



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 22 janvier 2014

par

Mlle BONNEL Claire

Née le 24 mai 1988

A Saint-Chamond (42)

***Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose**

JURY

M. FRENEY Jean, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne, Maître de Conférences des Universités - Praticien Attachée

Mme FREYDIERE Anne-Marie, Biologiste, Docteur en Pharmacie

Mlle PAGES Laurence, Docteur en pharmacie

M. REIX Philippe, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. François-Noël GILLY
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil Scientifique M. Germain GILLET
- Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

Décembre 2013

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. GABRIELE

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr – HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
Monsieur François COMET (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
Madame Léa PAYEN (MCU -HDR)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)

Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)

Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Emilie BLOND

Madame Christelle MOUCHOUX

Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85^{ème} section

Monsieur Boyan GRIGOROV 87^{ème} section

Madame Mylène HONORAT 85^{ème} section

Monsieur Abdalah LAOUINI 85^{ème} section

Madame Marine CROZE 86^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION.....	21
Partie I : La mucoviscidose.....	23
1 Epidémiologie.....	24
2 Etiologie.....	25
2.1 Le gène.....	25
2.2 Les mutations.....	26
2.3 Transmission de la mutation.....	30
2.4 La protéine CFTR.....	30
2.4.1 Structure et localisation.....	30
2.4.2 Fonctions de la protéine CFTR.....	32
3 Manifestations cliniques.....	33
3.1 L'atteinte respiratoire.....	33
3.1.1 Physiopathologie respiratoire.....	34
3.1.1.1 Le liquide de surface bronchique = mucus.....	34
3.1.1.2 Les infections bronchiques.....	35
3.1.1.3 L'inflammation bronchique.....	35
3.1.2 Manifestations respiratoires.....	36
3.2 L'atteinte digestive.....	41
3.2.1 Les manifestations pancréatiques.....	41
3.2.1.1 L'insuffisance pancréatique exocrine.....	41
3.2.1.1.1 Physiopathologie.....	42
3.2.1.1.2 Manifestations cliniques.....	42
3.2.1.2 L'insuffisance pancréatique endocrine.....	42
3.2.2 Les manifestations digestives.....	43
3.2.2.1 L'iléus méconial.....	43
3.2.2.2 Le syndrome d'obstruction intestinale distale (SOID).....	43

3.2.2.3	La constipation.....	44
3.2.2.4	Le reflux gastro-œsophagien (RGO).....	44
3.2.3	Les manifestations hépatiques.....	44
3.3	Les autres atteintes.....	45
3.3.1	Les manifestations ORL.....	45
3.3.2	Les manifestations ostéo-articulaires.....	45
3.3.3	L'atteinte génitale.....	46
4	Diagnostic de la mucoviscidose.....	46
4.1	Diagnostic néonatal de la mucoviscidose (DNM).....	46
4.1.1	Le dépistage de la Trypsine ImmunoRéactive (TIR).....	46
4.1.2	La recherche de mutations.....	48
4.1.3	Le test de la sueur.....	48
4.1.4	Les bénéfices du dépistage.....	49
4.2	Diagnostic anténatal (ou prénatal).....	50
4.3	Diagnostic préimplantatoire.....	50
5	Prise en charge.....	51
5.1	Prise en charge respiratoire.....	51
5.1.1	La kinésithérapie respiratoire.....	51
5.1.2	L'aérosolthérapie.....	52
5.1.2.1	Les appareils de nébulisation.....	53
5.1.2.1.1	Les nébuliseurs pneumatiques.....	53
5.1.2.1.2	Les nébuliseurs ultrasoniques.....	54
5.1.2.1.3	Les nébuliseurs à membrane.....	55
5.1.2.2	Les médicaments nébulisés.....	55
5.1.2.2.1	Les bronchodilatateurs.....	55
5.1.2.2.2	Les mucomodificateurs.....	56
5.1.2.2.2.1	La rhDNase ou dornase alfa : PULMOZYME®.....	56
5.1.2.2.2.2	Le sérum salé hypertonique.....	57
5.1.2.2.2.3	La N-acétylcystéine.....	57
5.1.2.2.3	Les anti-inflammatoires.....	57
5.1.2.2.4	Les antibiotiques.....	58
5.1.2.3	La séance d'aérosolthérapie en pratique.....	58
5.1.3	L'antibiothérapie par voie générale.....	58
5.1.3.1	Traitement de l'infection à <i>Staphylococcus aureus</i>	59
5.1.3.2	Traitement de l'infection à <i>Haemophilus influenzae</i>	61
5.1.3.3	Effets indésirables des antibiotiques.....	61
5.1.3.4	Les vaccinations.....	62

5.2	Prise en charge métabolique et nutritionnelle.....	62
5.2.1	Les extraits pancréatiques.....	62
5.2.2	La prise en charge du diabète.....	64
5.2.3	L'acide urodésoxycholique.....	64
5.2.4	La prise en charge nutritionnelle.....	65
5.2.4.1	Les suppléments vitaminiques.....	65
5.2.4.2	Les minéraux et oligo-éléments.....	67
5.3	Prise en charge des complications digestives.....	67
5.3.1	Le syndrome d'obstruction intestinale distale (SOID).....	67
5.3.2	La constipation.....	68
5.3.3	Le reflux gastro-oesophagien (RGO).....	68
5.4	Prise en charge psychologique.....	68
Partie II	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
1	Habitat et transmission.....	70
2	Morphologie et caractéristiques de culture.....	70
3	Production de pigments.....	73
4	Structure antigénique.....	77
5	Le génome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
6	Les facteurs de pathogénicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
6.1	Les facteurs impliqués dans l'adhérence.....	79
6.1.1	Les pili de type IV.....	79
6.1.2	Le flagelle.....	81
6.1.3	Le lipopolysaccharide (LPS).....	82
6.1.4	Facteur d'attachement de type fimbriae (ou cup).....	83
6.1.5	L'exoenzyme S.....	84
6.2	Les facteurs impliqués dans la persistance et la multiplication de la bactérie.....	84
6.3	Les facteurs responsables des lésions.....	85
6.3.1	La cytotoxine.....	85
6.3.2	Les hémolysines.....	86
6.3.2.1	La phospholipase C.....	86
6.3.2.2	Les rhamnolipides.....	86
6.3.3	Les protéases.....	86
6.3.3.1	L'élastase.....	86
6.3.3.2	L'élastase LasD.....	87
6.3.3.3	La protéase alcaline.....	87

6.3.4 Les toxines ADP-ribosylantes.....	87
6.3.4.1 L'exotoxine A.....	87
6.3.4.2 Les exoenzyme S, T, U et Y.....	88
6.4 L'alginate.....	88
6.5 Le biofilm.....	90
6.6 Le « quorum sensing ».....	93
6.6.1 Le système <i>las</i>	95
6.6.2 Le système <i>rhl</i>	95
6.6.3 Le système PQS.....	97
7 Pouvoir pathogène.....	98
8 Diagnostic microbiologique.....	99
8.1 Examen direct et coloration de Gram.....	99
8.2 Identification par tests biochimiques.....	99
8.3 Identification par la technique Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry = MALDI-TOF MS.....	100
8.4 Identification par la technique Polymerase Chain Reaction = PCR.....	104
8.5 Le dosage des anticorps.....	106
8.6 L'antibiogramme.....	107
8.6.1 Mécanismes de résistances.....	107
8.6.1.1 Résistances naturelles.....	107
8.6.1.2 Résistances acquises.....	108
8.6.1.2.1 Résistances enzymatiques.....	108
8.6.1.2.2 Résistances non enzymatiques.....	108
8.6.2 Principe de l'antibiogramme.....	109
8.7 Les techniques de génotypage.....	111
Partie III : Physiopathologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....	118
1 Les différentes étapes de la colonisation du tractus respiratoire par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	120
1.1 La primocolonisation.....	120
1.2 La colonisation intermittente.....	120
1.3 La colonisation chronique.....	121
2 Epidémiologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....	122
2.1 Données épidémiologiques.....	122
2.1.1 Aux Etats-Unis.....	122
2.1.2 En France.....	122
2.2 La clonalité.....	125

2.3 Les voies de transmission et la prévention des infections.....	126
3 Les facteurs liés à l'hôte.....	127
4 Les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hypermutables.....	127
4.1 Les mutations spontanées.....	128
4.2 Mutation de <i>lasR</i>	130
4.3 La résistance aux antibiotiques.....	131
4.4 Les variants à petites colonies rugueuses.....	131
4.5 Modifications du flagelle et des pili.....	132
4.6 Modifications du lipopolysaccharide.....	133
4.7 Adaptation métabolique.....	134
5 La co-infection <i>Pseudomonas aeruginosa-Staphylococcus aureus</i>	136

