mucus se crée chez les patients mucoviscidosiques (1, 12). *P. aeruginosa* répond à cet environnement hypoxique par une production plus importante de biofilm ce qui contribue à sa persistance. Bien que le biofilm soit fortement antigénique, les anticorps ainsi produits demeurent inefficaces mais participent aux dommages tissulaires locaux par la formation de complexes immuns. *P. aeruginosa* produit aussi une enzyme capable de cliver le biofilm afin de permettre sa propagation. Comme les souches mucoïdes sont moins virulentes que les souches sauvages, il semble que le déclin de la fonction respiratoire soit plutôt dû à la réponse inflammatoire et à ses conséquences qu'aux dommages dus à *P. aeruginosa*. En effet, la persistance de *P. aeruginosa* dans les poumons semble altérer les propriétés du LPS (perte d'une partie ou de la totalité des chaînes O-oligosaccharides). Les conséquences de ce changement sont à la fois cliniques puisque le complément se fixe sur ces chaînes O-oligosaccharides et des conséquences microbiologiques puisque ces souches ont un aspect particulier sur les milieux de culture (12). De plus, *P. aeruginosa* possède des caractéristiques propres qui lui permettent de persister dans les voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose, d'augmenter la réponse inflammatoire de l'hôte et de résister à l'action des peptides antimicrobiens et des antibiotiques, par la production de nombreux facteurs de virulence et par la capacité à s'organiser à l'intérieur du biofilm.

Enfin, la réponse immunitaire innée avec la clairance muco-ciliaire sont les premières lignes de défense des infections des voies aériennes. De nombreux peptides et protéines (α et β défensines ...) sécrétés par les cellules pulmonaires (cellules épithéliales, pneumocytes de type II ...) ont un pouvoir bactéricide et ont la capacité de moduler la réponse inflammatoire de l'hôte. Il n'existe pas de preuve d'un défaut de production de ces peptides et de ces protéines chez les patients atteints de mucoviscidose, mais, selon la deuxième hypothèse, l'élévation de la concentration en sel de l'ASL pourrait inactiver ces peptides antimicrobiens.

2.3. Phénomène inflammatoire

Les enfants atteints de la mucoviscidose développent précocement des infections bactériennes respiratoires qui induisent une réaction inflammatoire intense. Cette réponse se traduit initialement par une production de nombreuses cytokines (IL-6 et IL-8 : interleukines 6 et 8), de facteurs de croissance (« granulocyte macrophage colony stimulating factor » : GM-CSF), de protéine d'adhésion (« intracellular adhesion molecule-1 » : IAM-1) par les cellules épithéliales. Ceci induit le recrutement local de macrophages qui produisent alors leurs propres cytokines comme l'IL-8, le « tumor necrosis factor » (TNF- α) et l'IL-1 β , ce qui accentue la production de cytokines par les cellules épithéliales. Puis, rapidement, de nombreux polynucléaires neutrophiles (PNN) sont recrutés grâce à l'IL-8. L'IL-8 est une chémokine puissante qui permet d'attirer les PNN au niveau du foyer inflammatoire.

L'une des caractéristiques des patients mucoviscidosiques est la présence persistante des PNN au niveau du tractus respiratoire. Cette persistance est expliquée, au moins en partie, par la présence en excès au niveau des voies respiratoires de patients mucoviscidosiques de substances exerçant un effet attractif (IL-8, leucotriène B4) sur les PNN mais également par un excès de production de GM-CSF et une diminution relative d'interleukine 10 (rôle dans le déclenchement de l'apoptose des PNN) (12). L'excès de PNN et de leurs produits de sécrétion, en particulier l'élastase neutrophile, altère la capacité de l'hôte à éliminer l'infection bactérienne. En effet, l'élastase neutrophile interagit avec les cellules épithéliales en promouvant la transcription d'IL-8 et la sécrétion de macromolécules ce qui favorise l'inflammation et l'obstruction des voies aériennes. L'élastase neutrophile diminue la phagocytose des PNN (par clivage des récepteurs CR-1 et CR-3 et de leurs ligands C3b et C3bi) et des macrophages (par clivage des IgG) (Figure 8) (12). Il a été montré dans une étude clinique que la concentration en élastase neutrophile dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients atteints de mucoviscidose était bien plus importante que la normale (1 micromole alors que 10^{-8} mole suffit) et était suffisante pour que l'inflammation et l'infection s'entretiennent mutuellement (12). Il faut également souligner qu'une petite fraction mais significative d'élastase provient des bactéries.

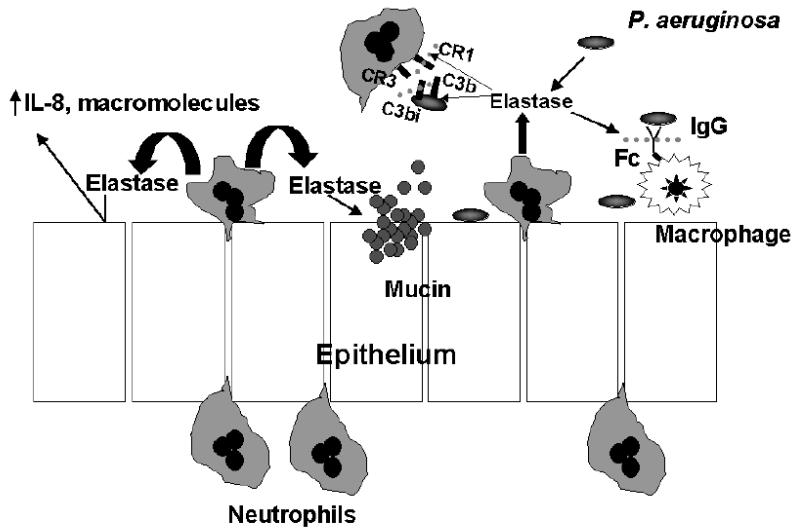


Figure 8 : Effets de l'élastase sur les mécanismes de défense de l'hôte et sur l'inflammation (12).

La persistance d'un stimulus bactérien provoque l'excès de PNN. Les nombreuses protéases sécrétées par les PNN sont capables de digérer les structures protéiques pulmonaires comme le collagène et l'élastine. Or, la quantité normale d'antiprotéases présentes au niveau du foyer inflammatoire et infectieux est insuffisante face à la quantité d'enzymes relarguées par les PNN (12). De même, la production excessive d'espèces oxydantes lors de l'inflammation et/ou d'infection n'est pas régulée par les défenses anti-oxydantes qui sont réduites dans la mucoviscidose (12).

Ainsi, les dommages causés par les protéases et les espèces oxydantes sur la structure protéique des poumons conduit à la dilatation des bronches et à la bronchiectasie. A long terme, les conséquences de la bronchiectasie sont d'augmenter la réponse inflammatoire, de favoriser l'épaississement des sécrétions, de permettre la persistance bactérienne, d'augmenter la toux et d'« engorger » les vaisseaux bronchiaux ce qui peut aboutir à des hémoptysies massives.

3. Principales bactéries impliquées dans la mucoviscidose

3.1 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae (HI) ou bacille de Pfeiffer est un petit cocco-bacille à Gram négatif, aérobie et pléomorphe. Il a besoin de facteur de croissance pour se développer : ce sont les facteurs X (hémine) et V (nicotinamide adénosine dinucléotide : NAD). Il n'est pas mobile et ne sporule pas. Il peut être encapsulé ou non.

L'Homme est le seul hôte connu et les souches non encapsulées font partie de la flore commensale des voies aériennes supérieures. HI est retrouvé chez 75 % des jeunes enfants et chez 35 % chez l'adulte. La transmission inter-humaine se fait par voie aérienne (gouttelettes de Pflügge) ou plus rarement par contact direct.

Les facteurs de virulence de HI sont les suivants :

- une capsule polysaccharidique de grande taille inhibant la phagocytose et caractérisée par l'existence de six sérotypes différents (de a à f) dont le plus fréquent (associé à 90 % des infections) est le type b contre lequel il existe un vaccin. Il est à souligner que les anticorps acquis suite à une infection sont très protecteurs ce qui explique que l'infection touche essentiellement les enfants de trois mois à trois ans. Le pouvoir pathogène de HI dépend de la présence de la capsule. Si les souches ne sont pas encapsulées, elles ne provoquent que des atteintes localisées comme des bronchites ou des otites moyennes alors que si elles sont encapsulées, elles peuvent entraîner des épiglotites ou des méningites.
- le lipide A faisant partie du lipopolysaccharide de surface est responsable de l'inflammation aiguë.
- une protéase qui détruit l'extrémité Fc des anticorps.

HI fait partie avec le *S. aureus* des premières espèces bactériennes colonisant les enfants atteints de mucoviscidose (13). La prévalence chez les patients mucoviscidosiques colonisés ou infectés par HI est d'environ 15 % (14, 15). Les plus fort taux de colonisation par HI ont été observés chez les enfants de moins de dix ans (15). Bien que la pathogénicité de HI soit établie, son rôle délétère sur l'épithélium bronchique est inférieur à celui de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*. De même, contrairement à *S. aureus*, *P. aeruginosa* et au complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc), il est rarement responsable de colonisation chronique. Enfin, son éradication est habituellement facile bien que plus de 30 % des souches produisent une bêta-lactamase, les rendant résistantes aux aminopénicillines.

3.2 *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Généralités

Staphylococcus aureus est un cocci à Gram positif, aérobiose-anaérobiose facultatif. Il s'agit d'un pathogène ubiquitaire qui peut survivre dans l'environnement mais dont le réservoir est principalement humain et animal (animaux à sang chauds).

S. aureus peut être encapsulé mais la présence d'une capsule est inconstante. *S. aureus* peut également s'entourer d'un biofilm, le « slime », produits lors de changements environnementaux.

S. aureus peut coloniser les muqueuses et la peau de l'Homme mais également les fosses nasales qui représentent une niche écologique préférentielle des patients atteints de mucoviscidose (66 % des patients) (62).

La transmission inter-humaine de *S. aureus* est soit directe (les mains, l'éternuement, les effractions cutanées) soit indirecte (draps, matériels médicaux).

S. aureus a été le premier pathogène reconnu comme responsable d'infection broncho-pulmonaire chez les jeunes patients atteints de mucoviscidose. Avant l'ère des antibiotiques, les infections à *S. aureus* représentait la première cause de mortalité chez ces patients. Actuellement, c'est le deuxième micro-organisme le plus fréquemment isolé à partir du tractus respiratoire des enfants de moins de dix ans. La virulence est liée à la fois à sa capacité à adhérer à l'épithélium bronchique grâce à ses adhésines de surface (clumping factor, acide ribitolteïchoïques, protéine A) et à échapper aux défenses de l'organisme.

La prévalence d'isolats chez les sujets mucoviscidosiques varie en fonction des centres de 28 % à 63,3 % (14, 15, 17). Les plus fort taux de colonisation par *S. aureus* ont été observés chez les enfants âgés de onze à quinze ans (15). *S. aureus* reste sensible à de nombreux antibiotiques. En effet, la prévalence des souches méticillino-résistantes est peu élevée parmi les sujets mucoviscidosiques. Elle est de 9,2 % en France (64) et varie entre 6 et 20 % aux Etats-Unis (14).

3.2.2. Variants à petites colonies de *S. aureus*

Des formes auxotropes de *S. aureus* peuvent exister au niveau des bronches des patients atteints de mucoviscidose et au sein de foyers infectieux osseux. Cette sous population de *S. aureus* a été décrite la première fois en 1911 par Kolle et Hetsch (18, 20). Il s'agit des variants à petites colonies de *S. aureus* ou « *S. aureus* Small Colony Variants » (SA SCV). Ceux-ci sont responsables de la persistance de *S. aureus* dans l'arbre bronchique et de ce fait de la récurrence des infections dues à ce micro-organisme (18, 19, 20).

2.1. Caractère auxotrophe

Les SA SCV sont des souches auxotropes vis-à-vis de facteurs intervenant dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire (ménadione, hémine, thiamine) - mutants dits respiratoires - et/ou de la thymidine - mutants dits métaboliques.

a) Mutants respiratoires

La ménadione permet la synthèse de la ménaquinone en agissant comme un accepteur d'électron provenant du NAD ou du FAD (flavine adénine dinucléotide). La thiamine sert à la synthèse de la ménadione. L'hémine sert à la synthèse des cytochromes qui joue le rôle d'accepteur d'électron de la ménaquinone.

Le caractère auxotrophe des SA SCV vis à vis de ces composés aboutit à une diminution de la production d'ATP dont les conséquences sont (18, 21, 33, 34) :

- une diminution de la synthèse des caroténoïdes qui a des conséquences sur l'aspect morphologique des colonies (colonies non pigmentées).
- une croissance plus lente de SA SCV ce qui a des conséquences microbiologiques (difficulté de détection et d'isolement) et cliniques (moindre efficacité des bêta-lactamines).
- une diminution du gradient électrochimique membranaire qui explique la résistance des SA SCV aux aminosides dont la diffusion transmembranaire est dépendante de ce gradient. Hoffman et coll. (23) ont étudié, *in vitro*, l'effet de la substance HQNO (4-Hydroxy-2-heptylQuinoline-N-Oxyde) sur les souches de *S. aureus*. HQNO est une substance sécrétée par certaine souche de *P. aeruginosa* et qui a été retrouvé dans les expectorations de patients mucoviscidosiques. Elle a pour rôle premier d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif afin de permettre sa dissémination. Or, en présence d'aminosides, un effet paradoxal de HQNO a été observé. HQNO protège *S. aureus* de l'action des aminosides en inhibant les cytochromes de *S. aureus* et en favorisant l'apparition des souches de SA SCV (23). D'après cette étude, la co-colonisation ou co-infection par *S. aureus* et *P. aeruginosa* représenterait 20 à 25 % des patients.
- une diminution de la synthèse des facteurs de virulence (exoprotéines, alpha toxine).

b) Mutants métaboliques

Le mécanisme d'adaptation des souches auxotrophes à la thymidine n'est pas connu mais l'utilisation répétée et au long court du Bactrim® = cotrimoxazole est suspectée d'induire les souches thymidine dépendante.

Toutefois, les conséquences cliniques et microbiologiques sont les mêmes que les mutants respiratoires.

c) Prévalence des souches auxotrophes chez les patients mucoviscidosiques

Deux études ont montré que les souches SA SCV sont plus fréquemment auxotrophes à la thymidine. Dans l'étude de Proctor et coll. (18), 53 % des souches étaient auxotrophes à la thymidine ($n=78$) et 32 % de celles-ci étaient à la fois auxotrophe pour la thymidine et l'hémine. Khal et coll. (24) ont montré que 57,5 % des SA SCV étaient auxotrophes pour la thymidine ($n=212$) et que 12,2 % d'entre elles avaient un double caractère auxotrophe pour la thymidine et l'hémine. Dans ces deux études, les souches auxotrophes à la thymidine étaient aussi résistantes au cotrimoxazole. Il est à souligner que les patients porteurs d'une souche de SA SCV auxotrophe à la thymidine avaient été traités au long court par du cotrimoxazole. Il semble donc que l'utilisation prolongé et fréquente de cotrimoxazole favorise l'apparition des SA SCV (18, 24). Au final, *S. aureus* semble capable de diminuer la synthèse de protéines non essentielles à sa survie. Ce phénomène est facilement et rapidement réversible (18, 19, 25).

Bésier et coll. (26) ont étudié l'influence de l'âge, des petits poids et du cotrimoxazole sur l'apparition des souches de SA SCV. Ces auteurs ont montré que ces trois variables étaient significativement associées à l'apparition des SA SCV mais qu'elles étaient indépendantes.

Kahl et coll. (24) et Bésier et coll. (26) ont étudié la prévalence des SA SCV chez des patients mucoviscidosiques. Parmi les patients colonisés par *S. aureus* de phénotype normal, 17 à 46,1 % sont également porteurs de SA SCV (24, 26). Par contre, seulement 2 à 2,7 % des patients sont colonisés ou infectés par SA SCV (Tableau 2). Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par l'utilisation du cotrimoxazole au long de court plus fréquemment dans l'étude de Khal et coll. (24) par rapport à l'étude de Bésier et coll. (26).

Tableau 2 : Prévalence des souches de SA SCV (27, 24, 26).

Etudes	Nombre de patients	% de patients colonisés/infectés				% de SA SCV chez les patients porteurs de SA
		SA	SA seul	SA et SA SCV	SA SCV seul	
Kahl et coll. (27) 1998	78	67,9	34,6	33,3	NC	NC
Kahl et coll. (24) 2003	72	72,2	38,8	30,5	2,7	46,1
Bésier et coll. (26) 2007	252	48	39,6	7,9	2	17

NC = non communiqué, SA = *S. aureus*

3.2.2.2. Adhérence aux cellules épithéliales respiratoires et pouvoir invasif

L'adhérence des SA SCV aux cellules non phagocytaires est une étape préalable et nécessaire à leur internalisation par ces dernières. *S. aureus* possède de nombreuses protéines de surface qui lui permettent d'adhérer à la surface des tissus hôtes avec une affinité élevée pour certains composants de la matrice extracellulaire. Ces protéines sont appelées « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » (MSCRAMM) et sont capables de se lier à la fibronectine, au collagène, au fibrinogène et à la vitronectine (28, 29).