Partie IV : Le traitement de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de

mucoviscidose.....	139
1 Stratégie antibiotique.....	140
1.1 Traitement de la primocolonisation.....	140
1.2 Traitement de l'infection chronique.....	141
2 Perspectives d'avenir.....	143
2.1 Développement de nouveaux antibiotiques.....	143
2.2 Innovations galéniques.....	146
2.3 Inhibition du « quorum sensing ».....	147
2.3.1 Dégradation ou inhibition de la synthèse d'AHL.....	147
2.3.2 Inhibition de la formation des complexes LasR ou RhIR avec les AHL.....	148
2.3.3 Inhibition des régulateurs positifs du « quorum sensing ».....	149
2.3.4 Inhibition de l'expression de <i>lasR-lasI</i> ou de <i>rhIR-rhII</i>	150
2.3.5 Inhibition du « quorum sensing » par les macrolides.....	150
2.4 La vaccination contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150
2.5 La phagothérapie.....	152
2.5.1 Définition et rappels historiques.....	152
2.5.2 Les principaux avantages et inconvénients de la phagothérapie.....	152
2.5.2.1 Les principaux avantages.....	153
2.5.2.1.1 Activité sur le biofilm.....	153
2.5.2.1.2 L'omniprésence des bactériophages.....	153
2.5.2.2 Les principaux inconvénients.....	153
2.5.2.2.1 Le mode de préparation des bactériophages.....	153
2.5.2.2.2 La reconnaissance par le système immunitaire.....	154

2.5.3 Les bactériophages de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et leurs applications dans la mucoviscidose.....	154
2.5.3.1 Les bactériophages de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	154
2.5.3.2 Utilisation dans le cadre des infections pulmonaires de la mucoviscidose.....	155
CONCLUSION.....	156
BIBLIOGRAPHIE.....	158

REMERCIEMENTS

Mes remerciements et ma reconnaissance à :

M. Jean FRENEY, pour la qualité de son enseignement dispensé au cours de mes études et qui me fait l'honneur de présider le jury de thèse.

Mme Anne DOLEANS-JORDHEIM, qui, toujours disponible, a mis ses compétences à mon service et m'a guidée, par ses conseils éclairés, tout au long de la rédaction de cette thèse.

Mme Anne-Marie FREYDIERE, Mlle Laurence PAGES et M. Philippe REIX, qui ont bien voulu examiner mon travail et participer au jury.

Merci encore à tous les enseignants de la Faculté qui m'ont transmis leurs connaissances et leur savoir au cours de mon cursus dont l'aboutissement est la présente thèse.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Fréquence des principales mutations responsables de la mucoviscidose en France

Tableau II : Valeurs normales moyennes des paramètres respiratoires chez un homme de 40 ans mesurant 1,75 m

Tableau III : Principaux antibiotiques anti-*Staphylococcus aureus* utilisés *per os*

Tableau IV : Principaux antibiotiques anti-*Staphylococcus aureus* utilisés par voie IV

Tableau V : Spécialités utilisées pour le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine

Tableau VI : Spécialités utilisées pour le traitement de l'atteinte hépatobiliaire

Tableau VII : Recommandations concernant les suppléments vitaminiques au cours de la mucoviscidose

Tableau VIII : Facteurs de pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Taux départementaux de prévalence de la mucoviscidose en 2011
- Figure 2 : Organisation du gène *cftr* et processus d'obtention de la protéine CFTR
- Figure 3 : Classification des mutations du gène *cftr*
- Figure 4 : Localisation du gène *cftr* et de la mutation $\Delta F 508$
- Figure 5 : Mode de transmission de la mucoviscidose
- Figure 6 : Structure de la protéine CFTR
- Figure 7 : Fonctionnement du canal chlore CFTR
- Figure 8 : Organes touchés au cours de la mucoviscidose
- Figure 9 : Le liquide de surface bronchique dans les voies aériennes normales (A) et dans celles de malades atteints de mucoviscidose (B)
- Figure 10 : Organigramme de dépistage de la mucoviscidose
- Figure 11 : Nébuliseur pneumatique
- Figure 12 : Nébuliseur ultrasonique
- Figure 13 : Nébuliseur e-Flow@rapid
- Figure 14 : La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*
- Figure 15 : Colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Drigalski
- Figure 16 : Structure chimique des trois types de pyoverdine
- Figure 17 : Structure chimique de la pyochéline
- Figure 18 : Structure chimique de la pyocyanine
- Figure 19 : Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique
- Figure 20 : Le génome de *Pseudomonas aeruginosa* souche PAO1
- Figure 21 : Structure d'un pilus de type IV
- Figure 22 : Le flagelle de *Pseudomonas aeruginosa*
- Figure 23 : Structure du lipopolysaccharide
- Figure 24 : Formation des complexes ferri-sidérophores et utilisation du fer par la bactérie
- Figure 25 : Structure chimique de l'alginate

Figure 26 : Organisation de l'opéron *AlgD*

Figure 27 : Formation d'un biofilm

Figure 28 : Structure chimique de la 3-oxo-C12-HSL

Figure 29 : Structure chimique de la C4-HSL

Figure 30 : Mécanisme moléculaire du « quorum sensing » chez *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 31 : *Pseudomonas aeruginosa* en coloration de Gram

Figure 32 : Le test à l'oxydase

Figure 33 : Galerie API 20NE

Figure 34 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

Figure 35 : Spectre MALDI-TOF MS de *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 36 : Détection d'anticorps anti-*Pseudomonas aeruginosa* par immuno-électrophorèse

Figure 37 : AntibioGramme en milieu solide de *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 38 : Méthode de l'E-test® avec *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 39 : Etapes de la révélation du RFLP porté par un ADN

Figure 40 : PFGE réalisée avec les enzymes SpeI et XbaI pour l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 41 : Profil RISA-HPLC de différentes espèces bactériennes isolées d'un patient atteint de mucoviscidose

Figure 42 : Evolution des infections bactériennes selon l'âge des patients atteints de mucoviscidose

Figure 43 : Evolution naturelle de l'atteinte à *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 44 : Répartition des différents germes isolés de patients atteints de mucoviscidose en 2001 et en 2011

Figure 45 : Cibles potentielles de mutations

Figure 46 : Etapes de la formation d'un biofilm par les RSCVs

Figure 47 : Différents mécanismes de l'adaptation métabolique chez *P. aeruginosa*

Figure 48 : La spécialité CAYSTON®

Figure 49 : La spécialité TOBI®

Figure 50 : L'algue *Delisea pulchra*

LISTE DES ABBREVIATIONS

µg : microgramme

µm : micromètre

AAC : aminoside-N-amino-acétyl-transférase

ABC : ATP-Binding Cassette

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

Ag : antigène

AHL : acylhomosérine lactone

AMM : autorisation de mise sur le marché

AMP : adénosine monophosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ANT : aminoside-o-nucléotidyl transférase

APH : aminoside-o-phosphotransférase

ARN : acide ribonucléique

ARN m : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ATP : adénosine triphosphate

cfr ou CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CPT : capacité pulmonaire totale

CRCM : centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose

CRF : capacité résiduelle fonctionnelle

C-term : C-terminale

CVF : capacité vitale forcée

DDP : différence de potentiel

DEM 25-75 : débit expiratoire médian entre 25 et 75 % de la capacité vitale

DNM : diagnostic néonatal de la mucoviscidose

DPI : diagnostic préimplantatoire

ECBC : examen cytbactériologique des crachats

EF : elongation factor

ENaC : Epithelial Na Channel

FIV : fécondation *in vitro*

g : gramme

GMP : guanosine monophosphate

GSH : glutathion

GST : glutathion S-transférase

h : heure

HSL : homoserine lactone

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IMG : interruption médicale de grossesse

IPP : inhibiteur de la pompe à protons

IV : intraveineux

j ou J : jour

kb : kilobase

kbp : kilo paires de bases

kDa : kilodalton

kg : kilogramme

L : litre

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LPS : lipopolysaccharide

m : mètre

mEq/L : milliéquivalent par litre

Mex : Multiple efflux

mg : milligramme

mL : millilitre

MLST : multiple locus sequence typing

MLVA : multiple locus VNTR analysis

mmol : millimole

NBD : Nucleotide binding domain

nm : nanomètre

N-term : N-terminale

OF : oxydation-fermentation

Opr : outer membrane protein

ORCC : outwardly rectifying chloride channel

ORL : oto-rhino-laryngologie

Patient MV : patient atteint de mucoviscidose

PCR : polymerase chain reaction

PFGE : pulsed-field gel electrophoresis

Ph Eur : pharmacopée européenne

pH : potentiel hydrogène

PKA : protéine kinase A

PMA : procréation médicalement assistée

PQS : *Pseudomonas* quinolone signal

RAPD : random amplified polymorphic DNA

Rep-PCR : repetitive element base-PCR

RFLP : restriction fragment length polymorphism

RISA-HPLC : analyse de l'opéron inter-ribosomal couplée à la chromatographie liquide haute performance

RGO : reflux gastro-œsophagien

Rmt : Resistance methylase transferase

RND : Resistance Nodulation cell Division

RSCVs : variants à petites colonies rugueuses

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline

SDS : sodium dodecyl sulfate

SFN : site de fixation des nucléotides

SLPI : Secretory Leukocyte peptidase inhibitor

SOID : syndrome d'obstruction intestinale distale

TIMP : tissue inhibitor of matrix metalloprotease

TIR : trypsine immunoréactive

TLR : Toll-like receptor

TM : transmembrane

TNF : tumor necrosis factor

TS : test de la sueur

U : unité

UFC/mL : unités formant colonies par millilitres

UI : unité internationale

UL : unité lipase

VEMS : volume expiré maximal en une seconde

VNTR : variable number of tandem repeat

VR : volume résiduel

INTRODUCTION

Des études estiment que la mucoviscidose trouve son origine dans la région située entre la Turquie et l'Irak, et qu'elle existe depuis près de 5000 ans. Au cours des siècles, la maladie se serait répandue en direction de l'Occident et aurait atteint l'Europe entière. Elle se serait alors étendue à des pays d'Amérique du nord, d'Amérique latine et à l'Australie, pays colonisés par des européens (1). La mucoviscidose était déjà connue au Moyen-Âge ou l'on évoquait des « enfants aux baisers salés ».

La maladie est décrite scientifiquement par le pédiatre suisse Guido Fanconi en 1936. Deux ans plus tard, elle est identifiée par Dorothy Hansine Andersen comme une entité pathologique distincte touchant le pancréas d'où son nom historique de fibrose kystique du pancréas. Elle conserve ce nom en anglais : « cystic fibrosis ». Le terme de mucoviscidose est formé à partir des termes mucus et visqueux. Il fut utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Sydney Farber pour corriger le terme employé par Dorothy Hansine Andersen centré sur le pancréas (2).



Dorothy Hansine Andersen

Pédiatre

1901-1963

La mucoviscidose est une maladie génétique transmise conjointement par le père et par la mère. Deux millions de personnes, soit 1 personne sur 30, sont porteuses du gène muté et peuvent potentiellement le transmettre à leur enfant (3). Chaque année, 200 nouveau-nés

sont touchés par la maladie. On dénombre 6000 malades en France et 70 000 dans le monde (1). La mucoviscidose touche un grand nombre d'organes, principalement les voies digestives et respiratoires (3). Les progrès de la prise en charge ont permis d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients. Ainsi en France, l'espérance de vie à la naissance est passée de 7 ans en 1965 à 47 ans en 2005 (4). L'atteinte respiratoire est la plus délétère et favorise les infections pulmonaires par des agents viraux, bactériens ou fongiques (3). Parmi les agents bactériens, *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique, est l'agent le plus problématique dans un contexte de mucoviscidose (5). Son implantation au niveau des poumons marque un tournant évolutif majeur. La prise en charge thérapeutique est rendue difficile par le caractère chronique de l'infection à ce microorganisme. En effet, à ce stade la bactérie va développer de nombreux artifices pour déjouer l'action des molécules antibiotiques : sécrétion d'un biofilm, « quorum sensing », mutations engendrant des résistances accrues aux antibiotiques (6). De nouveaux traitements sont donc nécessaires pour l'éradication de cette bactérie ainsi que le développement de nouvelles stratégies préventives (vaccination).

Partie I

La mucoviscidose

1 Epidémiologie

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est la plus fréquente des maladies génétiques graves dans la population caucasienne (7). La mucoviscidose n'exclut aucune population du globe, mais elle est présente à des prévalences variables. Ainsi, il existe très peu de cas dans les populations africaines et asiatiques, comparativement aux populations blanches d'Europe et d'Amérique du Nord (8), avec des variations propres au sein de chaque pays. En France, la prévalence de cette pathologie est estimée à un nouveau-né atteint sur 2500 naissances. En 2002, la mise en place du dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France a permis une réévaluation de l'incidence de cette pathologie. Ainsi, les premières estimations réajustent la fréquence à environ un nouveau-né sur 4600 naissances. Il existe en plus, des variations selon les régions : la prévalence est estimée à 1/2500 dans le nord-ouest et 1/10 000 dans le sud-est (Figure 1) (9).

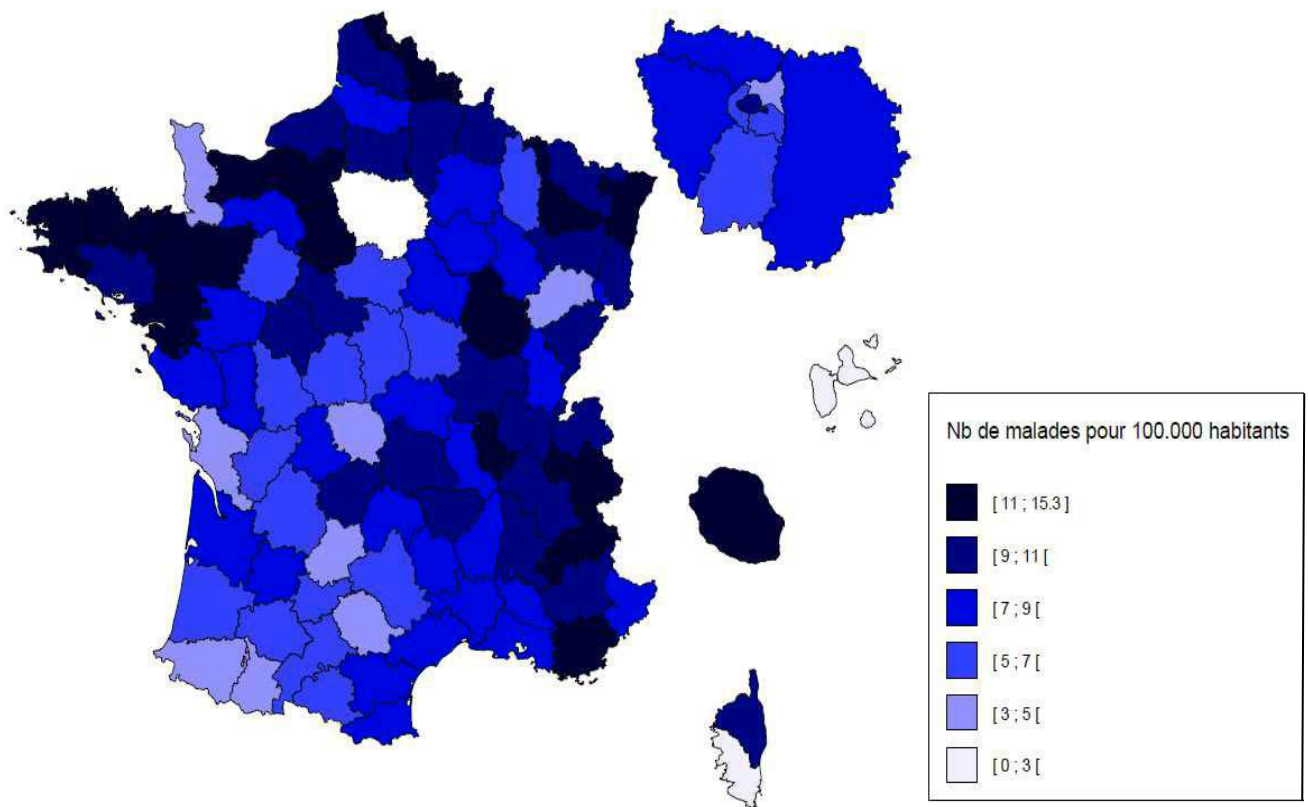


Figure 1 : Taux départementaux de prévalence de la mucoviscidose en 2011 (10)

Cette pathologie se transmettant sur le mode autosomique récessif, seuls les individus homozygotes pour le gène sont atteints. La fréquence des hétérozygotes, alors porteurs sains de la maladie, est d'environ 1/25, soit 4 % de la population générale occidentale (9).

Le sex-ratio est proche de 1, cependant l'atteinte est souvent plus grave chez les sujets de sexe féminin. En effet, on observe chez les femmes un déclin accru de la fonction respiratoire, une plus grande susceptibilité à l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* et une baisse de la survie. Il semblerait que cette inégalité homme-femme s'explique par les différences hormonales (11). Environ 250 nouveaux cas sont pris en charge chaque année. On estime entre 4000 et 6000 le nombre actuel de sujets atteints de mucoviscidose en France (10).

2 Etiologie

2.1 Le gène

Le gène impliqué dans la mucoviscidose est localisé sur le chromosome 7, au niveau du locus 7q31.2 du bras long. Il s'agit du gène *cftr* pour cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Il a été identifié et localisé en 1985 par l'équipe canadienne de L.C Tsui, puis cloné en 1989 avec l'aide de l'équipe américaine de F. Collins. C'est un gène de grande taille, constitué d'environ 250 000 paires de bases réparties en 27 exons. Ce gène est transcrit en un ARN messager de 6,5 kb qui code la synthèse d'une glycoprotéine transmembranaire de 1480 acides aminés : la protéine CFTR (Figure 2) (12).

Une mutation de ce gène entraîne une anomalie de la protéine CFTR, ce qui se traduit par la mucoviscidose (13). Le gène *cftr* est exprimé au niveau de nombreuses cellules épithéliales de l'organisme telles que les cellules pulmonaires, intestinales, biliaires, ainsi que celles des glandes sudoripares et des glandes du tractus génital (9).