La fibronectine semble jouer un rôle majeur dans l'adhérence et l'invasion de *S. aureus*. En effet, deux MSCRAMMs ont été identifiées comme étant des protéines se liant avec une forte affinité à la fibronectine. Ce sont les « Fibronectin-Binding Protein » de type A et de type B (FnBP A et FnBP B) (28, 29). Ces protéines sont capables de se lier à plusieurs molécules de fibronectine. Il a également été démontré que l'internalisation de SA requérait les intégrines $\alpha 5\beta 1$.

Ces intégrines sont des récepteurs connus pour fixer la fibronectine. Ces dernières résident en des points particuliers de la membrane cellulaire, appelées points de contact focaux qui servent de point d'ancrage aux filaments d'actine du cytosquelette. Donc, l'internalisation de *S. aureus* serait initiée par l'intermédiaire de la fibronectine qui se lie d'une part aux FnBP de *S. aureus* et d'autre part aux intégrines de la cellule hôte. Cependant, bien que l'interaction fibronectine/FnBP/intégrine soit essentielle à l'internalisation de *S. aureus*, d'autres interactions interviennent, avec la protéine de choc thermique 60, la protéine d'adhérence extracellulaire, le clumping factor.

La particularité de cette sous population de *S. aureus* est sa capacité à pénétrer par endocytose dans les cellules non phagocytaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes mais aussi de persister et de se répliquer au sein de ces cellules (28, 30). Jarry et coll. (30) ont étudié *in vitro* le trafic cellulaire de *S. aureus* dans deux types de cellules épithéliales : CFT-1 (Cystic Fibrosis Tracheal cell), lignée de cellules épithéliales portant la mutation Δ F508 qui est la plus fréquemment retrouvé dans la mucoviscidose et LCFSN (complemented cell line), lignée de cellules ne portant pas de mutations engendrant la mucoviscidose. Ces auteurs ont montré que *S. aureus* est capable d'envahir les cellules CFT-1, de s'y répliquer et d'en induire l'apoptose. Ces phénomènes ne sont pas observés avec les cellules LCFSN. Une fois internalisé par endocytose, *S. aureus* survit dans les vacuoles d'endocytose dont il inhibe la fusion avec les lysosomes avant de s'échapper dans le cytosol (30).

Von Eiff et coll. (20) ont montré dans une étude prospective que les souches SA SCV associées à des souches de *S. aureus* de phénotype normal pouvaient persister plusieurs mois avec une médiane de 37 mois (extrêmes : 6 à 70 mois) au niveau des cellules épithéliales. De même, Kahl et coll. (24) avaient montré que les souches SA SCV seules pouvaient persister plusieurs mois avec une moyenne à 16,8 mois (extrêmes : 3 à 31 mois).

3.2.2.3. Diminution de l'expression de facteurs de virulence et survie intracellulaire

S. aureus possède de nombreux facteurs de virulence qui sont essentiellement régulés par le système *agr/sarA*. Le système *agr* (accessory gene regulator) est un système de quorum-sensing dépendant d'une molécule auto-inductible, appelée PAI (peptide auto-inductible) qui induit l'activation de l'opéron *agr* à partir d'un seuil donné (25, 28).

L'activation d'*agr* aboutit à la surexpression des exoprotéines comme l' α -toxine et à la diminution de l'expression des protéines d'adhésion. Le système *sarA* (staphylococcal accessory regulator A) code une protéine (DNA binding protein *sarA*) également importante pour l'activation du locus *agr*.

Certaines études ont démontré que le système *agr/sarA* était réprimé chez les mutants *HemB* (mutant de *S. aureus* auxotrophe pour l'hémine) ainsi que chez les souches isolées cliniquement de patients atteints de mucoviscidose (25, 28, 31). Ainsi, l'expression de certains gènes de virulence, en particulier le gène *hla* qui code pour l' α -toxine est diminué. Ceci favorise indirectement la survie intracellulaire des SA SCV en évitant toute agression des cellules hôtes dont la durée de vie n'est pas modifiée (19, 20, 31).

D'autres auteurs ont étudié le rôle du facteur auxiliaire sigma (*sigB*) dans la régulation des gènes de *S. aureus* (25, 29). *SigB* intervient dans la régulation des gènes codant les protéines d'adhésion et les facteurs de virulence lorsque l'environnement est défavorable. Il a été montré que les souches cliniques exprimant le facteur *sigB* avaient une meilleure capacité à pénétrer et à persister dans les cellules non phagocytaires par rapport aux mutants (25, 29).

Le système de régulation *sigB/agr/sarA* est complexe et nécessite encore des investigations afin de mieux comprendre le mécanisme de formation des SA SCV. *S. aureus* est donc capable de passer d'un phénotype SCV au phénotype normal. Les mécanismes ne sont pas encore élucidés mais il est supposé que *S. aureus* de phénotype normal pourrait réactiver les SA SCV restés quiescent dans les cellules non phagocytaires par la libération de PAI (25).

Vaudaux et coll. (29) ont étudié l'expression du clumping factor (protéine d'adhésion de *S. aureus*) chez des mutants *HemB* de *S. aureus*. Ces auteurs ont montré que les protéines d'adhésion étaient surexprimées chez les SA SCV par rapport aux souches de phénotype normal de *S. aureus* et que les facteurs de virulence étaient réprimés.

Sifri et coll. (32) ont étudié la virulence de mutants *HemB* (absence d'hémine) ou *menD* (absence de ménadione) vis à vis d'un nématode (*Caenorhabditis elegans*). Ces auteurs ont montré que les mutants *hemB* et *menD* (mutants de *S. aureus* auxotrophe pour la ménadione) étaient moins virulents que leurs souches parentales dans ce modèle. Toutefois, d'autres études animales à partir de modèle animal différent ont montré des résultats controversés (20, 32).

En conclusion, *S. aureus* est capable de s'adapter à un environnement défavorable pour échapper aux défenses de l'organisme, à l'action des antibiotiques et pour permettre sa dissémination. Cette adaptation s'accompagne d'un changement phénotypique, les variants à petites colonies de *S. aureus*, qui a des conséquences cliniques par une éradication plus difficile et microbiologiques par une détection et un isolement qui posent des problèmes méthodologiques (voir partie B).

3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobiose strict et également appelé bacille pyocyanique. Ce dernier est mobile grâce à un flagelle monotrichie. C'est une bactérie très répandue dans la nature (air, sols) et les habitats humides (fleurs, circuit d'eau, lavabo, toilettes ...) et qui peut exister à l'état de saprophyte chez l'Homme. Il s'agit d'un pathogène opportuniste dont la transmission inter-humaine peut être directe ou indirecte.

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence (12) :

- les adhésines (pili de type IV).

- l'élastase et la protéase alcaline sont deux enzymes protéolytiques qui créent des dommages tissulaires en diminuant la phagocytose et en désorganisant les jonctions inter-cellulaires. De plus, l'élastase de *P. aeruginosa* dégrade les immunoglobulines, les facteurs de la coagulation, les composants du complément, les cytokines et l'inhibiteur de l'alpha protéase tout en stimulant la libération des mucines. C'est une enzyme plus puissante que l'élastase des PNN. Ainsi, cette enzyme a un rôle important dans l'entretien de l'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose et colonisés ou infectés par *P. aeruginosa*.
- l'exotoxine A provoque une nécrose tissulaire. Elle catalyse le transfert de l'ADP-ribosyl du NAD⁺ sur le facteur d'elongation 2 qui inactive la synthèse protéique.
- l'exotoxine S ou ADP-ribosyl transférase est une enzyme qui interrompt la transduction des signaux des cellules eucaryotes, stimule la réorganisation de l'actine, inhibe la régénération tissulaire, sert de puissant mitogène pour les lymphocytes T, maintient l'infection à *P. aeruginosa* en facilitant son adhérence et est cytotoxique spécialement pour les cellules épithéliales.
- la phospholipase C hydrolyse les lécithines et stimule la libération d'IL-8 par les monocytes.
- des pigments comme la pyocyanine qui se lie au fer, inhibe la croissance d'autres bactéries et inhibe la clairance muco-ciliaire.

La survenue d'infection à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose est un tournant évolutif de la maladie. Elle va impliquer une adaptation thérapeutique de la prise en charge, le plus précocement possible. En effet, une prise en charge précoce a un effet positif sur l'évolution clinique, la fonction respiratoire, la densité bactérienne au niveau du tractus respiratoire, l'intensité de l'inflammation, la qualité de vie, l'état nutritionnel et enfin la survie (35, 38, 41, 42). La primo-colonisation est possible dès les premiers mois de vie et se produit en moyenne entre huit et dix ans (13, 36).

Les données épidémiologiques concernant les patients mucoviscidosiques colonisés/infectés par *P. aeruginosa* sont maintenant bien établies (Tableaux 3 et 4) :

- l'incidence augmente progressivement avec l'âge des patients.
- la prévalence globale varie de 48 à 67 % selon les centres mucoviscidosques.
- la prévalence des sujets colonisés/infectés par les souches mucoïdes varie de 26 à 35 % (15, 17).

Tableau 3 : Incidence des patients mucoviscidosques colonisés ou infectés par *P. aeruginosa* (35, 36).

	2 à 5 ans	26 à 30 ans
Döring et coll. (36)2000	29,8 %	81,3 %
	0 à 5 ans	25 à 34 ans
Mayaud et coll. (35)2007	11 %	74 %

Tableau 4 : Prévalence des patients mucoviscidosques colonisés ou infectés par *P. aeruginosa* (14, 15, 16, 17).

	Souches sauvages et souches mucoïdes de <i>P. aeruginosa</i>	Souches mucoïdes de <i>P. aeruginosa</i>
Miller et coll. (14)2003	60 %	Non communiqué
Lambiase et coll. (16) 2006	67 %	Non communiqué
Paschoal et coll. (17) 2007	48 %	35 %
Valenza et coll. (15) 2007	50 %	26 %

Le risque de colonisation pour *P. aeruginosa* chez ces patients est lié à des facteurs reconnus ou suspectés (35) :

- l'hospitalisation et les transmissions croisées.

- l'antibiothérapie préalable.
- l'altération de la muqueuse bronchique et de la clairance muco-ciliaire.
- les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

L'acquisition de *P. aeruginosa* est presque inéluctable car environ 90 % des patients qui ont une atteinte pulmonaire sévère ou qui décèdent sont colonisés par *P. aeruginosa* (13, 37).

Une caractéristique microbiologique de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose est l'existence de différents variants phénotypiques provenant du tractus respiratoire bien que ces patients soient colonisés par peu de génotypes différents.

Lors de la primo-colonisation, les souches sont généralement non mucoïdes et sensibles aux antibiotiques. C'est à cette période qu'une éradication au moins transitoire (quelques mois à quelques années) peut être obtenue. Une fois qu'une colonisation chronique par *P. aeruginosa* est établie, l'éradication du pathogène des voies respiratoires devient illusoire. Cette colonisation chronique se caractérise par un changement phénotypique de *P. aeruginosa*. En effet, via des phénomènes de quorum sensing, *P. aeruginosa* s'organise en structures complexes évoluant de simples microcolonies à des macrocolonies au sein d'un biofilm structuré. *P. aeruginosa* synthétise une matrice d'exopolysaccharides composée d'alginate, appelée « slime » (35). Cette synthèse est favorisée par certaines mutations du gène *CFTR* et à l'osmolalité élevée (13). Ces variants sont appelés « souches mucoïdes » et signent l'entrée en phase chronique. Ces souches peuvent communiquer entre elles et ainsi diminuer l'expression des facteurs de virulence favorisant de ce fait leur persistance avec l'hôte.

Les conséquences du changement phénotypique sont à la fois cliniques et microbiologiques. Au niveau clinique, ces souches mucoïdes deviennent résistantes à la phagocytose et à de nombreux antibiotiques par diminution de la pénétration et de l'activité bactéricide de ces derniers.

Au niveau microbiologique, ce changement phénotypique est responsable d'un changement morphologique sur les cultures. De plus, ces souches ont perdu leur mobilité et elles sont capables de persister dans un environnement défavorable.

Un autre phénotype a été mis en évidence au sein de souches de *P. aeruginosa* isolées à partir d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Ce sont les variants à petites colonies de *P. aeruginosa* (PA SCV). La détection de ces souches est associée à une altération marquée de la fonction respiratoire et à l'utilisation par inhalation des antibiotiques (39, 40). Toutes les souches de PA SCV n'ont pas la même virulence. Certaines sont capables de synthétiser un biofilm plus dense et plus stable, d'adhérer plus fortement à l'épithélium bronchique et d'être plus cytotoxique que les souches sauvages ou mucoïdes (39, 40). Ces souches surexpriment le système de sécrétion de type III, qui est un facteur de virulence majeur de *P. aeruginosa*. Ce système de sécrétion permet d'injecter directement dans le cytosol des cellules hôtes des protéines effectrices comme les exotoxines (40). Ces souches entraînent une mortalité plus importante, dans les conditions expérimentales ainsi qu'animal, que les souches sauvages ou mucoïdes. Les souches PA SCV ont une capacité à coloniser de manière persistante les voies aériennes mais présente également une résistance plus importante aux antibiotiques. Sur le plan du diagnostic bactériologique, leur détection est plus difficile.

La précocité de la reconnaissance d'une infection à *P. aeruginosa* est donc capitale pour instaurer une antibiothérapie rapide et adaptée, pour éviter ou retarder l'apparition des souches mucoïdes et pour permettre une meilleure évolution clinique et fonctionnelle. Néanmoins, la distinction entre colonisation et infection n'est pas toujours évidente, c'est pourquoi le consensus européen a défini les différents stades de colonisation ou infection à *P. aeruginosa* (Tableau 5). Cette classification permet de choisir la thérapeutique la plus adaptée.

Tableau 5 : Définition des différents stades de colonisation/infection par *P. aeruginosa* (36).

	Présence de PA dans l'arbre bronchique sans signes directs
Primo-colonisation	(fièvre, syndrome inflammatoire) ou indirects (Ac sériques) d'infection ou de lésions tissulaires.
Colonisation chronique	Présence de PA dans l'arbre bronchique pendant au moins 6 mois attesté par au moins 3 cultures positives à au moins 1 mois d'intervalle, sans signes directs ou indirects d'infection.
Infection broncho-pulmonaire	Primocolonisation associée à des signes directs ou indirects d'infection ; peut être aussi diagnostiquée par la détection d'Ac sur au moins 2 sérums chez un patient n'expectorant pas et avec des cultures négatives.
Infection broncho-pulmonaire chronique	Colonisation chronique associée à des signes directs ou indirects d'infection ; peut être aussi diagnostiquée par la détection d'Ac sur 2 sérums chez un patient n'expectorant pas et avec des cultures négatives.

3.4 Complexe *Burkholderia cepacia*

Le complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc) ou *Burkholderia sensu lato* est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobie stricte et mobile. Historiquement, il a été décrit comme un phytopathogène des bulbes d'oignons en 1950 par le professeur Burkholder. Initialement, cette bactérie était classée au sein du genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas cepacia*) mais les données phénotypiques, chimiotaخonomiques, génomiques et phylogénétiques ont permis de le reclasser en 1992 dans un nouveau genre : *Burkholderia*. Depuis 1995, l'espèce *Burkholderia cepacia* a été divisée en variétés génomiques appelées génotovars. Ce sont des souches phénotypiquement similaires mais génotypiquement différentes avec 30 à 60 % d'homologie pour les gènes codant l'ARN 16S.

A l'heure actuelle, dix sont décrit (43, 44, 46) :

- **Génomovar I** : *Burkholderia sensu stricto*
- **Génomovar II** : *Burkholderia multivorans*
- **Génomovar III** : *Burkholderia cenocepacia*
- **Génomovar IV** : *Burkholderia stabilis*
- **Génomovar V** : *Burkholderia vietnamiensis*
- **Génomovar VI** : *Burkholderia dolosa*
- **Génomovar VII** : *Burkholderia ambifaria*
- **Génomovar VIII** : *Burkholderia anthina*
- **Génomovar IX** : *Burkholderia pyrrocinia*
- **Génomovar X ou taxon K.** Il s'agit d'un nouveau génomovar décrit pour la première fois en France en 2005 (45).

Bcc est un saprophyte ubiquitaire. Il est retrouvé dans les sols et l'eau (y compris dans l'eau du robinet et l'eau distillée) et sur les plantes (oignon, blé, maïs, riz, fruits et légumes). Il est capable de survivre dans les amibes libres (*Acanthamoeba polyphaga*). Bcc est considéré comme un agent opportuniste de l'Homme et des plantes. De plus, Bcc est une bactérie d'intérêt industriel, utilisée dans l'agriculture car ce dernier produit des substances antibactériennes et antifongiques utilisées comme biodégradant des agents polluants organiques (déchets industriels et pesticides chimiques). La transmission de Bcc peut être soit inter-humaine directe (gouttelettes d'eau, personnel soignant, à l'extérieur de l'hôpital par les contacts sociaux) soit via l'environnement (nébuliseurs, survie dans les amibes libres, réservoir industriel).