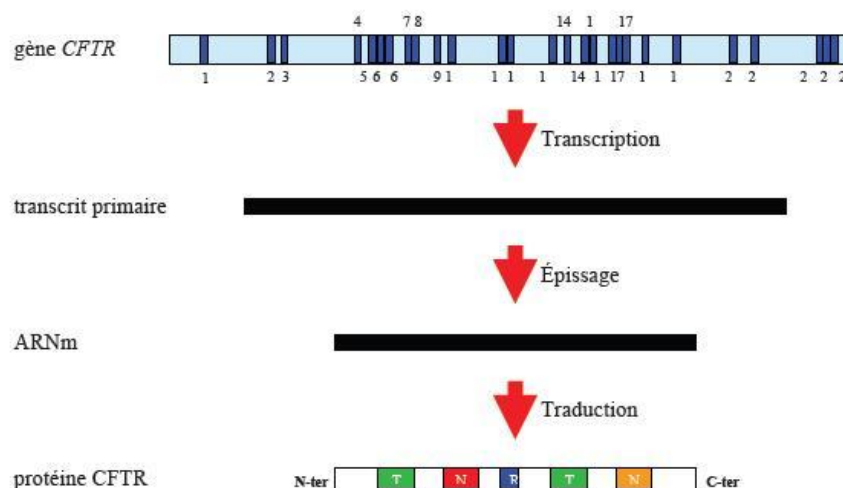


Figure 2 : Organisation du gène *cftr* et processus d'obtention de la protéine CFTR (14)

2.2 Les mutations

Plus de 1700 mutations réparties tout au long du gène *cftr* ont été recensées. Il s'agit pour la plupart de mutations ponctuelles (15). Tous les types de mutations ont été mis en évidence dans la mucoviscidose. Majoritairement, on trouve des mutations faux-sens à hauteur de 42 %, des micro-insertions et des micro-délétions (24 %) qui provoquent un décalage du cadre de lecture au niveau du code génétique, puis des mutations non-sens (16 %) et enfin des mutations sur le site d'épissage (16 %) (13).

En fonction des conséquences fonctionnelles qu'elles entraînent au niveau de la protéine CFTR, les mutations du gène *cftr* sont divisées en 6 classes. Il peut s'agir d'anomalies quantitatives ou qualitatives de la protéine CFTR (Figure 3) (12) :

- Classe 1 : mutations altérant la production de la protéine CFTR.

Ces mutations se traduisent par une absence totale ou partielle de la protéine. Dans cette classe, on trouve les mutations non-sens dues à un codon stop (par exemple la mutation G542X) et les mutations qui provoquent un décalage du cadre de lecture (12).

- Classe 2 : mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine CFTR.
Ces mutations entraînent une destruction de la protéine malformée au cours de sa maturation dans le système réticulum endoplasmique – appareil de Golgi. C'est le cas rencontré dans la mutation $\Delta F 508$ (12).
- Classe 3 : mutations perturbant la régulation du canal chlore.
Ces mutations impliquent l'interaction entre l'ATP et les sites de fixation des nucléotides (NBD 1 et 2). Elles entraînent une diminution de la sensibilité de la cellule à détecter l'ATP, ce qui a pour conséquence une absence de signal d'ouverture du canal chlore. C'est le cas de la mutation faux-sens G551D (12).
- Classe 4 : mutations altérant la conduction et la sélectivité du canal chlore.
On observe une diminution du flux d'ions chlorures et une sélectivité modérée envers ces ions. C'est le cas de la mutation R117H (12).
- Classe 5 : mutations altérant en partie la synthèse ou le trafic de la protéine CFTR.
Ces mutations altèrent la stabilité de l'ARN messager et réduisent le nombre de protéines normales présentes dans la membrane apicale des cellules (12).
- Classe 6 : mutations altérant la stabilité de la protéine mature.
Ces mutations génèrent des protéines tronquées d'une centaine de paires de bases au niveau de leur partie C-terminale. La protéine est donc moins stable (12).

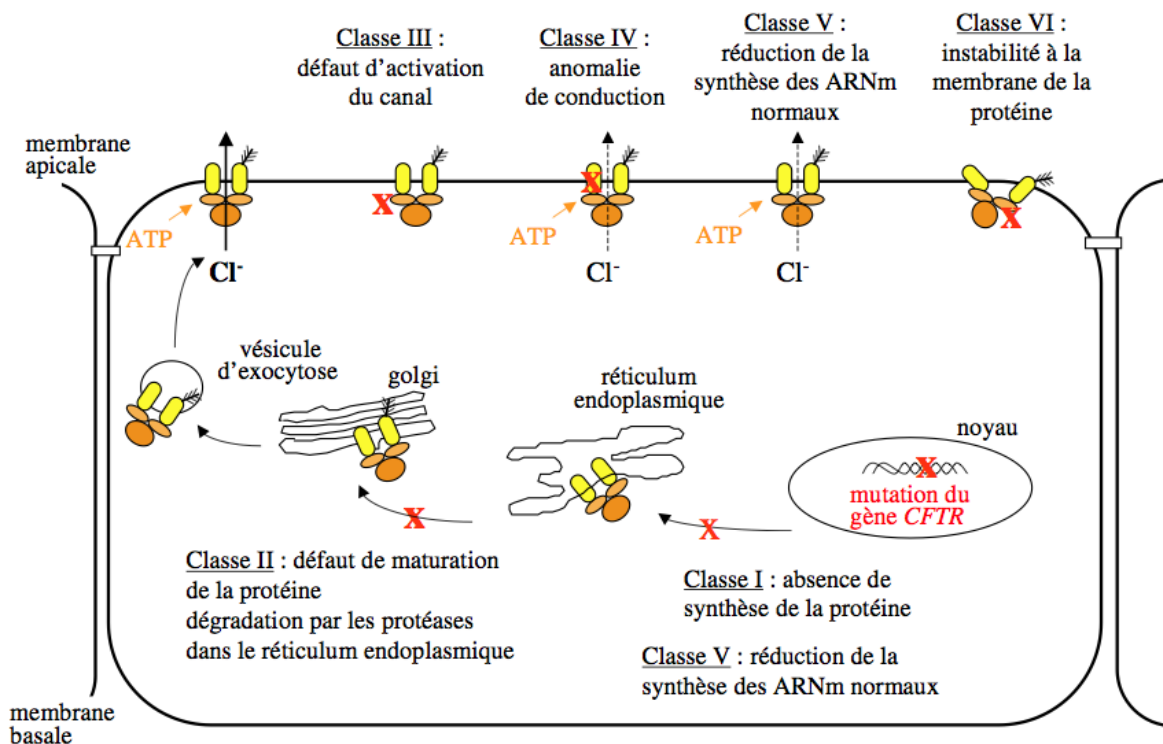


Figure 3 : Classification des mutations du gène *cftr* (16)

Pour apprécier les conséquences cliniques de la maladie, il a été établi des corrélations génotype-phénotype. Ainsi, les mutations des classes 1, 2, 3 et 4 ont un effet délétère sévère, alors que cet effet est plus modéré pour les mutations des classes 5 et 6. Cette corrélation est bien démontrée pour l'atteinte de la fonction pancréatique mais elle est plus difficile à établir pour la fonction pulmonaire (17).

La mutation $\Delta F 508$ est la plus fréquente. Elle consiste en une délétion de trois paires de bases (CTT) au niveau du dixième exon du gène ayant pour conséquence l'élimination d'un acide aminé, la phénylalanine, en position 508 de la protéine CFTR (Figure 4). Cette mutation se retrouve chez près de 70 % des patients atteints de mucoviscidose (17). De plus, il existe une hétérogénéité de répartition de cette mutation, ceci en fonction de l'origine ethnique ou géographique. Ainsi, la mutation $\Delta F 508$ représente près de 90 % des cas de mucoviscidose, parmi la population nord-européenne contre seulement 22 % des cas chez les juifs ashkénazes (18). Un gradient Nord-Sud s'observe en France : la mutation $\Delta F 508$ est présente à une fréquence de 80 % en Bretagne contre 64 % en Languedoc-Roussillon (19).

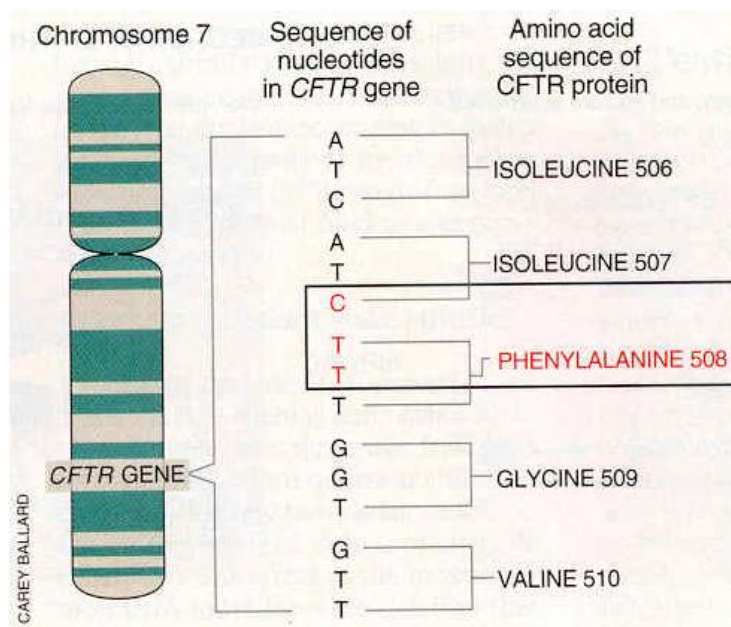


Figure 4 : Localisation du gène *cftr* et de la mutation ΔF 508 (20)

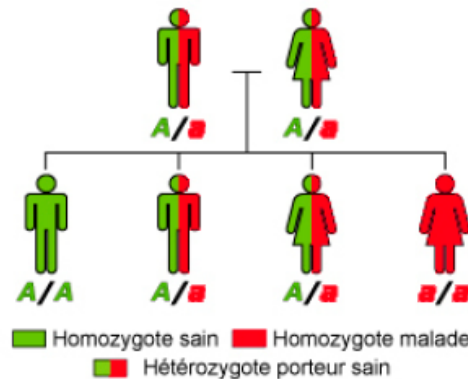
Seules sept autres mutations ont une fréquence supérieure ou égale à 1 %. Il s'agit de G542X, N1303K, 2789+5G->A, 1717-1G->A, R117H, R553X et G551D (Tableau I) (10).

Tableau I : Fréquence des principales mutations responsables de la mucoviscidose en France (10)

Mutation	Fréquence	Mutation	Fréquence
G542X	3,1 %	R117H	1,5 %
N1303K	2,3 %	R553X	1,1 %
2789+5G->A	1,6 %	G551D	1,0 %
1717-1G->A	1,6 %		

2.3 Transmission de la mutation

La mucoviscidose se transmet sur le mode autosomique récessif. Pour être malade, un individu doit être homozygote pour le gène concerné. L'individu recevant un exemplaire de gène muté par chacun de ses deux parents (Figure 5) (21).



Les deux parents portent une copie du gène muté (a), et une copie du gène normal (A) : ils ne sont pas malades (on dit qu'ils sont hétérozygotes).

L'enfant a/a a récupéré les deux gènes mutés de son père et de sa mère : il est atteint de la mucoviscidose (on dit qu'il est homozygote).

Les enfants A/a portent le gène, ils sont hétérozygotes : ils ne développeront pas la maladie, mais risquent de transmettre le gène comme leurs parents. On les appelle porteurs sains.

L'enfant A/A n'a pas récupéré le gène muté ni de sa mère ni de son père : il n'est pas malade et ne risque pas de transmettre la maladie.

Figure 5 : Mode de transmission de la mucoviscidose (21)

2.4 La protéine CFTR

2.4.1 Structure et localisation

La protéine CFTR est une glycoprotéine transmembranaire composée de 1480 acides aminés ayant un poids moléculaire de 170 kDa. Sa maturation se déroule dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (22). Elle est présente dans les épithéliums bronchiques, au niveau des canaux pancréatiques, biliaires, des glandes sudoripares et du tractus génital. Pour le malade atteint de mucoviscidose, le fonctionnement de ces organes sera donc altéré. Elle est également présente en faible quantité dans des cellules non épithéliales (fibroblastes, lymphocytes) (12).

Cette protéine fait partie d'une famille de transporteurs membranaires : les transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Elle est composée de deux motifs répétés, constitués chacun (Figure 6) :

- d'un domaine transmembranaire hydrophobe (TM1 ou TM2) formé de 6 segments transmembranaires organisés en hélice alpha (20) ;
- d'une région hydrophile intracellulaire NBD1 ou NBD 2 (Nucleotide Binding Domain). Ce sont des sites de fixation et d'hydrolyse de l'ATP (20).

Un domaine cytoplasmique régulateur « R » relie les deux motifs. Il contient de nombreux résidus chargés et la majorité des sites potentiels de phosphorylation (substrats probables des protéines kinases A et/ou C) (20).

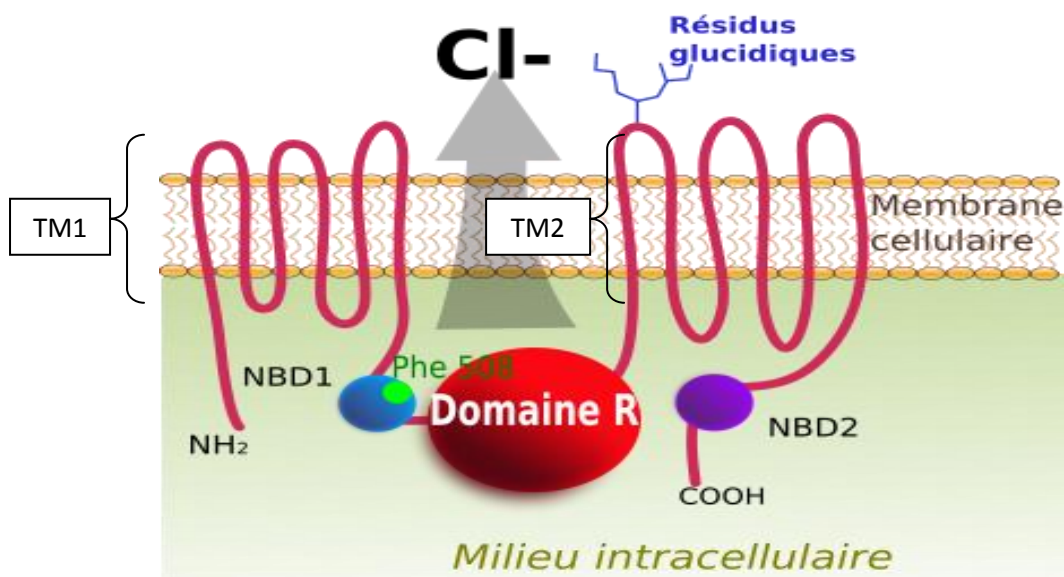


Figure 6 : Structure de la protéine CFTR (23)

2.4.2 Fonctions de la protéine CFTR

Les fonctions de la protéine CFTR sont nombreuses. Sa principale fonction est de former un canal ionique spécifique des ions chlorures assurant leur sortie de la cellule épithéliale selon le gradient électrochimique (24).

Les deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 forment les pores du canal. Trois étapes sont nécessaires pour provoquer l'ouverture de ce canal (Figure 7). Dans un premier temps, il y a phosphorylation des résidus sérines du domaine régulateur « R » par la protéine kinase A qui est activée par l'AMP cyclique (étape 1 sur la figure 7). Cette étape permet de rendre accessible l'entrée intracellulaire du canal. La seconde étape consiste en une interaction entre la protéine ainsi phosphorylée et l'ATP intracellulaire au niveau des domaines NBD 1 (ou SFN1) et NBD 2 (ou SFN2) (étape 2). L'hydrolyse de l'ATP ainsi fixée permet le cycle ouverture-fermeture du canal chlore (étape 3). L'hydrolyse par NBD 1 provoque l'ouverture du canal tandis que l'hydrolyse par NBD2 provoque la fermeture du canal (25).

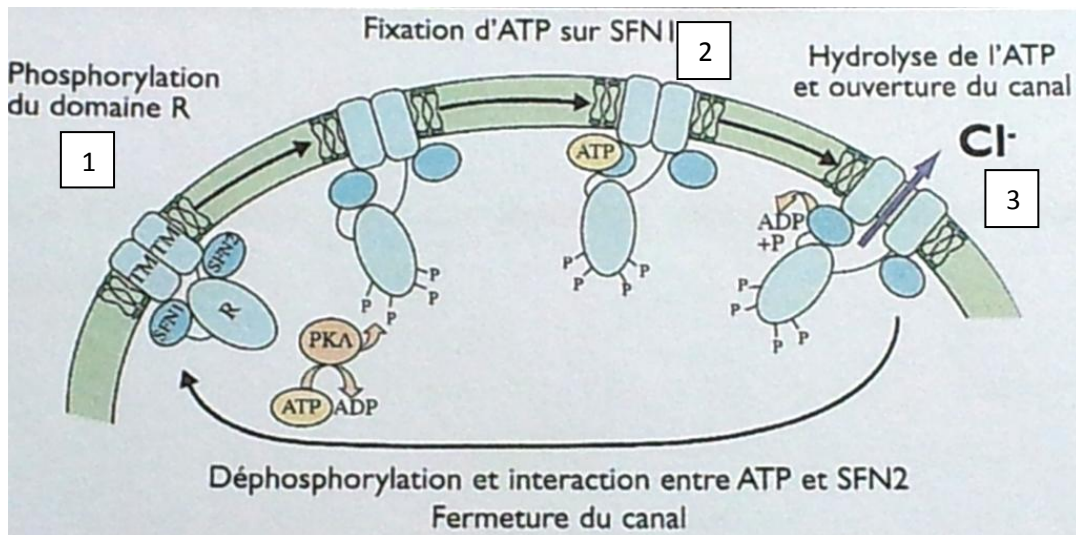


Figure 7 : Fonctionnement du canal chlore CFTR (25)

La protéine CFTR possède d'autres fonctions. Ainsi, elle régule le fonctionnement de deux canaux ioniques situés sur la cellule épithéliale : les canaux ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) et ENac (Epithelial Na Channel) (24).