La première description de la colonisation du tractus respiratoire de patients atteints de mucoviscidose par Bcc date de 1979. Depuis, l'incidence de cette colonisation n'a cessé d'augmenter dans les pays industrialisés. En France, l'incidence était en 2005 de 15,2 % avec un âge moyen de la population colonisée de $19,8 \pm 7,6$ ans. L'âge moyen d'acquisition pour les primo-colonisations observées en 2005 était de $15,8 \pm 9,3$ ans (45). La prévalence en 2005 est de 2,5 % en France (45). Les études épidémiologiques ont révélé que la prévalence des espèces *B. multivorans* et *B. cenocepacia* était la plus élevée parmi les espèces appartenant au complexe *B. cepacia*. Ces deux espèces représentent, en 2005, 86 % des colonisations par Bcc, avec une prédominance de l'espèce *B. cenocepacia* (16, 45). Le taux de mortalité lié au Bcc, en 2005, est de 7,2 % ; les décès sont associés dans la majorité des cas à *B. cenocepacia* (Tableau 6). 80 % des patients colonisés par Bcc le sont de manière chronique (45).

Tableau 6 : Données épidémiologiques françaises du complexe *Burkholderia cepacia* en 2005 (43, 45).

Génomovar	Age moyen de la primo-colonisation (ans)	Prévalence (%)	Taux de mortalité (%)
II (<i>B. multivorans</i>)	13,2	38,8	22,2
III (<i>B. cenocepacia</i>)	17,8	47,5	66,7

Enfin, il faut noter que d'autres espèces appartenant au genre *Burkholderia* peuvent coloniser les patients atteints de mucoviscidose : *B. gladioli* (4,9 % des colonisations en 2005), *B. thailandensis* (0,8 % des colonisations en 2005) et *B. fungorum* (45, 47).

Bcc possède de nombreux facteurs de virulence (43) :

- la production de sidérophores et d'hémolysine.
- la capacité de former un biofilm.

- l'existence d'un lipopolysaccharide plus toxique ayant une structure particulière du lipide A.
- la capacité d'envahir les cellules épithéliales respiratoires, d'y survivre et de s'y multiplier.

Le potentiel pathogène du Bcc au niveau du tractus respiratoire des patients mucoviscidosiques varie en fonction du génomovar :

- les souches appartenant au génomovar I sont rarement responsables de colonisation des voies respiratoires et sont essentiellement des phytopathogènes.
- les souches appartenant au génomovar II, V et VI sont associées à des infections sous forme d'épidémie avec un pouvoir pathogène moins délétère sur le plan clinique que pour le génomovar III.
- les souches appartenant au génomovar III possède un haut potentiel pathogène chez l'Homme. Il s'agit de souches hautement transmissibles (pilis codés par le gène *cbfA*). Ces souches peuvent induire l'apparition d'un « syndrome cepacia » qui associe une bactériémie à une pneumonie nécrosante. La détérioration clinique est dans ce cas rapide et fatale. Cela concerne 20 % des patients colonisés par Bcc. Il est à souligner que la présence de souches appartenant au génomovar III sont associées à une survie raccourcie de cinq ans par rapport aux patients colonisés par *P. aeruginosa*. Bcc est également associé à une mortalité plus élevée après greffe pulmonaire. La mortalité à six mois est de 33 % pour les patients colonisés par Bcc contre 8 % pour les patients non colonisés (45). La survie est diminuée à cinq ans. Seul le génomovar III est impliqué.

3.5 Autres bacilles à Gram négatif non fermentants

P. aeruginosa est le principal pathogène Gram négatif non fermentant isolé dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. De nouvelles bactéries à Gram négatif non fermentants sont en émergence depuis plusieurs années. Bien que leur implication clinique soit mal connue, leur isolement et leur identification sont très importants puisque la prise en charge du patient varie selon la bactérie isolée.

3.5.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia (SM) est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobie facultatif, non sporulé et mobile (flagelles polaires).

SM a subi plusieurs reclassements taxonomiques : au départ, il était nommé *Pseudomonas maltophilia* puis *Xanthomonas maltophilia* ; puis, en 1993, un nouveau genre a été proposé : *Stenotrophomonas* qui compte à l'heure actuelle quatre espèces. Seul SM a un intérêt médical et vétérinaire.

SM est une espèce ubiquitaire, retrouvée dans les sols, les plantes, les eaux (eau de surface, eau usée) et les aliments réfrigérés (lait de vache, de brebis ou pasteurisé). Bien que peu fréquemment, SM peut exister au niveau de la gorge, des mains et des fèces des sujets sains. La transmission inter-humaine peut être directe ou indirecte. SM est considéré comme un agent pathogène opportuniste, responsable de colonisation ou d'infections chez les patients immunodéprimés, les grands brûlés et les patients atteints de mucoviscidose (48).

Chez ces derniers, la prévalence de SM augmente depuis plusieurs années et varie de 9 à 15 % selon les études (15, 16, 17). Le plus fort taux de colonisation a été observé entre 16 et 20 ans (15).

SM est capable d'adhérer au plastique, au verre et au téflon et aussi de survivre et de se multiplier dans les solutés injectables et les liquides de dialyse tout en sécrétant une substance pyrogène de faible poids moléculaire.

Si le rôle pathogène des lipopolysaccharides de surface et des sites de fixation pour le fragment Fc des immunoglobulines est encore incertain, la virulence de SM repose sur de nombreuses enzymes (des protéases, des enzymes cytolytiques, des élastases, des lipases) et un biofilm dont la synthèse repose, comme *P. aeruginosa*, sur l'expression du gène *Alg C* qui code une phosphoglucomutase, enzyme clé pour la synthèse d'exopolysaccharides. Il est à souligner que la production de biofilm est un facteur favorisant la persistance de SM dans le tractus respiratoire et sa capacité à établir une colonisation chronique (48).

Diverses études suggèrent que SM n'était pas associé chez les patients atteints de mucoviscidose à des infections respiratoires symptomatiques. Une étude clinique récente, portant sur 89 souches de SM isolées de prélèvements respiratoires, indique que la majorité des souches sont des colonisateurs mais ne sont pas associées à des infections respiratoires significatives (48 49, 50).

Waters et coll. (48) ont étudié le potentiel immunogène de SM par rapport à *P. aeruginosa*. Ces auteurs concluent que SM contribuerait à entretenir le processus inflammatoire. En effet, SM est très immunogène et est capable d'induire l'expression d'IL-8 et donc de participer au recrutement des PNN. SM induit également une expression plus importante que *P. aeruginosa* de TNF- α . Or, ce dernier est un facteur d'activation des macrophages et des PNN qui de ce fait peuvent de part leur accumulation conduire à un processus inflammatoire responsable d'une détérioration progressive de la fonction respiratoire. Ainsi, SM augmenterait plutôt la morbidité que la mortalité (48). Toutefois, la co-colonisation de SM et *P. aeruginosa* rend difficile la détermination des rôles de chaque micro-organisme. Waters et coll. (48) suggèrent que l'éradication de SM pourrait diminuer le processus inflammatoire.

3.5.2. *Achromobacter xylosoxidans*

Achromobacter xylosoxidans (AX) est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobio, non sporulé et mobile par plusieurs flagelles.

AX est une bactérie ubiquitaire, retrouvée dans le sol et les eaux (eau du robinet, nébuliseurs, eau distillée...).

La prévalence de colonisation ou infection par AX chez les sujets mucoviscidosiques varie de 1,1 à 7 % selon les études (16, 52). L'âge moyen d'acquisition d'AX est de 20 ans, avec une durée moyenne de colonisation de 1,5 ± 0,9 ans (52). Les résultats obtenus de De Baets et coll. (52), qui ont étudié l'impact clinique des souches d'AX isolées de prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, suggèrent qu'AX serait plutôt responsable de colonisation que d'infection respiratoire sans impact sur la fonction respiratoire. Cette colonisation serait facilitée par les dommages pulmonaires préexistants. Enfin, une transmission croisée entre patients a été rapportée (52). Toutefois, des études prospectives sont nécessaires pour évaluer la prévalence et l'impact clinique des souches d'AX chez les patients atteints de mucoviscidose.

3.5.3. Autres bacilles à Gram négatif non fermentants

Le genre *Pandorea* regroupe cinq espèces différentes. Ce sont des bacilles à Gram négatif non fermentants, aérobie et mobile par un unique flagelle. Ces espèces sont retrouvées dans l'environnement (sols, eaux) et le lait en poudre. En 2005, un seul cas de colonisation du tractus respiratoire a été rapporté en France chez un patient mucoviscidosique (45).

Le genre *Ralstonia* regroupe cinq espèces. Ce sont des bacilles à Gram négatif non fermentants, aérobies et mobiles ou immobiles. Seules trois espèces sont impliquées en pathologie humaine : *R. mannitolytica*, *R. pickettii* et *R. insidiosa* ; les autres espèces sont des phytopathogènes. En 2005, six cas de colonisation du tractus respiratoire par *Ralstonia* ont été rapportés en France chez des patients mucoviscidosiques (prévalence : 4,8 %) (45). Deux espèces sont impliquées : *R. mannitolytica* et *R. pickettii*.

Le genre *Inquilinus* comprend une seule espèce : *Inquilinus limosus* (IL) décrite en 2002 (55). Seuls quelques cas de colonisation par IL ont été rapportés chez des patients atteints de mucoviscidose (53, 54, 55, 56, 57, 58). IL est un bacille à Gram négatif non fermentant, non sporulé et aérobie. Son réservoir n'a pas encore été déterminé mais il est probablement environnemental (53, 56). D'après les études de biologie moléculaire, il ne semble pas exister de transmission croisée (53, 54, 56). Les souches décrites dans les différents cas rapportés sont de nature mucoïde (53, 54, 56) et sont capables de persister plusieurs mois après la première culture microbiologique positive (53). En effet, IL produit, comme *P. aeruginosa*, deux types similaires d'exopolysaccharides chargés négativement. Cette charge négative a un rôle dans la défense de la bactérie contre le système du complément (55). L'impact clinique d'IL n'est pas connu mais selon l'étude de Schmodt et coll. (54), IL a un pouvoir invasif pouvant être à l'origine d'une réaction inflammatoire. Il est à souligner qu'IL semble être doté d'un cas d'endocardite chez un patient non mucoviscidosique (57). En raison de sa croissance lente et de son aspect mucoïde, l'identification est difficile car cette espèce peut être confondue avec d'autres bacilles à Gram négatif non fermentants comme *P. aeruginosa*. Par conséquent, sa prévalence de 2,4 % dans l'étude de Wellinghausen et coll. (53) est probablement sous estimée.

3.6. Mycobactéries non tuberculeuses

Les malades atteints de mucoviscidose constituent un groupe à risque d'infection communautaire vis à vis des mycobactéries atypiques (ou mycobactéries non tuberculeuses : MNT). Un certain nombre d'avancées techniques ont permis de mieux appréhender l'impact des MNT.

Les MNT sont des bacilles acido-alcoolo-résistant qui peuvent vivre en saprophytes chez l'Homme ou les animaux. Certaines espèces peuvent cependant provoquer chez l'Homme des infections locales ou systémiques.

La pathogénicité des MNT dans la mucoviscidose est désormais reconnue. La transmission des MNT par les réseaux d'eau sanitaire ou les aérosols n'a pas encore été démontrée (59). Des études de typage de souches par biologie moléculaire n'ont pas montré de transmission croisée entre les patients (59). La prévalence des sujets mucoviscidosiques colonisés ou infectés par une MNT est variable selon les centres et l'âge des patients. Le Bourgeois et coll. (59) ont ainsi montré que la prévalence augmente avec l'âge : 5 % avant 15 ans et 15 % après 15 ans. L'espèce la plus fréquemment isolée dans ce contexte en France est *Mycobacterium abscessus* (MA) alors qu'aux Etats-Unis, *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC) est prépondérante. MA a en plus la particularité d'être l'espèce la plus pathogène, la plus résistante aux antibiotiques et d'être capable d'infecter les patients dès les premières années de vie alors que MAC n'apparaît qu'à partir de quinze ans. La dilatation des bronches de ces malades constitue un facteur prédisposant local au développement d'une infection pulmonaire à MNT mais certaines formes familiales ou récidivantes suggèrent l'existence d'autres facteurs de susceptibilité non encore élucidés (59).

3.7. Bactéries anaérobies

Si l'existence de bactéries anaérobies, et de manière prédominante de cocci à Gram positif et de *Bacteroides* spp., a été observée au niveau des sécrétions respiratoires de patients mucoviscidosiques, leur implication physiopathologique est encore inconnue et reste à déterminer (60, 61).

4. Diagnostic bactériologique

4.1. Prélèvements

La conférence de consensus de la Société Française de Pédiatrie recommande une surveillance bactériologique régulière et adaptée dès le diagnostic de mucoviscidose. Cette surveillance repose sur la réalisation de prélèvements respiratoires, entre un et trois mois, selon l'âge et la gravité de l'atteinte respiratoire (62, 63).

Différents prélèvements bactériologiques peuvent être réalisés (62) :

- le Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA) est le prélèvement bactériologique de référence. Cependant, il s'agit d'un examen invasif, protégé même si une contamination par la flore buccale n'est pas exclue, risqué même dans les mains d'un opérateur expérimenté et pouvant nécessiter une sédation. Par ailleurs, certains broncho-fibroscopes pédiatriques ultra-fins ne disposent pas de canal opérateur et d'autres ne permettent pas la réalisation de prélèvement sur cathéter protégé, par insuffisance de diamètre du canal opérateur. Enfin, il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'un examen difficilement reproductible et plus coûteux que les autres prélèvements.
- l'obtention de sécrétion broncho-pulmonaire est plus facile et peut être optimisée par une séance de kinésithérapie respiratoire voire par la prise de broncho-dilatateurs et/ou d'un aérosol de rhDNase.

D'autres prélèvements comme un écouvillonnage oro-pharyngé (EOP), éventuellement au décours d'un effort de toux ou une aspiration naso-pharyngée (ANP) peuvent également être utilisés.

Dans la pratique clinique, l'examen cytobactérien des expectorations (ECBE) est l'analyse la plus fréquemment effectuée. D'autres types de prélèvements sont souvent utilisés chez le jeune enfant en raison de la difficulté à obtenir des expectorations spontanées. Dans ce contexte, l'ANP était utilisé de façon préférentielle alors que l'EOP était utilisé préférentiellement dans le continent Nord-Américains et en Australie (64). La validité de l'ECBE par rapport au LBA a été démontrée alors que celle des EOP est plus discutée.

Une étude prospective comparant, dans une population de patients atteints de mucoviscidose (n= 89), l'examen bactérien des sécrétions respiratoires recueillies par EOP ou ANP par rapport à l'ECBE a montré que l'EOP était fiable pour la détection bactérienne de *S. aureus* et *P. aeruginosa* mais ne l'était pas pour HI. En effet, une culture positive à *S. aureus* ou *P. aeruginosa* suite à un recueil des sécrétions respiratoires par EOP ne signifie pas une infection certaine des voies aériennes inférieures mais une culture négative évoque que le risque d'infection est peu probable (64). Toutefois, cette technique de prélèvement n'a pas été évaluée pour la recherche de micro-organismes rares (Bcc, SM, AX...) chez les jeunes enfants mucoviscidiques. De plus, l'EOP ne permet pas un dénombrement des colonies bactériennes qui est une mention légale.

Enfin, Liebermann et coll. (65) a comparé l'ANP et l'EOP chez 300 adultes non mucoviscidiques, pour l'identification de trois bactéries : HI, *Streptococcus pneumoniae* et *Branhamella catarrhalis*. Les résultats ont montré qu'il n'existe pas de différence significative de sensibilité pour la détection de HI entre les deux techniques alors que l'ANP est plus sensible pour la détection de *Streptococcus pneumoniae* et que l'EOP est plus sensible pour la détection de *Branhamella catarrhalis*.

En conclusion, l'ECBE reste le prélèvement non invasif de choix. L'EOP est une méthode simple de recueil des sécrétions, non invasive et facilement répétable mais son interprétation doit se faire avec précaution. Des études incluant un plus grand nombre de sujets sur une durée plus longue que les études antérieures sont nécessaires afin de définir la place de l'EOP.

4.2. Examens bactériologiques

4.2.1 Examen direct et mise en culture

Le laboratoire doit être informé du statut mucoviscidosique du patient afin d'utiliser un protocole d'identification de tous les pathogènes significatifs et d'en étudier la sensibilité aux antibiotiques.

Un examen direct après coloration de Gram est réalisé afin de dénombrer les cellules épithéliales, les polynucléaires neutrophiles et la flore bactérienne présente (Figure 9). Si de nombreux cocci à Gram négatif sont observés, un milieu supplémentaire (gélose au sang cuit) estensemencé pour la recherche de *Branhamella catarrhalis*.

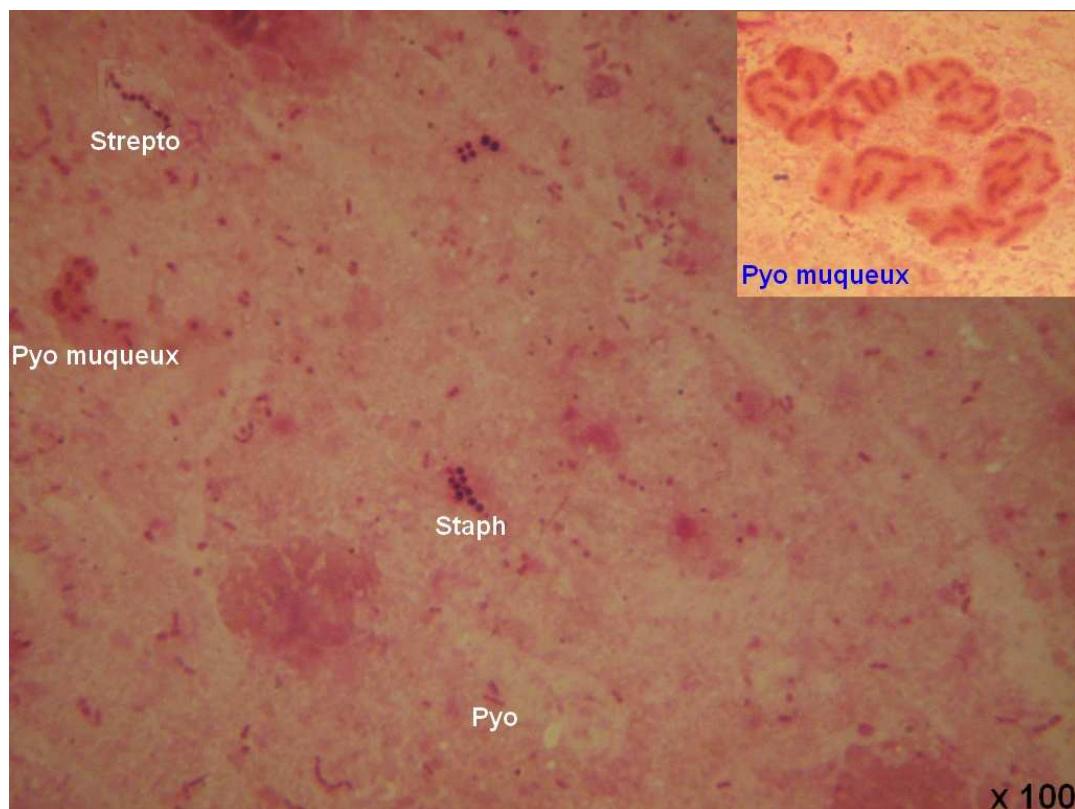


Figure 9 : Examen direct d'une expectoration.

Il est recommandé d'utiliser des milieux spécifiques pour la recherche des différentes espèces bactériennes isolées lors de mucoviscidose (Tableau 7) (11, 62, 63). Un dénombrement doit être réalisé pour permettre la détection d'au moins 10^2 UFC/mL (UFC = unité formant des colonies). Les milieux doivent être incubés pendant 24 à 72 heures avec une première observation à 24 heures. Dans l'état actuel des connaissances, la recherche de mycobactéries ne semble pas devoir être systématique en dehors d'un contexte clinique particulier.

Tableau 7 : Milieux d'ensemencement recommandés pour la détection et l'identification des principales espèces bactériennes pathogènes isolées chez les patients mucoviscidosiques (36, 63).

Bactéries	Milieux recommandés par le consensus européen
<i>Haemophilus influenzae</i>	Gélose au sang cuit supplémenté de facteurs de croissance ou gélose <i>Haemophilus</i> ^{®*}
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose au mannitol ou gélose au sang supplémenté ou non en acide nalidixique*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose sélective (gélose cétrimide ^{®*})
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gélose sélective (BCSA [®] , gélose <i>cepacia</i> ^{®*})
Mycobactérie atypique	Gélose Löwenstein-Jensen ^{®*}
Autres bactéries à Gram positif	Gélose au sang additionné ou non d'acide nalidixique *
Autres bactéries à Gram négatif	Gélose MacConkey

* = milieux utilisés au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy

4.2.2. Identification bactérienne

Au cours de la mucoviscidose, la connaissance de l'écologie bactérienne des patients est primordiale pour permettre une prise en charge thérapeutique optimale.

4.2.2.1. Haemophilus influenzae

Le genre *Haemophilus* comprend des bactéries à croissance difficile car elles nécessitent des milieux de culture qui apportent le facteur X et/ou le facteur V. Le facteur X entre dans la composition des enzymes respiratoires contenant du fer (cytochromes, cytochrome oxydase, catalase, peroxydase). Le facteur V est une co-enzyme de la déshydrogénase (66, 67). *Haemophilus influenzae* (HI) exige à la fois le facteur X et le facteur V pour croître. La gélose Haemophilus® contient ces deux facteurs mais ne permet pas de faire le diagnostic d'espèce.

La présence d'*Haemophilus* est évoquée devant la présence de colonies sur le milieu Haemophilus® et l'absence de colonies sur la gélose lactosée. En effet, la gélose lactosée n'apporte aucun des facteurs nécessaires à leur croissance. Les souches capsulées donnent après incubation des colonies muqueuses, assez grosses (3 mm) alors que les souches non capsulées donnent des colonies plus petites, convexes ou plates et grisâtres (Figure 10). En cas de doute, une coloration de Gram pourra être réalisée à partir des colonies et montrera des petits bacilles à Gram négatif.

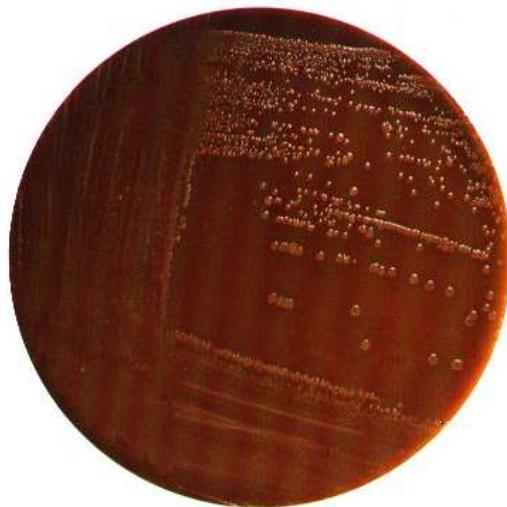


Figure 10 : Aspect des colonies d'*Haemophilus influenzae* non capsulées sur la gélose Haemophilus®.

Outre les caractères culturaux, l'identification de HI repose en grande partie sur la recherche de l'exigence en facteur V et X. Plusieurs méthodes sont utilisables. Au laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy, la méthode des disques imprégnés de facteur V, X ou X + V est utilisée. Pour cela, une suspension bactérienne est ensemencée par inondation sur un milieu Mueller-Hinton après dépôt des trois disques. Le milieu de culture est incubé pendant 24 heures à 37°C sous une atmosphère enrichie en CO₂. HI se caractérise par une exigence en facteur V et en facteur X, ce qui explique l'aspect de satellitisme observé uniquement autour du disque X + V (Figure 11).

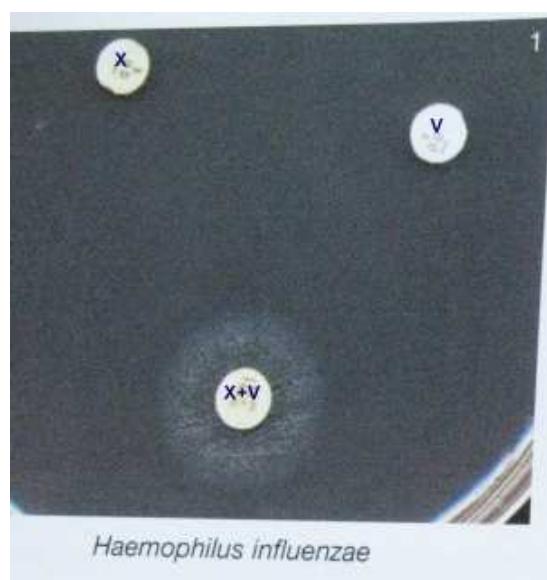


Figure 11 : Aspect de satellitisme autour du disque X +V de *H. influenzae*.

Ce diagnostic peut être confirmé en cas de nécessité par l'utilisation de système d'identification biochimique (carte Vitek® NH).

Une recherche de bêta-lactamase est systématiquement effectuée par une technique chromogénique (disque de nitrocéfine).

4.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

a) Souches de phénotype normal

La présence de *Staphylococcus aureus* est évoquée sur l'aspect des colonies. Les colonies de *S. aureus* sont grosses (2 à 3 mm de diamètre), lisses, blanches ou jaunes. De plus, *S. aureus* réalise une hémolyse bêta sur le milieu au sang (66, 67). En cas de doute, une coloration de Gram confirmera la présence de cocci à Gram positif en amas et la recherche de catalase sera positive sur les milieux de culture sans sang

En pratique courante, l'identification de *S. aureus* repose sur la fermentation du mannitol (milieu chapman[®]), la mise en évidence d'une DNase ou d'une coagulase et la positivité d'un test d'agglutination spécifique (Slidex[®] : mise en évidence du facteur d'affinité pour le fibrinogène (clumping factor), de la protéine A et de polysaccharides capsulaires de *S. aureus*).



Figure 12 : Aspect des staphylocoques à coagulase négative (à gauche) et de *S. aureus* (à droite) sur un milieu Chapman[®]: *S. aureus* fermente le mannitol contenu dans le milieu ce qui se traduit par un changement de coloration du milieu (indicateur de pH : rose → jaune).

Si les critères d'identification précédemment décrits ne sont pas réunis, une identification reposant sur l'étude des caractères biochimiques est réalisé par exemple à l'aide de l'automate Vitek® 2 (carte vitek® 2 GP) ou de galeries Api ID 32 Staph® (bioMérieux).

Un test biochimique rapide (Rapidec® Staph de bioMérieux) basé sur la recherche d'une enzyme spécifique de SA peut également être réalisé. Cette méthode, dont la sensibilité et la spécificité sont supérieure à 99 %, est basée sur la recherche de l'auréase, enzyme protéolytique de la coagulation. Cette enzyme réagit avec la prothrombine pour former un complexe appelé staphylothrombine qui clive un peptide fluorescent. Après quatre heures d'incubation à 37°C, une lecture est effectuée à la lumière ultra-violette (UV). En présence de *S. aureus*, une fluorescence jaune est observée.

b) SA SCV

A la coloration de Gram, les SA SCV apparaissent sous forme de cocci à Gram positif en amas et ne se distinguent par d'autres staphylocoques dorés.

Les milieux de culture les plus favorables pour la croissance des SA SCV sont ceux enrichis au sang (gélose au sang, gélose au sang cuit). Certains auteurs ont montré l'intérêt de l'utilisation de milieux sélectifs enrichis avec d'autres facteurs de croissance comme par exemple la gélose chromID™ *S. aureus* (SAID, bioMérieux) pour la reconnaissance des SA SCV (33). La croissance apparaît en 24 à 72 heures et nécessite souvent une incubation en atmosphère enrichie en CO₂ voire en atmosphère anaérobiose.

Sur la gélose au sang (Négram®), les colonies des SASCV sont dites « naines » car elles sont dix fois plus petites que celles de *S. aureus* de phénotype normal (Figure 13).



Figure 13 : Aspect des colonies de SA SCV (en haut) et de *S. aureus* de phénotype normal (en bas) sur gélose Columbia®.

Ces colonies ne sont plus hémolytiques à l'inverse des souches normales (bêta hémolyse). Par ailleurs, les colonies de SA SCV sont blanches à l'inverse des colonies typiques de *S. aureus* qui produisent un pigment jaune-doré. En effet, chez les souches de SA SCV, la biosynthèse des caroténoïdes, responsables de la coloration jaune-doré, est altérée en raison de l'interruption du transport des électrons (21, 22).

L'utilisation des sucres est modifiée en ce qui concerne les souches de SA SCV. En effet, ces souches ne fermentent plus ou peu le lactose, le mannitol et le turanose mais utilisent le glucose et le fructose comme source d'énergie (18, 20, 21, 22). Les SA SCV ne réduisent plus les nitrates et utilisent le N-acétylglucosamine. Alors que la catalase peut être faussement négative, le test d'agglutination au latex (Slidex®) est positif. Chez SA SCV, l'activité de la coagulase est diminuée et peut faire croire à une réaction faussement négative. En effet, la coagulase devient positive après 24 heures d'incubation à 37°C contre 3 à 4 heures chez *S. aureus* de phénotype normal.

L'identification et la réalisation de l'antibiogramme par des systèmes automatisés (Vitek® 2, bioMérieux) ou à l'aide des galeries miniaturisées (Api 32 Staph®, bioMérieux) est difficile voire impossible pour les SA SCV car leur croissance lente ne permet pas de détection optique. Il est à noter que les souches de SA SCV sont typiquement résistantes à la méticilline et aux aminosides, y compris à la gentamicine (18, 21, 22).

4.2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

La présence de *Pseudomonas aeruginosa* est évoquée d'après leur odeur (seringa) et l'aspect des colonies sur les milieux utilisés (66, 67). Sur le milieu lactosé, les colonies sont plates et extensives, à bord irrégulier, avec un aspect métallique. Pour les souches pigmentées (environ 95 % des souches), la pigmentation verte est caractéristique de *P. aeruginosa*. Cette pigmentation résulte de la combinaison de deux pigments : la pyoverdine (pigment jaune-vert non spécifique) et pyocyanine (un pigment bleu hydrosoluble spécifique de *P. aeruginosa*). Sur le milieu cétrimide®, les colonies ont le même aspect mais présentent une pigmentation spontanée vert-pâle et une fluorescence verte sous UV. Il est à souligner que les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* ont un aspect différent : les colonies sont gélatineuses, lisses et apigmentées aussi bien sur le milieu cétrimide® (Figure 14) que sur la gélose lactosée. De plus, ces souches ne développent plus d'odeur caractéristique.



Figure 14 : Aspect des colonies mucoïdes de *P. aeruginosa* sur milieu Cétralimide®.

L'identification de l'espèce est en suite basée sur la recherche de la production d'une oxydase (*P. aeruginosa*: oxydase positive), la détermination du caractère non fermentant (par exemple à l'aide du milieu Kligler®) et l'étude des autres caractères biochimiques (par exemple à l'aide de galeries Api 20 NE® ou de carte d'identification Vitek® 2 BN).

La détection et la quantification des anticorps anti-*P. aeruginosa* sont également utilisées pour la surveillance et le suivi des primo-colonisations et des infections à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose. Cette méthode a été principalement utilisée pour caractériser le passage à l'infection chronique. Des études récentes ont mis en évidence l'apparition parfois précoce, avant le premier isolement en culture, des anticorps anti-*P. aeruginosa* en particulier les anticorps dirigés contre l'exotoxine A (41, 42). Ces résultats dépendent des techniques et des préparations antigéniques utilisées qui nécessiteraient une standardisation en raison de l'hétérogénéité des kits commercialisés. La sérologie est utile chez les patients dont les cultures restent négatives pour la recherche de *P. aeruginosa*. Une sérologie positive associée à une culture négative doit faire réfléchir à la mise en place ou non d'une prise en charge thérapeutique. La recherche des précipitines de *P. aeruginosa* par immuno-électrophorèse bidimensionnelle peut aider à la distinction entre colonisation chronique et infection chronique. En effet, la présence de plus de deux arcs de précipitation est en faveur d'une infection chronique.

La Société Française de Pédiatrie recommande une surveillance sérologique tous les 3 à 4 mois chez les patients dont les cultures restent négatives (62).

4.2.2.4. Complexe *Burkholderia cepacia*

Les bactéries appartenant au complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc) sont des bacilles à Gram négatif non fermentants dont la croissance lente nécessite au moins deux jours d'incubation des milieux de culture à 37°C. La présence de Bcc est évoquée sur l'aspect des colonies sur le milieu Cépacia® et la gélose lactosée (66, 67). Ce sont des petites colonies de 1 à 2 mm de diamètre, transparentes faisant virer le milieu Cépacia® au rose (Figure 15). De plus, les colonies de Bcc ont une odeur caractéristique d'oignons (cepia signifie en latin oignon).



Figure 15 : Aspect des colonies du complexe *B. cepacia* sur la gélose cépacia®.

De même que pour *P. aeruginosa*, l'identification de Bcc repose sur la recherche d'une production d'oxydase, la détermination du caractère non fermentant et l'étude des autres caractères biochimiques (Vitek® 2, Api 20 NE®). Il est à souligner que pour les espèces appartenant au complexe *B. cepacia* le caractère oxydase positif est lent à apparaître.

En cas de problème d'identification, le diagnostic bactériologique de Bcc par biologie moléculaire (ARN 16 S) doit être réalisé.

4.2.2.5. Autres bacilles à Gram négatif non fermentants

La méthodologie pour l'identification des autres bacilles à Gram négatif non fermentants retrouvés lors de la mucoviscidose est similaire à celle utilisée pour *P. aeruginosa* et *B. cepacia* (66, 67).

Comme pour les espèces appartenant au complexe *B. cepacia*, l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentants n'est pas toujours facile et nécessite parfois d'avoir recours aux techniques de biologie moléculaire qui est d'ailleurs indispensable pour identifier certaines espèces comme par exemple *Inquilinus*. *Limosus* et les espèces appartenant au genre *Pandoreae*.

4.2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des différentes bactéries isolées est en général réalisée selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (68).

En dehors des méthodes par diffusion en gélose (disques, E-test), les antibiogrammes peuvent être réalisés à l'aide de systèmes semi-automatisés comme par exemple le système Vitek® 2. Néanmoins, il est à souligner que ce système est moins adapté pour les souches de *P. aeruginosa* isolées dans la mucoviscidose et n'est pas validé pour les autres bacilles à Gram négatifs non fermentants.

Il est à noter que pour *H. influenzae*, un antibiogramme n'est pas systématiquement réalisé. En effet, les souches de HI sont généralement sensibles aux antibiotiques (béta-lactamines, aminosides, fluoroquinolones) et les souches résistantes à l'ampicilline par production de bêta-lactamase sont recherchées à l'aide d'un disque de nitrocéfline. Ces souches restent sensibles à l'association aminopénicillines - inhibiteur de bêta-lactamase.