3 Manifestations cliniques

La mucoviscidose est une maladie qui affecte les épithéliums glandulaires de très nombreux organes. Les symptômes seront donc nombreux (Figure 8).

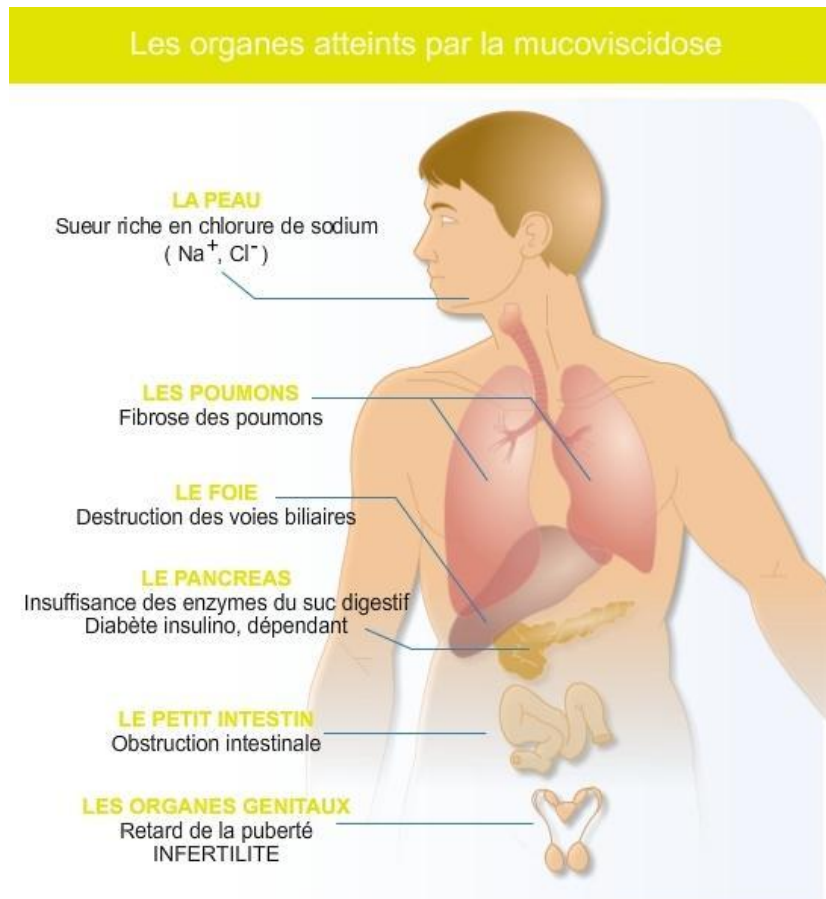


Figure 8 : Organes touchés au cours de la mucoviscidose (3)

3.1 L'atteinte respiratoire

Chez les patients atteints de mucoviscidose (= patients MV), les manifestations broncho-pulmonaires sont au premier plan de la maladie (26). L'atteinte respiratoire est la plus grave, elle est responsable de la majeure partie de la mortalité et de la morbidité (27). La fonction respiratoire s'aggrave progressivement avec l'âge. En effet, dès les premières années

de vie surviennent des infections broncho-pulmonaires qui endommagent le parenchyme pulmonaire conduisant ainsi à une insuffisance respiratoire (28).

3.1.1 Physiopathologie respiratoire

3.1.1.1 Le liquide de surface bronchique = mucus

Pour mieux comprendre l'atteinte respiratoire, il faut savoir que le liquide de surface bronchique qui est composé de deux phases, une phase aqueuse périciliaire surmontée d'une phase gel riche en mucines, est l'élément central de cette atteinte. La protéine CFTR joue un rôle important dans la composition de ce liquide. En effet, en son absence ou en cas d'altération, les transports transépithéiaux ne se font pas correctement et le liquide de surface est modifié (29).

En présence d'un mucus « normal », les particules inhalées (microbiennes et non) se déposent dans la phase gel où elles restent piégées. Les cils battent dans la phase aqueuse et leur extrémité affleure la partie inférieure de la phase gel. Ce mouvement permet ainsi l'évacuation des particules inhalées vers la lumière bronchique. Pour un mouvement correct des cils et donc une activité efficace, la hauteur de la phase aqueuse est primordiale. Si elle est trop importante, les cils ne peuvent plus mobiliser la phase gel. Si elle est trop réduite, les cils sont englués dans la phase gel (Figure 9). Dans les deux cas de figure, l'efficacité du système d'épuration mucociliaire est compromise (29).

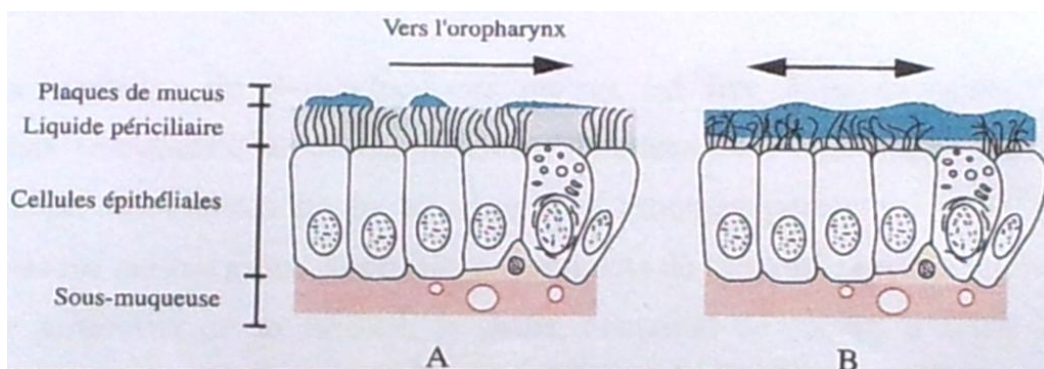


Figure 9 : Le liquide de surface bronchique dans les voies aériennes normales (A) et dans celles de malades atteints de mucoviscidose (B) (25)

La régulation du volume de la phase aqueuse se fait par des mouvements hydriques et électrolytiques à travers les cellules épithéliales. La composition du liquide de surface bronchique résulte d'un équilibre entre les processus de sécrétion et de réabsorption d'eau, d'ions chlorures et d'ions sodium (29).

3.1.1.2 Les infections bronchiques

Chez les patients MV, la survenue d'infections broncho-pulmonaires est pratiquement constante et conditionne le pronostic vital (30). Tous les types d'agents infectieux peuvent être identifiés : bactériens, viraux (*virus influenzae*, *parainfluenzae* et le virus respiratoire syncytial,...) et fongiques (*Aspergillus fumigatus*,...) (31). En ce qui concerne les agents bactériens, deux microorganismes dominent successivement ou simultanément : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus* est généralement le premier pathogène isolé, le plus souvent dans la petite enfance (30). *P. aeruginosa*, quant à lui, colonise les voies respiratoires de façon plus tardive, vers l'âge de 10 ans (32).

3.1.1.3 L'inflammation bronchique

L'inflammation bronchique occupe une place importante dans la physiopathologie de l'atteinte respiratoire. Corrélée au phénomène d'infection, elle favorise l'altération du mucus et de la muqueuse bronchique. Cette inflammation est précoce et peut être mise en évidence dès les premiers mois de vie. Différentes cellules sont impliquées dans cette inflammation : les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiques et les polynucléaires neutrophiles (33). Un afflux massif de polynucléaires neutrophiles provoque une inflammation des voies respiratoires (34). L'interleukine 8 (IL-8), facteur chimio-attractant pour les polynucléaires neutrophiles, est retrouvée à un taux très élevé dans les sécrétions bronchiques des patients MV. Les mécanismes par lesquels les polynucléaires neutrophiles contribuent aux lésions inflammatoires sont nombreux. Par exemple, lorsqu'ils sont activés, ils génèrent des radicaux oxygénés hautement réactifs dont la toxicité contribue aux lésions tissulaires (33).