4.2.4. Difficultés et limites du diagnostic bactériologique

4.2.4.1. liées aux prélèvements

A l'exception des écouvillons oro-pharyngés, l'analyse des prélèvements respiratoires repose d'abord sur un examen direct (coloration de Gram). Il permet d'évaluer la qualité du prélèvement selon les critères microscopiques habituels c'est à dire le rapport entre le nombre de PNN et le nombre de cellules épithéliales buccales ainsi que la flore bactérienne présente (63).

Les prélèvements respiratoires contaminés par la salive sont caractérisés par l'existence de nombreuses cellules épithéliales bucco-pharyngées (Figure 16), et d'une flore de type salivaire, polymorphe et composée de staphylocoques à coagulase négative, streptocoques oraux, de corynèbactéries, de levures et d'autres bactéries de la flore buccale. La contamination salivaire rend l'interprétation des résultats difficile et la détections des variants à petites colonies de *S. aureus* aléatoire.

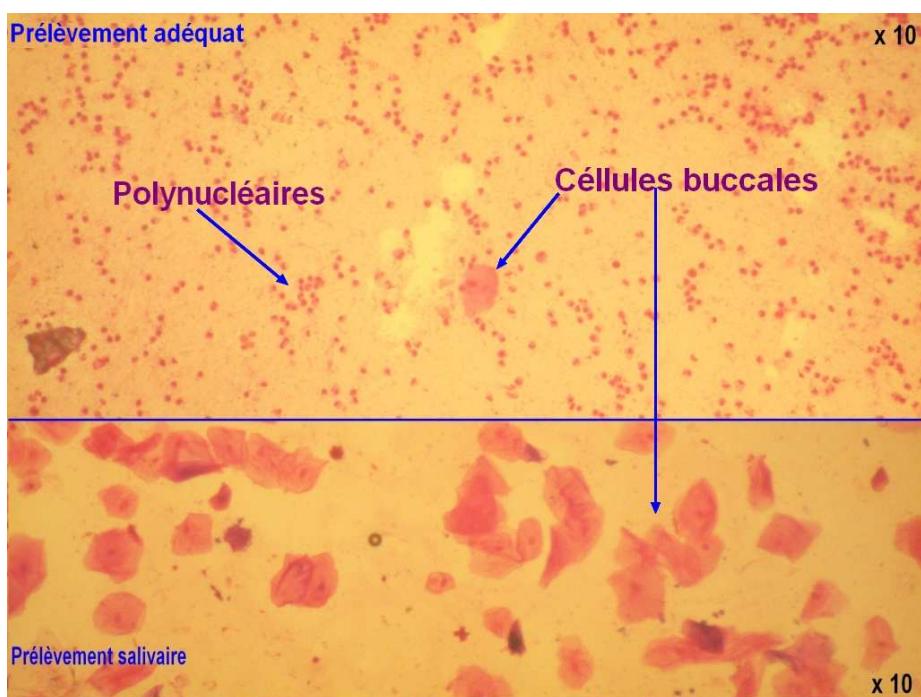


Figure 16 : Exemple d'un examen direct (coloration de Gram) :

- prélèvement respiratoire adéquat (en haut).
- prélèvement respiratoire salivaire (en bas).

4.2.4.2. Liées à l'identification

L'identification des bactéries d'intérêt repose, généralement, sur l'utilisation de techniques phénotypiques classiques. Ces méthodes sont cependant parfois insuffisantes pour certaines bactéries qui ont perdu leurs caractères biochimiques et structuraux classiques, comme en particulier certains bacilles à Gram négatif non fermentants et certaines souches de *S. aureus*, isolées au niveau du tractus respiratoires des patients mucoviscidosiques.

Ainsi, l'identification des variants à petites colonies de *S. aureus* est particulièrement difficile. Cet aspect sera traité dans le chapitre B.

Pour ce qui concerne les bacilles à Gram négatif non fermentants, Ferroni et coll. (69) ont montré que 4 % des souches de bacilles à Gram négatifs non fermentants isolés chez des patients atteints de mucoviscidose, étaient mal identifiées à l'aide des techniques phénotypiques conventionnelles (galeries Api 20 E[®]) : 75% de ces souches ont donné un profil inconnu et 25 % une identification erronée. L'erreur la plus fréquente était l'identification de *B. cepacia* au lieu de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* ou *A. xylosoxidans*, sachant que toutes ces souches étaient résistantes à la colistine. Plusieurs hypothèses expliquant ce nombre non négligeable d'erreurs d'identification ont été évoquées (69) :

- 89 % des patients porteurs d'une souche atypique sont traités par de fortes doses d'antibiotiques en aérosol (tobramycine et/ou colistine). Or, cette antibiothérapie a pu sélectionner des mutants métaboliquement déficients possédant un haut niveau de résistance aux antibiotiques.
- Il a été montré qu'une incubation prolongée augmentait la proportion de bactéries déficientes. Or, dans cette étude, les souches atypiques ont été isolées après 72 heures d'incubation.
- L'utilisation de milieux sélectifs tel que le milieu *cepacia*[®] qui contient de la colistine augmenterait l'isolement de souches atypiques (*A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* et les rares souches de *P. aeruginosa* résistants à la colistine).

D'autres auteurs ont rapporté des fréquences d'erreur d'identification variant de 4 à 50 % pour l'espèce *B. cepacia*, *S. maltophilia* et *A. xylosoxidans* (70, 71, 72, 73, 74). Des études américaines ont montré des résultats similaires. Une première étude impliquant 115 centres de mucoviscidose aux Etats-Unis, montre que 11 % des isolats identifiés comme *B. cepacia* n'en étaient pas mais appartenaient à l'espèce *Burkholderia gladioli* ou aux genres *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* ou *Achromobacter* (72). La seconde étude américaine portant sur 49 centres de mucoviscidose a montré que 11 % des souches identifiées comme *A. xylosoxidans* appartenaient principalement à l'espèce *P. aeruginosa* (73).

4.2.4.3. Liées à l'antibiogramme

Des difficultés peuvent être rencontrées lors de la réalisation de l'antibiogramme. Elles concernent principalement les variants à petites colonies de SA et les bacilles à Gram négatif non fermentants.

L'antibiogramme des SA SCV ne peut pas être réalisé selon les recommandations standards du CA-SFM. En effet, le milieu recommandé (milieu de Mueller-Hinton) pour l'antibiogramme d'un *S. aureus* de phénotype normal ne peut être utilisé puisque ces souches ne cultivent pas sur ce milieu. Il faut utiliser soit un milieu Mueller-Hinton au sang ou mieux une gélose au sang (TSS®). L'incubation doit se faire en atmosphère enrichie en CO₂ voire sous atmosphère anaérobie afin d'obtenir une croissance optimale.

Les antibiogrammes des bacilles à Gram négatif non fermentants posent des difficultés de lecture et d'interprétation et en particulier les souches mucoïdes de *P. aeruginosa*. Dans ce cas, la lecture ne peut être faite qu'après 48 heures d'incubation et nécessite une lecture attentive des diamètres d'inhibition. Par ailleurs, il est à noter que l'interprétation des différents phénotypes de résistance chez *P. aeruginosa* multirésistant est très difficile du fait de l'accumulation des mécanismes de résistances chez ces souches - en particulier isolées de patients mucoviscidosiques - et du nombre important des clones qui peuvent être isolées chez un même patient.

La recherche des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et/ou des carbapénémases même si elle est possible est difficile à envisager pour les souches de *P. aeruginosa* isolées dans la mucoviscidose. Enfin, la corrélation entre l'activité *in vitro* des molécules testées et leur activité *in vivo* n'est pas toujours vérifiée.

5. Antibiothérapie

Lors de mucoviscidose, l'inflammation et les infections entretiennent un cercle vicieux et sont responsables de la dégradation pulmonaire. Ces éléments ont justifié l'élaboration de recommandations centrées sur les stratégies thérapeutiques à visée respiratoire s'intégrant dans une prise en charge globale de la maladie.

5.1. Particularités pharmacocinétiques des patients atteints de mucoviscidose

La posologie des antibiotiques et la durée du traitement doivent être adaptées à la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et aux caractéristiques pharmacocinétiques des patients mucoviscidosiques (62). Ainsi, le volume de distribution est augmenté et la demi-vie d'élimination est raccourcie. L'augmentation de l'élimination rénale et non rénale nécessite des doses élevées d'antibiotiques. De plus, ces caractéristiques sont encore modifiées par l'état nutritionnel du patient et par la gravité de la maladie. Aussi les posologies préconisées par la plupart des équipes spécialisées restent mal définies et correspondent rarement à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) des produits.

5.2. Traitement des principales bactéries impliquées dans la mucoviscidose

5.2.1. *Haemophilus influenzae*

Le traitement et l'éradication de HI est habituellement "facile", ce qui explique pourquoi il n'y a pas de consensus sur le traitement de HI (11, 13). Il repose en première intention sur l'amoxicilline et pour les souches possédant une bêta-lactamase sur l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique.

Toutefois, d'autres molécules peuvent être utilisées comme la ciprofloxacine, l'azithromycine ou la clarithromycine.

5.2.2. *Staphylococcus aureus*

En raison du risque lié à la prévalence croissante des *S. aureus* résistants à la méticilline (SAMR), la mise en oeuvre de mesures d'hygiène strictes est indispensable. En France, 9,2 % des patients atteints de mucoviscidose sont porteurs de SAMR en 1999 (62).

5.2.2.1. Antibioprophylaxie primaire

La prophylaxie primaire se pose à l'heure du dépistage néonatal. Aujourd'hui, l'antibioprophylaxie primaire n'est pas recommandé chez le nourrisson et l'enfant atteint de mucoviscidose car elle expose à une colonisation à *P. aeruginosa* plus fréquente et plus précoce (62).

5.2.2.2. Traitement des exacerbations

Le traitement des infections à *S. aureus* sensibles à la méticilline (SAMS) repose en première intention sur l'administration *per os* d'une bêta-lactamine, comme l'amoxicilline, la cloxacilline ou l'oxacilline, associé ou non à l'acide fusidique, pendant une durée d'au moins 14 jours (62).

En cas d'allergie à la pénicilline, les patients peuvent bénéficier d'un traitement par rifampicine – acide fusidique, sachant que ces molécules ne doivent pas être utilisées en monothérapie.

En cas d'infection concomitante avec HI, l'association amoxicilline – acide clavulanique est proposée.

Toutefois, la persistance de SAMS au-delà de 14 jours fait discuter selon l'état clinique un traitement prolongé de 1 à 3 mois sans qu'il n'existe de règles précises.

Le traitement des infections à SAMR (*S. aureus* résistant à la méticilline) repose en première intention sur la bithérapie pristinamycine – rifampicine. Les alternatives comprennent les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) et le linézolide (AMM pour les patients de plus de 18 ans).

Le traitement des infections à SA SCV proposé est l'association rifampicine – acide fusidique (62).

Le traitement des infections mixtes à *S. aureus* et *P. aeruginosa* repose sur l'utilisation d'antibiotiques actifs sur les deux bactéries.

5.2.2.3. Antibioprophylaxie secondaire

L'antibioprophylaxie secondaire a pour but d'éviter la réapparition rapide de la symptomatologie respiratoire.

L'antibioprophylaxie secondaire des SAMS repose sur une monothérapie continue (oxacilline, cloxacilline, minocycline chez l'adulte et l'enfant de plus de 8 ans) pendant 1 à 3 mois. Le linézolide peut être une alternative (62).

L'antibioprophylaxie secondaire des SAMR n'est pas clairement définie. Les nébulisations de vancomycine ne sont pas recommandées et l'antiothérapie alternée séquentielle n'est pas validée. L'association rifampicine – acide fusidique semble intéressante mais doit être validée (62).

5.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

L'objectif est de retarder le plus possible le passage à la chronicité.

La prophylaxie primaire repose essentiellement sur des mesures d'hygiène.

La nécessité du traitement de la primo-colonisation n'est pas discutée mais il n'existe aucun consensus international validant le protocole le plus adapté. La Société Française de Pédiatrie propose l'association de deux antibiotiques bactéricides (ex : ceftazidime, tobramycine), par voie intraveineuse pendant 14 à 21 jours, suivis ou non d'aérosols de colistine pendant 3 à 6 mois (62). Le protocole danois est proposé comme alternative par la Société Française de Pédiatrie bien qu'il y ait des biais méthodologiques. Il se déroule en trois étapes :

- **Etape 1** : association pendant 21 jours de ciprofloxacine *per os* (30 mg/kg par jour en deux prises) et d'aérosols de colistine (1 million d'unités deux fois par jour).
- **Etape 2** : si *P. aeruginosa* est isolé plus d'une fois en 6 mois, il est proposé d'associer pendant 21 jours la ciprofloxacine *per os* à la même dose et des aérosols de colistine à 2 millions d'unités trois fois par jour.
- **Etape 3** : si *P. aeruginosa* est isolé pour la troisième fois dans les 6 mois, il préconise d'associer pendant 3 mois la ciprofloxacine *per os* (même dose que précédemment) et des aérosols de colistine (2 millions d'unités trois fois par jour).

Le traitement des infections chroniques a pour but de diminuer l'inoculum bactérien, d'espacer les exacerbations et de ralentir la dégradation de la fonction respiratoire.

Le traitement des exacerbations repose sur une bithérapie par voie intraveineuse associant une bêta-lactamine (ceftazidime, ticarcilline associé ou non à l'acide clavulanique, pipéracilline associé ou non au tazobactam, imipénème) à la tobramycine. Cependant, le choix des antibiotiques devra tenir compte de l'antibiogramme et des réponses thérapeutiques antérieures.

En présence de souches multirésistantes, une trithérapie (non validée) peut être instaurée en associant aux bithérapies précédemment décrites la ciprofloxacine *per os*. L'utilisation par voie intraveineuse de colistine peut également être envisagée dans cette situation (62).

Le traitement systématique programmé de l'infection chronique par les antibiotiques inhalés est une alternative aux cures intraveineuses tous les trois mois et a été validé. La Société Française de Pédiatrie propose l'utilisation de la tobramycine en aérosol par cure de 28 jours suivi de 28 jours sans traitement. Ce schéma est possible dès l'âge de 6 ans avec une posologie de 300 mg deux fois par jour pendant 96 semaines.

Enfin, il faut noter que l'azithromycine a un intérêt dans le traitement des infections chronique par son pouvoir bactéricide mais également par ces propriétés anti-inflammatoires (62). Toutefois, la poursuite du traitement doit être réévaluée tous les 3 mois en raison du manque de recul pour cette molécule.

5.2.4. Complex *Burkholderia cepacia*

Les souches de Bcc sont des bactéries très résistantes aux antibiotiques. Ces résistances sont principalement dues à la production d'enzymes inactivantes mais il existe des mécanismes non enzymatiques comme les pompes à efflux et la perméabilité sélective (44). Ces bactéries sont naturellement résistantes à la ticarcilline (associé ou non à l'acide clavulanique), l'imipénème, les quinolones, le chloramphénicol, le triméthoprime, la fosfomycine et la colistine (68). Il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus sur le traitement des souches de Bcc. Il faudra évidemment tenir compte de l'antibiogramme et des réponses thérapeutiques des patients.

Cependant, plusieurs équipes ont étudié la sensibilité aux antibiotiques des souches de Bcc isolés chez des patients atteints de mucoviscidose.

Middleton et coll. (75) ont étudié l'effet de la tobramycine en aérosol sur quatre patients atteints de mucoviscidose. Les résultats étaient encourageants puisque Bcc a été éradiqué chez trois patients sur quatre.

Zhou et coll. (76) ont étudié la sensibilité de 18 antibiotiques sur 2621 souches de Bcc isolées chez 1257 patients mucoviscidosiques. Les résultats de leur étude ont montré que les molécules les plus actives étaient le méropénème (26 % de souches sensibles), la minocycline (38 % de souches sensibles) et la ceftazidime (23 % de souches sensibles).

Aaron et coll. (77) ont étudié l'effet *in vitro* de la combinaison de 1 à 3 antibiotiques (choix parmi 15 antibiotiques) sur 119 souches de Bcc isolées chez 51 patients atteints de mucoviscidose. Ces auteurs ont observé que la trithérapie à forte concentration associant le méropénème (32 µg/mL), la ceftazidime (32 µg/mL) et la tobramycine (200 µg/mL) avait un plus fort pouvoir bactéricide (bactéricidie observée chez 93 % des souches).

Lekkas et coll. (78) ont étudié l'effet de cures de témocilline chez 20 patients atteints de mucoviscidose dans une étude rétrospective de 10 ans. Une amélioration des paramètres cliniques et respiratoires a été observée dans 56 % des cures, ce qui correspondait à 13 patients sur 20. Bien que la témocilline soit une molécule peu toxique, bien tolérée et ne favorisant pas la production de β -lactamases, les patients étaient aussi traités avec de la tobramycine, ce qui empêche d'exclure un effet synergique entre ces deux molécules.

En conclusion, les traitements disponibles des souches de Bcc restent limités. Il devient indispensable de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour tenter d'éradiquer les souches du Bcc.

5.2.5. Autres bactéries

Il n'existe pas de consensus pour le traitement antibiotique de ces bactéries. Par conséquent, la prise en charge devra tenir compte de la clinique, de l'antibiogramme et des données de la littérature.