Les polynucléaires neutrophiles vont également libérer de nombreuses protéases qui dégradent le parenchyme pulmonaire. Elles appartiennent à deux familles : les sérines-protéases (comme l'élastase leucocytaire et la cathepsine G inhibées par l'alpha 1-antitrypsine

et l'inhibiteur bronchique (SLPI) et les métalloprotéinases (inhibées par l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases (TIMP)). Ces enzymes protéolytiques peuvent détruire de nombreux substrats : élastine, cils, immunoglobulines, complexes immuns, fractions du complément...(33)

3.1.2 Manifestations respiratoires

L'atteinte pulmonaire est précoce et peut apparaître dès les premiers mois de vie. L'atteinte initiale est souvent peu marquée, puis une infection bronchique chronique s'installe progressivement. L'évolution se fait par poussées et conduit peu à peu à l'insuffisance respiratoire chronique à l'âge adulte (34). Les manifestations cliniques respiratoires sont peu spécifiques. Chez le nourrisson et le jeune enfant, il s'agit le plus souvent de bronchites récidivantes avec une toux sèche persistante entre les épisodes. Chez l'enfant plus âgé, la symptomatologie est dominée par une toux grasse témoin d'une obstruction bronchique. On peut observer une déformation thoracique débutante (thorax globuleux et cyphose dorsale) et un hippocratisme digital. Ces deux signes précèdent très souvent l'insuffisance respiratoire (35). Des hémoptysies de faible abondance sont possibles. Une fois installée, l'atteinte broncho-pulmonaire est définitive. Les poussées de surinfections aggravent la symptomatologie fonctionnelle respiratoire et on observe alors une altération de l'état général, avec une asthénie, une diminution de l'appétit et une perte de poids (34).

Il est primordial pour le suivi de la fonction respiratoire et pour l'identification des poussées de surinfections de réaliser des examens complémentaires (34) :

- Les mesures des paramètres de la fonction respiratoire

Le suivi de la fonction respiratoire permet de surveiller l'évolution de l'atteinte respiratoire, de mesurer la dégradation fonctionnelle et d'évaluer l'effet des thérapeutiques appliquées (35).

La spirométrie évalue la fonction respiratoire. Cette technique permet de mesurer les débits maximaux : *i*) le volume expiré maximal en une seconde (VEMS), *ii*) le débit expiratoire médian entre 25 et 75 % de la capacité vitale (DEM 25-75). Elle permet aussi la

mesure des volumes pulmonaires : *i*) la capacité vitale forcée (CVF), *ii*) le volume résiduel (VR), *iii*) la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) et *iv*) la capacité pulmonaire totale (CPT) (Tableau II). Les tests fonctionnels explorant les voies aériennes de petit calibre sont perturbés en premier, notamment le DEM 25-75. On observe ensuite une diminution du VEMS du fait de l'obstruction bronchique. La mesure du VEMS a une très bonne valeur prédictive puisqu'un VEMS inférieur à 30 % fait craindre un risque de décès, dans les deux ans, supérieur à 50 % (35).

Tableau II : Valeurs normales moyennes des paramètres respiratoires chez un homme de 40 ans mesurant 1,75 m (36)

Paramètres respiratoires	Valeurs normales (en mL)
Volume expiré maximal en une seconde (VEMS)	3900
Débit expiratoire médian entre 25 et 75 % de la capacité vitale (DEM 25-75)	4,4
Capacité vitale forcée (CVF)	4900
Volume résiduel (VR)	3400
Capacité résiduelle fonctionnelle (CRF)	3400
Capacité pulmonaire totale (CPT)	6900

- L'évaluation radiologique

La réalisation de clichés radiologiques permet de suivre l'évolution de la bronchopathie chronique obstructive. Chez un même patient, la comparaison des images, d'une consultation à l'autre, est importante pour le suivi, le pronostic et l'analyse des effets thérapeutiques (35).

La tomodensitométrie thoracique rend possible l'obtention de coupes fines, avec des images très détaillées des structures bronchiques et du parenchyme pulmonaire (35).

- La surveillance bactériologique

L'étude des prélèvements des sécrétions respiratoires permet de caractériser les microorganismes responsables des infections broncho-pulmonaires et d'évaluer leur sensibilité aux antibiotiques. La surveillance est recommandée dès le diagnostic de mucoviscidose posé, à chaque consultation (entre 1 à 3 mois) selon l'âge et la gravité de l'atteinte respiratoire (37).

La surveillance bactériologique doit être régulière et adaptée afin de permettre la mise en place d'un traitement antibiotique (37). Plusieurs types de prélèvement sont possibles :

- ❖ L'ECBC (Examen CytoBactériologique des Crachats)

L'analyse des expectorations par ECBC, rend possible la détection d'une infection bronchique et sa surveillance. La numération des bactéries peut se faire au moyen d'un ECBC quantitatif. La détection de faibles quantités de bactéries ($< 0,001$ UFC/mL) permet une action précoce, tant que l'inoculum bactérien est peu important. On peut ainsi espérer une rémission après traitement (38).

La fréquence des ECBC est mensuelle chez un enfant dont l'état respiratoire se dégrade et chez lequel on redoute une infection à *P. aeruginosa*. Elle est également mensuelle après une primo-infection à *P. aeruginosa*, tandis que chez un sujet infecté de façon chronique, elle est trimestrielle (38).

Lors d'une exacerbation clinique, un ECBC est réalisé systématiquement (38). Concrètement, à l'hôpital Femme-Mère-Enfant de Bron, un ECBC est réalisé tous les mois jusqu'à l'âge de 6 mois puis tous les 2 mois jusqu'à l'âge d'un an. Par la suite, un ECBC est pratiqué tous les 3 mois.

- ❖ L'écouvillonnage pharyngé ou l'aspiration naso-pharyngée.

On utilise ce type de prélèvement chez des patients qui n'expectorent pas spontanément (37). L'écouvillonnage pharyngé se fait au fond de la gorge, avec un écouvillon en alginate additionné de milieu de transport (39). Les prélèvements sont cependant critiqués, car réputés non représentatifs de la flore pulmonaire et souvent contaminés par la flore oropharyngée.

❖ Le LBA (lavage broncho-alvéolaire)

C'est le prélèvement bactériologique de référence. Cependant, cet examen est invasif, il nécessite souvent une sédation et n'est pas indemne de morbidité (37). Il est donc peu réalisé. On l'utilise en cas de dégradation de l'état respiratoire clinique ou radiologique si les ECBC ne révèlent rien d'anormal, ou lorsque le recueil des sécrétions bronchiques est difficile (38).

Des expectorations induites peuvent être obtenues après inhalation de sérum salé hypertonique, notamment chez les patients qui n'expectorent pas. Cette technique est sûre, simple, non invasive et reproductible pour l'obtention de sécrétions siégeant au niveau des voies respiratoires basses. Il est alors possible de distinguer une infection des voies aériennes basses d'une colonisation des voies aériennes hautes. Le traitement antibiotique sera ainsi plus approprié. De plus, cette technique fournit un rendement microbiologique similaire au LBA, tout en étant moins invasive (40).

L'un des trois rôles reconnus de la kinésithérapie respiratoire dans la mucoviscidose est l'aide au prélèvement de sécrétions bronchiques pour des analyses bactériologiques. Ainsi, le kinésithérapeute peut recueillir, lors de la séance, les sécrétions en vue de leur étude cytobactériologique (41). Il est préférable de recueillir les sécrétions au milieu ou à la fin de la séance. Ceci permet de connaître la flore siégeant au niveau des bronches profondes (42).

La surveillance microbiologique de la flore bronchique est essentielle. Classiquement, on recherche la présence de *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa*. La détection précoce de *P. aeruginosa* permet son éradication. Le passage à la chronicité est ainsi retardé. Il est également nécessaire de surveiller l'apparition des *Burkholderia* du complexe *cepacia* pour prévenir la contamination croisée par des souches épidémiogènes et limiter la morbidité associée à ces bactéries. Les variants à petites colonies de *S. aureus*, formes quiescentes intracellulaires, doivent être mis en évidence pour la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. Il est possible de rechercher divers bacilles à Gram négatif non fermentants et *Nocardia* spp, dont l'impact clinique est incertain. Des mycobactéries atypiques, principalement celles appartenant aux complexes *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium avium-intracellulare*, peuvent être isolées dès la petite enfance.

Leur recherche doit être effectuée au moins une fois par an, chez les patients sans facteurs de risque identifiables, à la demande du clinicien (39).

La surveillance de la colonisation des poumons des patients MV par des espèces de champignons filamenteux est primordiale. Plusieurs espèces peuvent être mises en évidence : *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus terreus* et *Exophiala dermatitidis* (39).

Suite à une transplantation pulmonaire, certaines bactéries comme les *Burkholderia* du complexe *cepacia*, ou des champignons (*Aspergillus*, *Scedosporium*), sont responsables de complications infectieuses systémiques. Il est alors nécessaire, lors de l'évaluation des dossiers de greffe, de prendre en compte deux critères : la connaissance du statut des patients vis-à-vis de ces microorganismes et la sensibilité aux anti-infectieux de ces derniers (39).

Une exacerbation se définit par la survenue d'un épisode aigu de détérioration clinique sur un état stable (37). Les symptômes respiratoires sont majorés (43). Chez le patient MV, plusieurs critères cliniques peuvent attester d'une exacerbation :

- une majoration de la toux ;
- une augmentation de l'expectoration (en volume et en purulence) ;
- une diminution de la tolérance à l'effort ou du niveau d'activité physique ;
- une perte de poids ou une diminution de l'appétit ;
- une diminution de la fonction respiratoire (VEMS et CVF) (37).