Il n'existe pas de stratégie codifiée pour le traitement des bacilles à Gram négatifs non fermentants autres que *P. aeruginosa* et *B. cepacia*. De plus, ce sont des bactéries multirésistantes par des mécanismes innés et acquis rendant leurs traitements difficiles et limités.

S. maltophilia est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : l'amoxicilline, la ticarcilline, la pipéracilline, les céphalosporines de première et deuxième génération, le céfotaxime, l'imipénème, le triméthoprime et la fosfomycine (68).

Gabriel et coll. (51) ont étudié la sensibilité de 10 molécules sur 955 souches de SM isolées à partir de prélèvements respiratoires de 673 patients atteints de mucoviscidose. Ces auteurs ont montré que la doxycycline (80 % des souches inhibées) était la molécule la plus active et que la colistine à forte concentration (200 µg/mL) a été efficace sur 87 % des souches étudiées. Les études de synergie ont montré que les associations ciprofloxacine ou cotrimoxazole associé à la ticarcilline – acide clavulanique étaient les plus efficaces avec un effet bactéricide vis à vis des souches étudiées de 65 et 64 % respectivement (51).

I. limosus est une bactérie de découverte récente. Il existe peu de données sur cette bactérie. Chiron et coll. (56) ont étudié la sensibilité de cinq souches isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. IL n'était sensible qu'à trois antibiotiques parmi les 20 molécules testées : l'imipénème, la ciprofloxacine et la rifampicine.

Pour ce qui concerne les MNT, la stratégie antibiotique varie suivant l'espèce en cause :

- Le traitement de *M. avium* doit comporter de la clarithromycine ou de l'azithromycine. Ces molécules ne doivent jamais être utilisées en monothérapie car elles induisent systématiquement l'apparition de résistance et doivent de ce fait être associée à la rifampicine ou à la rifabutine et à l'éthambutol (59). Le traitement doit être prolongé pendant 12 mois après la négativation bactériologique.
- Le traitement de *M. abscessus* est particulièrement difficile car il s'agit d'une bactérie très résistante. Le schéma initial comporte une bithérapie intraveineuse (imipénème ou céfoxitine associé à l'amikacine) associé à deux antibiotiques oraux (clarithromycine ou azithromycine associé à l'éthambutol) pendant au moins quatre semaines. Le schéma classique est de traiter 12 mois après la négativation bactériologique par une bithérapie orale (59).

B. EVALUATION D'UN MILIEU CHROMOGENE POUR LA DETECTION DES SOUCHES DE SA SCV

Les variants à petites colonies de *S. aureus* se caractérisent par une croissance lente et des modifications morphologiques et métaboliques.

Afin d'obtenir une croissance optimale des SA SCV, des milieux enrichis au sang (gélose au sang, gélose au sang cuit) ont été recommandés (63). En cas de contamination par la flore salivaire, la croissance lente et la petite taille des colonies, même sur gélose au sang supplémenté d'acide nalidixique rendent leur détection difficile sur ces milieux.

D'autres milieux plus sélectifs, supplémentés avec d'autres facteurs de croissance et un mélange chromogène (gélose chromID™ *S. aureus* [SAID, bioMérieux], gélose CHROMagar® Staph aureus, Mast Diagnostica) permettent *a priori* une détection plus aisée de ces souches à partir des prélèvements respiratoires obtenus chez les patients mucoviscidosiques. En effet, ces milieux permettent de se départir, du moins en partie, de la flore salivaire tout en facilitant la mise en évidence des souches de *S. aureus* par le biais d'une détection chromogénique.

En effet, sur milieu non chromogénique, l'aspect des colonies de SA SCV (colonies blanches de très petite taille) peut être confondu avec celui d'autres bactéries telles que les staphylocoques à coagulase négative, les corynéturbines ou les levures, qui font partie de la flore salivaire. A l'heure actuelle, l'utilisation des milieux sélectifs est de ce fait recommandée (63).

Kipp et coll. (33) ont comparé les performances des deux milieux chromogènes précédemment décrits à celles de quatre autres milieux conventionnels (gélose au sang Columbia®, gélose trypticase soja, milieu de Chapman® et milieu de Baird Parker).

En comparant la croissance de différentes souches (préalablement en culture pure) de SA SCV et de *S. aureus* de phénotype normal après 24 à 72 heures d'incubation sur ces différents milieux, ces auteurs ont montré que les performances du milieu SAID® (sensibilité : 92 % à 24 h, 98 % à 48 et 72 h) étaient légèrement inférieures à celles observées avec la gélose au sang (sensibilité : 97 % à 24 h, 100 % à 48 et 72 h) mais supérieures à celles des autres milieux testés incluant la gélose CHROMagar® Staph aureus (sensibilité : 49 % à 24 h, 89 % à 48 h et 94 % à 72 h) (33).

Aucune évaluation des performances diagnostiques du milieu SAID® après mise en culture des sécrétions respiratoires de patients, *a fortiori* de patients mucoviscidosiques, n'a été effectuée du moins à ma connaissance.

Ceci m'a conduit à évalué les performances de ce milieu, et de le comparer à un milieu gélosé au sang supplémenté en acide nalidixique (gélose Négram®), dans le cadre de l'activité bactériologique de routine concernant les analyses respiratoires des patients mucoviscidosques

1. Matériels et méthodes

1.1. Prélèvements respiratoires

L'ensemble des prélèvements respiratoires des patients mucoviscidosques suivis au CRCM de Nancy et adressés pour analyse bactériologique dans notre laboratoire ont été inclus dans l'étude : 122 prélèvements respiratoires consécutifs (dont 88 expectorations et 34 écouvillons oro-pharyngés) obtenus chez 108 patients du 30 août 2007 au 25 octobre 2007.

1.2. Analyse des prélèvements respiratoires

Après ensemencement des deux milieux, ceux-ci ont été incubés à 37°C et observés à 24 et à 48 heures. La sélectivité du milieu SAID® est due à la présence d'un mélange sélectif – dont la composition n'est pas précisée par le fabricant – qui permet d'inhiber la plupart des bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* ainsi que les levures.

La détection des SA SCV était basée sur l'aspect morphologique des colonies ; les colonies suspectes étaient les suivantes : colonies petites, blanches, et non hémolytiques sur gélose Négram® et colonies petites et vertes sur gélose SAID®. La gélose SAID® contient deux substrats chromogènes dont un est spécifique de *S. aureus* et qui permet la mise en évidence de l'alpha-glucosidase bactérienne.

1.3. Identification de SA SCV

A partir des colonies suspectes, une réaction d'immuno-agglutination au latex (Slidex®) a été réalisée. En cas de réaction positive, ces colonies sont dénombrées et ensemencées sur une gélose au sang pour identification.

Cette identification a été réalisée dans un premier temps en se basant sur les critères d'identification suivants : absence de croissance sur le milieu de Chapman®, présence d'une coagulase après 24 h d'incubation et absence d'une DNase. L'identification d'espèce a été systématiquement confirmée par un test rapide (Rapidec® Staph) et par l'étude d'autres caractères biochimiques à l'aide de la carte GP Vitek® 2 (bioMérieux) et de la galerie Api ID 32 Staph® (bioMérieux).

1.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée sur gélose au sang (TSS®) par la méthode de diffusion avec disques. En raison de la croissance lente de ces souches, l'antibiogramme ne peut pas être effectué sur l'automate Vitek®.

Par ailleurs, cette étude a été effectuée selon les recommandations du CA-SFM à l'exception du milieu gélosé utilisé et des conditions d'incubation. En effet, l'absence de croissance des souches de SA SCV sur le milieu Mueller-Hinton, habituellement recommandé pour la réalisation des antibiogrammes pour *S. aureus*, a nécessité d'avoir recours à une gélose au sang (TSS[®]). De plus, contrairement aux souches de *S. aureus* de phénotype normal, la lecture des antibiogrammes de SA SCV a nécessité une incubation de 48 h (au lieu de 18 – 24 heures) sous atmosphère enrichie en CO₂ ou anaérobies (au lieu d'une atmosphère aérobie).

2. Résultats

Sept souches de SA SCV ont été détectées chez 5 des 108 patients à partir des expectorations (Tableau 8). L'âge moyen de ces derniers était de 22,8 ans (19 – 29,1 ans). Pour les deux patients chez lesquelles des souches de SA SCV avaient été isolées à deux reprises, il est à souligner que ces dernières présentaient le même antibiotype.

Tableau 8 : Caractéristiques des cinq patients colonisés par SA SCV.

Patients	Age (ans)	Présence de cocci à Gram positif en amas à l'examen direct	Présence de <i>S. aureus</i> de phénotype normal	Dénombrement (UFC/mL)	
				GN	SAID
1	21,5	+	oui	5.10 ⁶	5.10 ³
		+	non	5.10 ⁵	3.10 ³
2	29,1	+	non	-	3.10 ³
		+	oui	-	5.10 ³
3	23,2	+	oui	-	10 ⁶
4	21,8	+	oui	-	10 ⁶
5	19	+	non	-	2.10 ⁴

GN = gélose Négram[®], SAID = *S. aureus* Identification[®]

Quatre patients étaient co-colonisés par SA SCV et une souche de *S. aureus* de phénotype normal et un seul patient par SA SCV et *P. aeruginosa*. Chez tous les patients, la présence de staphylocoques a été observée à l'examen direct. Cependant, tous les prélevements étaient contaminés par la salive.

Les sept souches de SA SCV ont été isolées sur le milieu SAID® après 24 heures d'incubation à 37°C et une seule souche a été détectée à deux reprises sur gélose Négram® chez un patient.

Toutes les souches avaient une faible activité catalasique et produisaient une coagulase détectée après 24 heures d'incubation. Parmi les sept souches de SA SCV isolées, deux produisaient une DNase dont l'expression était cependant faible. Pour les autres souches, la production de DNase n'a pu être mise en évidence. La croissance de toutes les souches étaient faibles sur le milieu Chapman®. La fermentation du mannitol n'a pas été mise en évidence pour six des sept isolats de SA SCV. Pour une souche, une fermentation partielle du mannitol a été observée. Toutes les souches ont été identifiées par le test d'identification rapide (Rapidec® Staph).

Cinq souches sur sept ont été identifiées à l'aide des galeries Api ID 32 Staph® et trois seulement à l'aide de l'automate Vitek® 2. Ceci peut s'expliquer du moins en partie par la durée d'incubation plus longue des galeries Api ID 32 Staph® (incubation prolongée pendant 48 heures) que celle des cartes Vitek® 2 GP (≤ 10 heures). Il est à souligner que la souche 3 n'a correctement été identifié ni par la carte Vitek 2 GP ni par les galeries Api ID 32 Staph®.

Six souches étaient résistantes à la méticilline, sept à la gentamicine, trois aux fluoroquinolones, deux à l'acide fusidique et une à la minocycline. Toutes les souches sont sensibles à la pristinamycine et à la rifampicine (Tableau 9).

Tableau 9 : Caractéristiques des souches SA SCV isolées chez les cinq patients.

Souches	Hémolyse	Catalase	Slidex®	Coagulase	DNase	Mannitol	Identification biochimique		Sensibilité aux antibiotiques								
							Vitek® 2 (bioMérieux)	Api ID 32 Staph® (bioMérieux)	Rapidec® Staph	Méticilline	Gentamicine	Pristinamycine	Rifampicine	Acide fusidique	Minocycline	Fluoroquinolones	
1	-	(+)	+	+	-	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	R	R	S	S	S	S	R	
2	-	(+)	+	+	-	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	R	R	S	S	S	R	R	
3	-	(+)	+	+	(+)	-	<i>S. lugdudensis</i>	<i>S. hominis</i>	+	R	R	S	S	S	ND	R	
4	-	(+)	+	+	(+)	-	Non identifié	Non identifié	+	R	R	S	S	S	S	S	
5	(+)	(+)	+	+	-	±	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	+	R	R	S	S	S	S	S	
6	-	(+)	+	+	-	-	Non identifié	<i>S. aureus</i>	+	R	R	S	S	S	S	S	
7	-	(+)	+	+	-	-	Non identifié	<i>S. aureus</i>	+	S	R	S	S	S	S	S	

(+) = faible, ND = non déterminé, R = résistant, S = sensible

C. ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE RETROSPECTIVE DES RESULTATS BACTERIOLOGIQUES EN 1997 ET EN 2007

Le but de ce travail était d'étudier et de comparer les flores bactériennes respiratoires chez les patients mucoviscidosiques suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Nancy en 1997 et en 2007. Nous avons calculé la prévalence des principales bactéries impliquées dans la mucoviscidose (*Haemophilus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, complexe *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*), et déterminé l'âge des « primo-détections » de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*. Nous avons également comparé la résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* isolées en 1997 et 2007.

1. Méthodes

J'ai réalisé une étude rétrospective des données bactériologiques obtenues après analyse des prélèvements respiratoires effectués chez les patients du CRCM de Nancy en 1997 (n = 148) et en 2007 (n = 227). Ces données ont été extraites de la base de données du laboratoire de bactériologie à l'aide du logiciel Bactério® (Infopartner®).

La prévalence de chacune des bactéries est représentée par le pourcentage des patients chez lesquels ces dernières ont été isolées au moins une fois au cours de l'année.

Nous avons également réalisé une analyse comparative de la sensibilité aux antibiotiques pour *S. aureus* et *P. aeruginosa* en 1997 et en 2007.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statmed®. En fonction des caractéristiques des populations étudiées, les tests suivants ont été utilisés : test du Khi-2, test de t non pairé, test de Mann et Whitney et test de Fisher. Le seuil de significativité retenu était $P < 0,05$.

2. Résultats

2.1. Patients

Les caractéristiques des patients suivis au CRCM de Nancy en 1997 et en 2007 sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Caractéristiques des patients mucoviscidosiques en 1997 et en 2007.

	1997 (n = 148)	2007 (n= 227)	P
Age (ans), moyenne ± écart-type (extrêmes)	13,9 ± 7,1 (0,9 – 32,5)	16,7± 10,9 (0,1 – 63,6)	0,002*
Nombre de patients de sexe masculin (%)	76 (51,3)	108 (47,6)	NS**

* Test t non pairé, ** test de Fisher

2.2. Prélèvements respiratoires

En 2007, 4 prélèvements respiratoires ont été effectués en moyenne par patient et par an (au lieu de 3 en 1997) (Tableau 11) ce qui s'explique en grande partie par la prise en compte des recommandations publiées en 2002 sous l'égide de la Société Française de Pédiatrie.

Tableau 11 : Prélèvements respiratoires réalisés en 1997 et en 2007.

	1997	2007	P
Nombre total de prélèvements respiratoires	421	917	
Nombre de prélèvements par patients et par an : moyenne ± écart-type (extrêmes)	3 ± 1,9 (1 – 15)	4 ± 2,8 (1 – 17)	< 0,0001*

* Test de Mann et Whitney

En 2007, la répartition des types de prélèvements respiratoires réalisés était la suivante : 776 expectorations, 125 écouvillons oro-pharyngés, 10 aspirations bronchiques, 2 lavages broncho-alvéolaires, 2 prélèvements distaux protégés et 2 brossages bronchiques. En 1997, 414 expectorations ou aspirations naso-pharyngées (analyses non différenciées à cette date dans la base de données du laboratoire de bactériologie) et 7 aspirations bronchiques ont été réalisées.

2.3. Prévalence des principales espèces bactériennes isolées

Le nombre total de souches isolées en 1997 et en 2007 étaient respectivement de 1212 et 1184. La répartition des souches isolées en fonction des espèces est présentée dans le tableau suivant (Tableau 12).

Tableau 12 : Répartition des souches bactériennes isolées en 1997 et en 2007.

	Nombre de souches isolées (%) en	
	1997 (n = 1212)	2007 (n= 1184)
<i>Haemophilus</i> spp.	318 (26,2)	342 (28,9)
<i>S. aureus</i>	198 (16,3)	314 (26,5)
Variants à petites colonies	1 (0,08)	9 (0,7)
<i>P. aeruginosa</i>	348 (28,7)	347 (29,3)
Souches mucoïdes	147 (12,1)	183 (15,5)
Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	79 (6,5)	31 (2,6)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2 (0,17)	18 (1,5)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11 (0,9)	17 (1,4)
Autres bacilles à Gram négatif non fermentants	17 (1,4)	13 (1,1)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	33 (2,7)	10 (0,8)
Entérobactéries	25 (2)	35 (3)

Haemophilus spp., *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont les principales espèces bactériennes isolées à partir des sécrétions respiratoires des patients mucoviscidosiques aussi bien en 1997 qu'en 2007 (Tableaux 12 et 13).

Tableau 13 : Prévalence des principales bactéries en 1997 et en 2007.

Bactéries	Nombre de patients colonisés par les principales espèces bactériennes (%) en		<i>P</i>
	1997	2007	
<i>Haemophilus</i> spp.	105 (70,9)	148 (65)	NS*
<i>S. aureus</i>	86 (58,1)	132 (58,1)	NS*
Variants à petites colonies	1 (0,7)	5 (2,2)	NS*
<i>P. aeruginosa</i>	67 (45,2)	83 (36,5)	NS*
Souches mucoïdes	44 (29,7)	57 (25,1)	NS*
Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	14 (9,5)	5 (2,2)	0,002**
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2 (1,4)	7 (3)	NS
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5 (3,3)	7 (3)	NS
Autres bacilles à Gram négatif non fermentants	13 (8,8)	11 (4,8)	NS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	21 (14,1)	11 (4,8)	0,002**
Entérobactéries	14 (9,5)	19 (8,4)	NS
Mycobactéries atypiques	0 (0)	2 (0,9)	-

* = test de *khi-2*, ** = test de Fischer

Pour l'ensemble des espèces bactériennes isolées, à l'exception de celles appartenant au complexe *B. cepacia* et *Streptococcus pneumoniae*, la fréquence des patients colonisés par chacune d'entre elles n'était pas significativement différente en 1997 et en 2007. Le nombre de patients colonisés par Bcc en 2007 était significativement inférieur à celui observé en 1997.

En 1997, le complexe *B. cepacia* a été isolé 79 fois chez 14 patients dont l'âge moyen était de 14,4 ans (2,3 – 23,5 ans).

En 2007, le complexe *B. cepacia* a été isolé 31 fois chez 5 patients dont l'âge moyen était de 22,8 ans (17,6 – 25,3 ans). Ces souches appartenaient au génotype III (*B. cenocepacia*).

Une colonisation par *S. aureus* et *P. aeruginosa* a été observée chez 29 patients (19,6 %) en 1997 et chez 45 patients (19,8 %) en 2007. Parmi ces derniers, un seul était également colonisé par une souche de SA SCV.

En 1997, 9 patients colonisés par le complexe *B. cepacia* l'étaient également par *P. aeruginosa*. En 2007, une co-colonisation par Bcc et *S. aureus* était observée chez 4 patients. Parmi ces derniers, un patient était également colonisé par *P. aeruginosa* et un autre par *Inquilinus limosus*.

En 2007, deux mycobactéries non tuberculeuses ont été isolées chez deux patients : *Mycobacterium avium intracellulare* chez un patient âgé de 11 ans et *Mycobacterium gordonaiae* chez une patiente âgée de 21,2 ans.

2.4. Sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*

Je me suis limité à l'étude de la sensibilité de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*, qui correspondent, parmi les principales espèces isolées, à celles pour lesquelles une antibiothérapie codifiée a été définie et qui présentent des profils variables de résistance aux antibiotiques.

2.4.1. *S. aureus*

Parmi l'ensemble des souches de *S. aureus* isolées, 12,2 % (n = 198) et 27,4 % (n = 314) étaient résistantes à la méticilline respectivement en 1997 et en 2007.

La fréquence des patients porteurs de *S. aureus* résistant à la méticilline (SAMR) en 1997 (13,9 %, n= 86/148 patients) n'était pas significativement différente de celle observée en 2007 (15,9 %, n= 132/227 patients) (test de Fisher, p > 0,05).

Pour l'ensemble des souches pour lesquelles un antibiogramme a été réalisé, nous avons observé une diminution significative de la sensibilité à l'érythromycine, la lincomycine, le cotrimoxazole, la rifampicine et l'acide fusidique entre 1997 et 2007 (Tableau 14).

Tableau 14 : Sensibilité des souches de *S. aureus* aux principales familles d'antibiotiques en 1997 et en 2007.

Antibiotiques	1997 (n = 150)	2007 (n = 146)	<i>P</i>
	% de souches résistantes	% de souches résistantes	
Gentamicine	4,6	4,8	NS**
Erythromycine	28,7	80,1	< 0,0001*
Lincomycine	14,7	37,7	< 0,0001*
Pristinamycine	0	2,1	NS**
Fluoroquinolone	19,5	26	NS*
Cotrimoxazole	0	3,4	0,02**
Rifampicine	3,4	19,2	< 0,0001*
Acide fusidique	3,4	19,2	< 0,0001*
Minocycline	1,4	0,7	NS**

* Test de *khi-2*, ** test de Fischer

2.4.2. *P. aeruginosa*

Entre 1997 et 2007, la résistance de l'ensemble des souches de *P. aeruginosa* pour lesquelles un antibiogramme a été effectué a significativement augmenté pour la pipéracilline – tazobactam, la ceftazidime et l'imipénème. Par contre, nous avons observé une diminution significative de la résistance pour la tobramycine (Tableau 15).

Tableau 15 : Sensibilité des souches de *P. aeruginosa* aux principales familles d'antibiotiques en 1997 et en 2007.

Antibiotiques	1997(n = 244)	2007 (n = 347)	<i>P</i>
	% de souches résistantes	% de souches résistantes	
Pipéracilline -tazobactam	30,8	58	< 0, 0001*
Ceftazidime	37,7	57	< 0, 0001*
Imipénème	36,5	58,5	< 0, 0001*
Tobramycine	43,5	31,7	0,003*
Ciprofloxacine	40	42,7	NS*
Colistine	0	0,3	NS**

* = test de khi-2, ** = test de Fischer

2.3. « Primo-détection »

La primo-colonisation se définit par la présence de la bactérie dans l'arbre bronchique sans signes directs (fièvre, syndrome inflammatoire) ou indirects (anticorps sériques) d'infections ou de lésions tissulaires. En l'absence de données cliniques, il nous a été impossible de calculer l'âge exact de la primo-colonisation en respectant cette définition. J'ai donc calculé l'âge moyen de la « primo-détection » - qui peut correspondre à une primo-colonisation ou à une primo-infection - pour *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Le calcul de l'âge du premier isolement de *S. aureus* et *P. aeruginosa* a uniquement pu être réalisé pour 89 patients (nés à partir de 1996) car notre base de données ne s'étendait pas au-delà de 1996.

Pour *S. aureus*, l'âge moyen de la "primo-détection" chez 68 patients colonisés ou infectés était de 1,6 an (0,1–9,3 ans).

Parmi les 89 patients, 38 étaient colonisés ou infectés par *P. aeruginosa*. L'âge moyen de "primo-détection" était de 3,2 ans (7 jours – 11,1 ans).

.

D) Discussion

La prévalence des patients colonisés ou infectés par des souches de *S. aureus* en 2007 est similaire à celle observée en 1997 (58,1 % en 1997 versus 58,1 % en 2007).

La prévalence des patients colonisés ou infectés par les souches de SA SCV est relativement faible en 2007 (2,2 %) et légèrement supérieure à celle observée en 1997 (0,7 %) bien que non significativement différente. La prévalence des souches de SA SCV est semblable à celle rapportée par d'autres auteurs (24,26). Il est à souligner que parmi les cinq patients colonisés ou infectés par les souches de SA SCV (en 2007), tous étaient déjà suivis en 1997 au CRCM de Nancy. En 2007, quatre d'entre eux étaient également colonisés ou infectés par des souches de *S. aureus* de phénotype normal. Le seul patient connu pour être colonisé par une souche de SA SCV en 1997 l'était toujours en 2007. Parmi les quatre autres patients porteurs de souches de SA SCV en 2007, un n'était pas colonisé ou infecté par *S. aureus* en 1997 alors que les trois autres étaient colonisés soit par un SAMR ($n = 2$) soit par un SAMS ($n = 1$). Ces trois souches ne présentaient pas un antibiotype typique de SA SCV et étaient en particulier toutes sensibles à la gentamicine. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure l'existence en 1997 d'une co-colonisation par une souche de SA SCV qui n'aurait pas alors été détecté en raison d'une méthode de détection *a priori* moins sensible (gélose lactosée) et d'une recherche non systématique. Seul un patient était colonisé à la fois par *P. aeruginosa* et SA SCV ce qui pourrait être dû à la production de HQNO par cette souche de *P. aeruginosa* (23).

L'utilisation du milieu SAID[®] a permis de détecter relativement facilement des souches de SA SCV. La détection de ces souches SA SCV semble plus facile que sur la gélose Négram[®] en raison d'un pouvoir sélectif plus important du milieu SAID[®] et donc de la moindre contamination de ce dernier par les espèces bactériennes de la flore salivaire. L'utilisation de ce milieu est également rendu plus facile par le caractère chromogénique de la détection des SA SCV. En effet, sur ce milieu, les colonies de SA SCV, bien que plus petites, développent une coloration verte typique identique à celle observée pour les souches de *S. aureus* de phénotype normal.

A la suite des travaux de Kipp, mon étude confirme l'intérêt potentiel du milieu SAID® en routine. Néanmoins, le faible nombre de patients porteurs de SA SCV détecté dans mon étude, en relation avec la prévalence relativement faible connue des SA SCV chez les patients mucoviscidosiques, ne permet pas de conclure en termes de performances diagnostiques de ce milieu dans le cadre des analyses de routine. Il est donc nécessaire de poursuivre cette étude localement voire de l'élargir à d'autres centres afin d'inclure un plus grand nombre de patients. L'utilisation actuelle du milieu SAID® au laboratoire de bactériologie de Nancy a permis depuis la fin de la présente étude de détecter deux autres patients porteurs de SA SCV. Certains auteurs ont montré la réversibilité du phénotype des SA SCV (18, 19, 25). Dans mon étude, ce caractère a été observé pour l'une des souches isolées (souches numéro 5) pour laquelle une fermentation partielle du mannitol a été objectivée après le premier repiquage. Ce phénomène peut expliquer, du moins en partie, la difficulté de la détection des SA SCV au laboratoire. Par ailleurs, les conséquences de ce caractère *in vivo* sont encore mal connues.

Pour ce qui concerne l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus*, j'ai observé en 2007 par rapport à 1997 une augmentation de la résistance des souches de *S. aureus* à l'érythromycine, la lincomycine, les fluoroquinolones, la rifampicine et à l'acide fusidique sans modification du pourcentage de résistance à la gentamicine, à la pristinamycine et à la minocycline.

Prunier et coll. (79) ont étudié la sensibilité de 122 souches de *S. aureus* isolées de patients mucoviscidosiques entre 1997 et 1999 et ont observé des taux de résistance à l'oxacilline, la gentamicine, l'érythromycine, l'ofloxacine et de rifampicine de respectivement 13 %, 6 %, 53 %, 27 % et 32 %. Par rapport aux chiffres observés en 1997 au CHU de Nancy, ces taux sont similaires pour l'oxacilline et la gentamicine mais plus élevés pour ce qui concerne les trois autres antibiotiques. Néanmoins, en 2007, les taux de résistance observés au CHU de Nancy pour ces trois derniers antibiotiques ont augmenté de manière significative tout particulièrement pour l'érythromycine pour laquelle un taux de résistance de 80,1 % a été trouvé.

Cette augmentation de la résistance à l'érythromycine peut être due à la présence de méthylase, d'un mécanisme d'efflux mais également à des modifications des cibles ribosomales à la suite de mutations au niveau des gènes structuraux correspondants (80, 81). Ce dernier mécanisme est très fréquemment retrouvé chez les souches isolées chez les patients mucoviscidosiques et particulièrement chez les souches « hypermutantes », ce caractère étant fortement prédominant chez les SA SCV thymidine-dépendante. Dans cette perspective, il est à souligner que l'ensemble des SA SCV de notre étude étaient résistantes à l'érythromycine. La forte prévalence de souches hypermutantes peut être la conséquence de l'utilisation de l'azithromycine, utilisé pour le traitement de *P. aeruginosa* en raison de ces propriétés bactéricide mais surtout anti-inflammatoires. Dans mon étude, la présence de mutations des gènes codant les cibles ribosomales reste à être confirmée afin d'étayer cette hypothèse et avant d'effectuer des études destinées à évaluer l'association entre la présence de ces souches et l'utilisation de l'azithromycine.

Pour ce qui concerne les autres espèces bactériennes isolées dans mon étude, je n'ai pas mis en évidence de différence significative en termes de prévalence d'espèces entre 1997 et 2007, sauf pour ce qui concerne le complexe *B. cepacia* et *S. pneumoniae*. Pour ce dernier, la diminution de la prévalence observée en 1997 et 2007 est probablement en lien avec la vaccination anti-pneumococcique systématique des enfants mucoviscidosiques. En 1997, la prévalence des patients colonisés par le complexe *B. cepacia* au CRCM de Nancy était nettement plus élevée (9,5 %) que la moyenne nationale (2,7 %) (45). En 2007, cette prévalence (2,2 %) a fortement baissé au CHU de Nancy et est désormais similaire à celle observée au niveau national. La mise en place de mesures préventives strictes et efficaces dont le but est d'éviter au maximum les contaminations croisées entre les patients (hygiène, isolement du patient, matériels médicaux individuels et à usage unique...) ont certainement permis d'aboutir à ce résultat encourageant.

Sans avoir de données cliniques nous permettant de distinguer la primo-colonisation de la primo-infection, l'âge moyen du premier isolement de *P. aeruginosa* chez les patients suivis au CRCM de Nancy semble être très précoce (3,2 ans). En effet, l'âge de la primo-colonisation par *P. aeruginosa* se situe peu avant l'âge de dix ans (13). Cette observation est à confirmer et à comparer avec des données épidémiologiques récentes nationales et internationales.

Pour ce qui concerne la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*, j'ai observé entre 1997 et 2007 une augmentation globale de la résistance aux bêta-lactamines, une stabilité de la résistance aux fluoroquinolones et une diminution de la résistance à la tobramycine. Cette évolution reste à être confirmée étant donné que l'utilisation de cet antibiotique par voie locale est plutôt connue comme étant un facteur favorisant l'apparition de souches résistantes à la tobramycine. Perry et coll. (82) ont récemment montré que l'utilisation de milieux conventionnels incluant les milieux sélectifs commercialisés ne permet pas de détecter les clones les plus résistants avec une sensibilité suffisante. Ceci peut donc conduire à une sous-estimation du taux de résistance de certains antibiotiques comme en particulier la tobramycine. Ce biais méthodologique ne peut pas être exclu dans notre étude même s'il paraît peu probable étant donné que la sensibilité aux antibiotiques est étudiée au laboratoire de bactériologie sur des « pools » de colonies de *P. aeruginosa* ce qui a d'ailleurs permis d'objectiver une augmentation de la résistance aux bêta-lactamines.

D. CONCLUSION

L'analyse épidémiologique a permis de confirmer la prépondérance d'*Haemophilus* spp., *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Mon étude a mis en évidence une augmentation globale de la résistance aux antibiotiques de *S. aureus*, plus particulièrement aux macrolides, entre 1997 et 2007. Cette tendance peut être expliquée à la fois par une pression de sélection des antibiotiques, en particulier de l'azithromycine, et par l'existence de plus en plus fréquente de souches « hypermutantes » présentant ou non un caractère auxotrophe. Ceci souligne l'importance d'une bonne détection des souches résistantes aux antibiotiques et plus particulièrement des sous population de SA SCV. Dans cette perspective, cette étude souligne l'intérêt potentiel du milieu SAID® dont il reste à évaluer les performances en routine sur un plus grand nombre de patients.

Pour ce qui concerne *P. aeruginosa*, nous avons observé une augmentation globale de la résistance aux bêta-lactamines associée à une stabilité de la résistance aux fluoroquinolones. La diminution de la résistance à la tobramycine des souches de *P. aeruginosa* reste cependant à être confirmée par des études ultérieures.

Enfin, si nouveaux bacilles à Gram négatif non fermentants comme par exemple *Pandoreae* sp, *Inquilinus limosus* dont les implications cliniques ne sont pas encore élucidées émergent, la prévalence des patients colonisés ou infectés par les espèces appartenant au complexe *B. cepacia* a significativement diminué au CRCM de Nancy, probablement en relation avec l'application rigoureuse et globale des mesures d'hygiène.

Ce travail souligne l'importance pour le laboratoire de bactériologie de pouvoir disposer de méthodes de détection performantes et adaptées à l'étude de la flore bactérienne impliquée dans la colonisation voire l'infection des voies respiratoires chez les patients mucoviscidiosques. Une surveillance épidémiologique régulière est nécessaire afin de détecter de nouvelles tendances évolutives aussi bien en termes de répartition des espèces que de résistance aux antibiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 168 :918-951.
2. Romey M.C. Caractérisation fonctionnelle de mutants *CFTR* naturels : intérêt pour la mucoviscidose. *Ann. Biol. Clin.* 2006, 64:429-38.
3. Amaral M.D. et Kunzelmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Pharmacol. Sci.* 2007, 28 :334-341.
4. Hubert D. Mucoviscidose. *Encycl. Med. Chir., Pneumologie*, 6-031-A-20, 2005, p. 34-41.
5. Observatoire national de la mucoviscidose. 2006.
6. Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés. Prise en charge de la mucoviscidose en affection de longue durée. Points de repères 2007, 7:1-11.
7. Storni V., Claustres M., Chinet T. et Ravilly S. Diagnostic de la mucoviscidose. *Arch. Pédiatr.* 2001, 8 : 818-832.
8. Durieu I. et Nove Josserand R. La mucoviscidose en 2008. *Rev. Med. Int.* 2008, 19 :1-7.
9. Munck A., Sahler C., Briard M., Vidailhet M. et Farriaux J.P. Mucoviscidose : organisation du dépistage néonatal français, premiers résultats enregistrés. *Arch. Pédiatr.* 2005, 12 :646-649.
10. Wang L. et Freedman S.D. Laboratory tests for the diagnosis of cystic fibrosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002, 117:109-115.

11. Döring G., Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J. Cyst. Fibros.* 2004, 3:67-91.
12. Chmiel J.F. et Davis P.B. Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir. Res.* 2003, 4:1-12.
13. Mariani-Kurdjian P., Bingen E. Bactéries pathogènes dans la mucoviscidose. *Arch. Pédiatr.* 2003, 10:342-346.
14. Miller M.B., Gilligan P. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:4009-4015.
15. Valenza G., Tappe D., Turnwald D., Frosch M., König C., Hebestreit H. et Abele-Horn M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J of Cyst. Fibros.* 2007, 7:123-127.
16. Lambiase A., Raia V., Del Pezzo M., Sepe A., Carnovale V. et Rossano F. Microbiology of airway in a cohort of patients with cystic fibrosis. *BMC Infect. Dis.* 2006, 6 4.
17. Paschoal I.A., de Oliviera Villalba W., Silvia Bertuzzo C., Cerqueira E.M. et Corso Pereira M. Cystic fibrosis in adults. *Lung* 2007, 185:81-87.
18. Proctor R.A., Kahl B., von Eiff C., Vaudaux P.E., Lew D.P. et Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin. Infect. Dis.* 1998, 27:68-74.
19. Brouillet E., Martinez A., Boyll B.J., Allen N.E. et Malouin F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variant under antibiotic pressure in vivo. *Immun. Med. Microbial.* 2004, 41:35-41.

20. Von Eiff C., Peters G. et Becker K. The small colony variant concept. The role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Int. J. Care injured* 2006, 37:26-33.
21. Proctor A.R., Peters G. Small-colony variants en staphylococcal infection: diagnostic and therapeutic implication. *Clin. Infect. Dis.* 1998, 27:419-423.
22. Vaudaux P., Kelley W.L. et Lew D.P. *Staphylococcus aureus* small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 43: 968-970.
23. Hoffman L.R., Déziel E., D'Argenio D.A., Lépine F., Emerson J., McNamara S., Gibson R.L., Ramsey B.W. et Miller S.I. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103:19890-19895.
24. Kahl B. C., Duebbers A., Lubritz G., Haeberle J., Koch H.G., Ritzerfeld B., Reilly M., Harms E., Proctor R. A., Herrmann M. et Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airway of cystic fibrosis patients during a six years prospective study. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41: 4424-4427.
25. Moisan H., Brouillette E., Lebau Jacob C., Langlois-Bégin P., Michaud S. et Malouin F. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* 2006, 188:64-76.
26. Bésier S., Smaczny C., von Mallinckrodt C., Kahl A., Ackermann H., Brade V., Wichelhaus T.A. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45:168-172.

27. Kahl B.C., Herrmann M., Schulze Everding A., Koch H.G., Becker K., Harms E., Proctor R.A. et Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 1998, 177:1023-1029.
28. Boulanger D., Bureau F. et Lekeux P. Invasion intracellulaire des cellules non phagocytaires par *Staphylococcus aureus*. *Ann. Méd. Vet.* 2006, 150:27-42.
29. Vaudaux P., François P., Bisognano C., Kelley W.L., Lew D.P., Schrenzel J., Proctor R.A., McNamara P.J., Peters G. et von Eiff C. Increased expression of clumping factor and fibronectin binding protein by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect. Immun.* 2002, 70:5428-5437.
30. Jarry T.M. et Cheung A.L. *Staphylococcus aureus* escapes more efficiently from phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect. Immun.* 2006, 74 :2568-2577.
31. Kahl B., Belling G., Becker P., Chatterjee I., Wardecki K., Hilgert K., Cheung A.L., Peters G. et Herrmann M. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small colony variants are associated with extensive alteration in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect. Immun.* 2005, 73:4119-4126.
32. Sifri C.D., Baresch-Bernal A., Calderwood S.B. et von Eiff C. Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect. Immun.* 2006, 74:1091-1096.
33. Kipp F., Kahl B.C., Becker K., Baron E.J., Proctor R.A., Peters G., von Eiff C. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J. Clin. Micro.* 2005, 43: 1956-1959.

34. Von Eiff C., Heilmann C., Proctor R.A., Woltz C., Peters G. et Götz F. A site-directed *Staphylococcus aureus* hem B is a small colony variant which persists intracellularly. J. Bacteriol. 1997, 179:4706-4712.
35. Mayaud C., Group ECRIR. *Pseudomonas* et bronches. Méd. Mal. Infect. 2007, 37:300-304.
36. Döring G., Conway S.P., Heijerman H.G.M., Hodson M.E., Hoiby N., Smyth A., Touw D.J. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, a European consensus. Eur. Respir. J. 2000, 16:749-767.
37. Derelle J. Réflexion sur le diagnostic de l'infection respiratoire et le traitement antipyocyanique du jeune enfant dans la mucoviscidose. Référence Mucoviscidose 2001, 6:23-26, laboratoire Roche.
38. Kernen Y., Sauty A., Roulet M. Détection et prise en charge précoce de la primo-infection à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients avec mucoviscidose. Rev. Med. Ch. 2005, 1 :637-640.
39. Häussler S., Ziegler I., Löttel A., Götz F.V., Rohde M., Wehmöhner D., Saravanamuthu S., Tümmeler B. et Steinmetz I. Highly adherent small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. J. Med. Microbiol. 2003, 52 :295-301.
40. Götz F.V., Häussler S., Jordan D., Saravanamuthu S., Wehmöhner D., Strüssmann A., Lauber J., Attree I., Buer J., Tümmeler B. et Steinmetz I. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. J. Bacteriol. 2004, 186:3837-3847.
41. Kappler M., Kraxner A., Reinhardt D., Ganster B., Griese M. et Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax 2006, 61:684-688.

42. Tramper-Stranders G.A., van der Ent C.K., Terheggen-Lagro M.G., Teding van Berkhout F., Kimpen J.L.L. et Wolfs T.F.W. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. Thorax 2006, 61:698-693.
43. Segonds C., Monteil H. et ChabanonG. Espèces du complexe *Burkholderia cepacia*: épidémiologie pathogénicité et résistance aux antibiotiques. Antibio. 2006, 8:43-50.
44. Douglas H. et Coutinho M. *Burkholderia cepacia* complex: virulence characteristics, importance and relationship with cystic fibrosis. Indian J. Med. Sci. 2007, 61:422-429.
45. Vaincre la mucoviscidose. Observatoire cepacia : rapport épidémiologique 2005.
46. Meghdas I., Loiez C., Baïda N., Dabboussi F., Hamze M., Husson M.O., Izard D. Epidémiologie des infections provoquées par les bactéries du « complexe *Burkholderia cepacia* » au cours de la mucoviscidose. Arch. Pédiat. 2004, 11:360-366.
47. Gerrits G.P., Klaassen C., Coenye T., Vandamme P. et Meis J. *Burkholderia fungorum* septicemia. Infect. Dis. 2005, 11:1115-1117.
48. Waters V.J., Gomez M.I., Soong G., Amin S., Ernst R.K. et Prince A. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Infect. Immun. 2007, 75:1698-1703.
49. Goss C. H., Otto K., Aitken M. L. et Rubenfeld G. D. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002, 166:356-361.

50. Talmaciu I., Varlotta L., Mortensen J., et Schidlow D. V. Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2000, 30:10-15.
51. San Gabriel P., Zhou J., Tabibi S., Chen Y., Trauzzi M. et Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents and chemother.* 2004, 48:168-171.
52. De Baets F., Schelstraete P., Van Daele S., Haerynck F. et Vaneechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis : prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* 2007, 6:75-78.
53. Wellinghausen N., Essig A. et Sommerburg O. *Inquilinus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emer. Infect. Dis.* 2005, 11:457-459.
54. Schmoldt S., Latzin P., Heesemann J., Grise M., Imhof A. et Hogart M. Clonal analysis of *Inquilinus limosus* isolated from six cystic fibrosis patients and specific serum antibody response. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55:1425-1433.
55. Herasimenka Y., Cescutti P., Impallomeni G. et Rizzo R. Exopolysaccharides produced by *Inquilinus limosus*, a new pathogen of cystic fibrosis: novel structures with usual components. *Carbohydr. Res.* 2007, 342:2404-2415.
56. Chiron R., Marchandin H., Counil F., Jumas-Bilak E., M. Freydière A., Bellon G., Husson M.O., Turck D., Bremont F., Chabanon G. et Segonds C. Clinical and microbiological feature of *Inquilinus* sp. Isolated from five patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43:3938-3943.
57. Kiratisin P., Koomanachai P., Kowwigkai P., Pattanachaiwit S., Aswapee N. et Leelaporn A. Early-onset prosthetic valve endocarditis caused by *Inquilinus* sp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, 56:317-320.

58. Coenye T., Goris J., Spilker T., Vandamme P. et Lipuma J.J. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40:2062-2069.
59. Le Bourgeois M., Sermet-Gaudelus I., Catherinot E., Gaillard J.L. Mycobactéries atypiques et mucoviscidose. *Arch. Pédiat.* 2005, 12 :117-121.
60. Jewes L.A. et Spencer R.C. The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 1990, 31:271-274.
61. Field T., Smyth N., Elborn S. et Tunney M. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria cultured from the sputum of cystic fibrosis patients grown planktonically and as biofilms. *Cystic fibrosis conference 2007*, 30:310-312.
62. Conférence de consensus : Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Pneumologie et infectiologie, texte de recommandation, Société française de pédiatrie, 2002.
63. Rémic, 3^{ème} Edition 2007, Vivactis Plus, Paris.
64. El Taoum K.: Evaluation de l'écouvillonnage oro-pharyngé par rapport à deux techniques de recueil de sécrétions respiratoires pour l'identification bactérienne chez les patients atteints de la mucoviscidose. Mémoire de Diplôme inter-universitaire, pneumologie pédiatrique 2005, Nancy.
65. Liebermann D., Shleyfer E., Castel H., Terry A., Harman-Boehm I., Delgado J., Peled N. et Liebermann D.: Nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of potential respiratory pathogens in adults. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44:525-528.

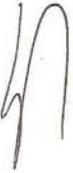
66. Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P. Précis de bactériologie clinique. 2^{ème} Edition 2007, Eska, Paris.
67. Guide de bonne exécution des analyses. Laboratoire de bactériologie. CHU de Nancy.
68. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2008. Société Française de Microbiologie, Paris, France.
69. Ferroni A., Sermet-Gaudelus I., Abachin E., Quesnes G., Lenoir G., Berche P. et Gaillard J.L. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à Gram négatifs non fermentant isolées chez les patients atteints de mucoviscidose. Pathol. Biol. 2003, 51:405-411.
70. Burdge D. R., Noble M.A., Campbell M.E., Krel V.L. et Speert D.P. *Xanthomonas maltophilia* misidentified as *Pseudomonas cepacia* in culture of sputum from patients with cystic fibrosis: a diagnostic pitfall with major clinical implications. Clin. Infect. Dis. 1995, 2:445-448.
71. Henry D.A., Campbell M.E., Lipuma J.J. et Speert D.P. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. J. Clin. Microbiol. 1997, 3:614-619.
72. McMenamin J.D., Zaconné T.M., Coenye T., Vandamme P. et Lipuma J.J. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers, an analysis of 1051 recent sputum isolates. Chest. 2000, 6:1661-1665.
73. Saiman L., Chen Y., Tabibi S., San Gabriel P., Zhou J. et Liu Z. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 2001, 39:3942-3947.

74. Segonds C., Heulin T., Marty N. et Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia cepacia* species by PCR-restriction fragments length polymorphism analysis of the 16 rARN gene and application to cystic fibrosis isolates. J. Clin. Microbiol. 1999, 7:2201-2208.
75. Middleton P.G., Kidd T.J. et Williams B. Combinaison aerosol therapy to treat *Burkholderia cepacia* complex. Eur. Respi. J. 2005, 26:305-308.
76. Zhou J., Chen Y., Tabibi S., Alba L., Garber E. et Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob. Agents and chemother. 2007, 51:1085-1088.
77. Aaron S.D., Ferris W., Henry D.A., Speert D.P. et MacDonald N.E. Multiple combinaison bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000, 161:1206-1212.
78. Lekkas A., Gyi K.M., Hodson M.E. Temocillin in the treatment of *Burkholderia cepacia* infection in Cystic Fibrosis. J. of Cystic Fibrosis 5 (2006) 121-124.
79. Prunier A. L., Malbruny B., Laurans M., Brouard J., Duhamel J.F. et Leclercq R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable stains. J. Infect. Dis. 2003, 187:1709-1716.
80. Bésier S., Zander J., Kahl B., Kraiczy P., Brade V. et Wichehaus T. A. The thymidine-dependant small colony variant phenotype is associated with hypemutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 2008, 52:2183-2189.

81. Prunier A.L., Malbruny B., Tandé D., Picard B. et Leclercq R. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46:3054-3056.
82. Perry J.D., Laine L., Hughes S., Nocholson A., Galloway A. et Gould F.K. Recovery of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputa of cystic fibrosis patients by culture on selective media. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61:1057-1061.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 17 octobre 2008

<p>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par Alexandre RIVIER</p> <p>Sujet : Épidémiologie bactérienne des patients suivis au centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose de 1997 à 2007. Intérêt d'un milieu chromogène pour la détection des variants à petites colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Jury :</p> <p>Président : Mme Janine Schwartzbord, Professeur Directeur : Mr Alain Lognaynski, Professeur Membres : Mr Christian Rabaud, Professeur Mme Jocelyne Decelle, Pédiatre Mr Tahar Hadou, Bactériologue</p>	<p>Vu et approuvé,</p> <p>Nancy, le 10 décembre 2006</p> <p>Le Président du Jury Le Directeur de Thèse Mme Janine Schwartzbord Mr Alain Lognaynski Professeur Professeur</p>  
<p>Vu et approuvé, Nancy, le 23 SEP. 2008</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> 	<p>Vu et approuvé, Nancy, le 29.9.08</p> <p>Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> <p>Jean-Pierre FINANCE</p>  

N° d'enregistrement : 3132

N° d'identification :

TITRE :

INTERET D'UN MILIEU CHROMOGENE POUR LA DETECTION DES VARIANTES A PETITES COLONIES DE *Staphylococcus aureus*. EPIDEMIOLOGIE BACTERIENNE DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE SUIVIS AU CENTRE DE RESSOURCES ET DE COMPETENCES DE LA MUCOVISCIDOSE EN 1997 ET 2007

Thèse soutenue le 17 octobre 2008

Par Alexandre RIVIER

RESUME :

La mucoviscidose (ou fibrose kystique du pancréas) est la plus fréquente des maladies génétiques touchant les populations caucasiennes. Elle résulte du dysfonctionnement du gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui joue un rôle dans le transport des ions chlorure. Au cours de cette affection, l'atteinte pulmonaire est quasiment constante et se caractérise par une détérioration progressive des fonctions respiratoires. Cette évolution est expliquée par la survenue d'épisodes infectieux répétés et liés à l'existence de micro-organismes colonisant de manière chronique le tractus respiratoire de ces patients.

Le but de ce travail était d'étudier et de comparer les flores bactériennes respiratoires chez les patients mucoviscidosques suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de Nancy en 1997 et 2007. Nous avons également évalué l'intérêt du milieu chromogène SAID (bioMérieux) pour la détection des "Staphylococcus aureus small colony variants" (SCV SA) en routine. Nous avons réalisé une étude rétrospective des données bactériologiques obtenues après analyse des prélèvements respiratoires des patients suivis au CRCM de Nancy en 1997 ($n = 148$) et en 2007 ($n = 227$). Une étude comparant les performances de deux milieux (gélose Columbia ANC additionnée de 5% de sang mouton et gélose SAID) pour la détection des SCV SA a été effectuée sur 122 prélèvements consécutifs obtenus chez 108 patients.

La fréquence des bactéries isolées respectivement en 1997 et 2007 était de 70,9% et 65% pour *Haemophilus* spp., 58,1% et 58,1% pour *S. aureus*, 45,2% et 36,5% pour *Pseudomonas aeruginosa*, 9,5% et 2,2% pour *Burkholderia cepacia*, 3,3% et 3% pour *Stenotrophomonas maltophilia*, 1,4% et 3% pour *Achromobacter xylosoxidans* et 8,8% et 4,8% pour les autres bacilles à Gram négatif non fermentants. La résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* observée respectivement en 1997 et en 2007 était de 30,8% et 58% pour la pipéracilline - tazobactam, 37,7% et 57% pour la ceftazidime, 36,5% et 58,5% pour l'imipénème, 40% et 42,7% pour la ciprofloxacine. Pour *S. aureus*, nous avons observé en 1997 et 2007, des taux de résistance respectifs de 12,2% et 27,4% pour la méticilline, 28,7% et 80,1% pour l'érythromycine, 14,7% et 37,7% pour la lincomycine, 3,4% et 19,2% pour la rifampicine et pour l'acide fusidique. La sensibilité est restée relativement stable pour la gentamicine, la pristinamycine, le cotrimoxazole et la minocycline. Entre 1997 et 2007, nous avons observé une relative stabilité de la fréquence d'isolement des principales espèces bactériennes habituellement isolés chez les patients mucoviscidosques (*P. aeruginosa*, *Hæmophilus* spp. et *S. aureus*) et une diminution significative de celle appartenant au complexe *B. cepacia*. L'utilisation du milieu SAID a permis d'augmenter la sensibilité de détection des SCV SA.

MOTS CLES : mucoviscidose, physiopathologie, épidémiologie bactérienne, *S. aureus* small colony variants, gélose SAID.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Alain Lozniewski Professeur des universités	Laboratoire de bactériologie	<input type="checkbox"/> Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 5
<u>Thèmes</u>	<u>1 – Sciences fondamentales</u> <u>3 – Médicament</u> <u>5 - Biologie</u>	<u>2 – Hygiène/Environnement</u> <u>4 – Alimentation – Nutrition</u> <u>6 – Pratique professionnelle</u>