Il semblerait que les infections virales, notamment celle par le virus respiratoire syncytial, puissent jouer un rôle dans la survenue du phénomène (43).

Les exacerbations pulmonaires sont associées à l'acquisition de nouveaux microorganismes ou à un changement de la densité de bactéries au niveau de la flore du patient. Ainsi, la concentration de *P. aeruginosa* augmente lors d'une exacerbation. La mise en place d'un traitement antibiotique permet de diminuer la concentration en bactéries, de réduire les symptômes et d'améliorer la fonction pulmonaire. De nombreuses études suggèrent que la majorité des exacerbations ne sont pas dues à l'acquisition de nouvelles souches de cette bactérie, mais à une expansion clonale de souches déjà présentes ou à l'acquisition d'un nouveau génotype. Les autres espèces bactériennes, habituellement isolées de patients MV participent également à la survenue d'exacerbations pulmonaires (*S. aureus*,

H. influenzae, *Burkholderia cepacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*) (43).

Du fait d'une augmentation de la concentration en bactéries et en polynucléaires neutrophiles, une réponse inflammatoire se met en place. Ainsi, des médiateurs de l'inflammation sont produits : IL-8, IL-6, TNF α (43).

Le taux d'exacerbation augmente avec l'âge et avec la détérioration de l'état pulmonaire. C'est un marqueur important de la sévérité de la maladie (43).

Des études ont montré que les mucolytiques, les aminoglycosides et le sérum salé hypertonique par voie inhalée ainsi que les macrolides par voie orale réduisent le taux d'exacerbations pulmonaires chez les patients MV (43).

La prise en charge thérapeutique d'une exacerbation nécessite l'administration d'antibiotiques par voie IV. Un traitement agressif, mis en place dès les premiers signes, améliore le devenir à long terme des patients (43).

3.2 L'atteinte digestive

L'atteinte digestive touche le tube digestif proprement dit, mais également les glandes annexes telles que le pancréas, le foie et les voies biliaires. Les propriétés d'absorption, de digestion et de motricité sont modifiées tout au long du tractus digestif (44).

3.2.1 Les manifestations pancréatiques

3.2.1.1 L'insuffisance pancréatique exocrine

C'est une manifestation clinique classique de la mucoviscidose puisqu'elle est présente chez plus de 85 % des patients (44).

3.2.1.1.1 Physiopathologie

Les lésions au niveau des tissus du pancréas sont nombreuses. On observe une obstruction des canaux proximaux par des sécrétions visqueuses, des acini peu développés ou détruits, une surcharge graisseuse, une fibrose et progressivement la destruction du tissu pancréatique (45).

Le dysfonctionnement de la protéine CFTR au niveau de l'épithélium du pancréas explique l'hyperviscosité des sécrétions pancréatiques. Ces dernières sont appauvries en eau et en bicarbonates, du fait d'une diminution des échanges chlorures/bicarbonates, sous le contrôle du canal CFTR. Les sécrétions vont obstruer les canaux pancréatiques ; les enzymes pancréatiques ne sont donc plus correctement excrétées dans la lumière intestinale. Le tissu adipeux est progressivement remplacé par un tissu fibreux (46).

3.2.1.1.2 Manifestations cliniques

L'insuffisance pancréatique exocrine se caractérise par un syndrome de malabsorption des graisses et des protéines, entraînant une stéatorrhée c'est-à-dire une émission de selles anormalement graisseuses et des douleurs abdominales. On observe également des carences en vitamines liposolubles (A, D, E et K) et en acides gras essentiels (44). L'insuffisance pancréatique exocrine entraîne une maldigestion qui retentit sur l'état nutritionnel, responsable chez l'enfant d'un retard staturo-pondéral et pubertaire et chez l'adulte, d'un déficit pondéral. Le déficit en enzymes protéolytiques engendre une maldigestion protéique, contribuant à la dénutrition (46).

3.2.1.2 L'insuffisance pancréatique endocrine

Les progrès de la prise en charge, donc l'allongement de l'espérance de vie, provoquent l'apparition de nouveaux aspects de la maladie comme le diabète (47) qui se déclare en moyenne, à l'âge de 20 ans. Le diabète touche 1/3 des patients après 20 ans et la moitié des patients après 30 ans (48).

La destruction des îlots β de Langerhans entraîne un diabète insulino-dépendant. Cette destruction est causée par la fibrose progressive du pancréas et des phénomènes ischémiques (48).

Il est important de réaliser une hyperglycémie provoquée par voie orale une fois par an, à partir de 10 ans, pour dépister le plus précocement possible un diabète (47). Le diabète reste le plus souvent asymptomatique pendant plusieurs années, avant de se manifester par un tableau clinique classique : syndrome polyuro-polydipsique avec amaigrissement malgré une intervention nutritionnelle intense. L'apparition du diabète peut être précipitée par divers facteurs aggravants comme les surinfections pulmonaires et la corticothérapie (49).

Le diabète est responsable d'une atteinte pulmonaire plus sévère et de surinfections plus fréquentes. Il constitue donc un signe d'aggravation de la mucoviscidose. L'emploi de l'insulinothérapie permet d'améliorer le tableau clinique du patient (47).

3.2.2 Les manifestations digestives

3.2.2.1 L'iléus méconial

Le méconium correspond aux matières intestinales visqueuses brunâtres ou verdâtres que le nouveau-né expulse peu après sa naissance.

L'iléus méconial est la manifestation la plus précoce de la mucoviscidose. Il est révélateur de la maladie dans 10 à 15 % des cas (44). Il s'agit d'une occlusion intestinale néonatale due à l'absence de progression du méconium au niveau de l'iléon terminal. Le méconium est trop visqueux du fait d'une sécrétion protéolytique insuffisante par le pancréas et les glandes intestinales. Cette occlusion s'accompagne d'une distension abdominale et de vomissements bilieux (46). La prise en charge sera médicale par un lavement aux hydrosolubles (45).

3.2.2.2 Le syndrome d'obstruction intestinale distale (SOID)

C'est une pathologie spécifique de la mucoviscidose équivalente à l'iléus méconial, mais qui apparaît plus tardivement. Il s'agit d'une obstruction plus ou moins complète de l'intestin grêle (44). Le patient se plaint de crampes au niveau de la fosse iliaque droite. Ces douleurs s'accompagnent d'une distension abdominale, d'une anorexie, d'une perte de poids

variable, d'un arrêt du transit et de vomissements répétés (46). L'absorption de solutions laxatives est le principal traitement de cette pathologie (45).

3.2.2.3 La constipation

C'est un symptôme fréquent chez les patients MV et sa fréquence est majorée avec l'âge (45). Il est important de distinguer cette constipation du SOID. Le transit intestinal doit être apprécié à chaque visite (46). La constipation est favorisée par un surdosage en extraits pancréatiques, mais elle ne doit pas être traitée par une réduction de posologie de ces extraits (50). La prise en charge, analogue à celle des patients non atteints de mucoviscidose, se fait par l'administration de préparations laxatives (46).

3.2.2.4 Le reflux gastro-œsophagien (RGO)

Dans la mucoviscidose, le RGO est fréquent : il touche 25 % des patients de tous âges et environ 80 % des adultes (50). Il peut contribuer à la diminution des prises alimentaires et à la dégradation de l'état nutritionnel et il est susceptible de majorer la symptomatologie respiratoire (46).

Le RGO est favorisé par la distension thoracique et la toux. Les patients se plaignent de pyrosis et de régurgitations (50). Sa recherche doit être systématique lorsque l'état respiratoire s'aggrave de façon inexplicée (45).

3.2.3 Les manifestations hépatiques

Le dysfonctionnement de la protéine CFTR est responsable d'une augmentation de la viscosité de la bile qui obstrue les canaux biliaires, entraînant ainsi des lésions hépatiques. La lésion hépatique typique de la mucoviscidose est la cirrhose biliaire focale, pour laquelle il y a présence d'un matériel granuleux éosinophilique dans les canaux biliaires. La cirrhose peut progresser jusqu'à atteindre le stade de la cirrhose biliaire multilobaire. L'hépatomégalie est la principale manifestation de la cirrhose. Des complications peuvent apparaître : une hypertension portale s'aggravant éventuellement d'hémorragies par rupture de varices œsophagiennes et une insuffisance hépatique (51). L'atteinte hépatique apparaît le plus

souvent au cours des dix premières années de vie. Il est important de réaliser un bilan hépatique et une échographie abdominale chaque année (52).

3.3 Les autres atteintes

3.3.1 Les manifestations ORL

Pratiquement tous les patients MV présentent des atteintes naso-sinusiennes. Les symptômes débutent le plus souvent entre 5 et 14 ans.

La présence de polypes naso-sinusiens provoque une obstruction. Un polype est une formation charnue de la muqueuse du nez ou des sinus, qui entraîne une sensation de nez bouché. Les polypes sont le plus souvent bilatéraux et de localisation multiple. On observe également des sinusites à répétition qui peuvent se traduire par des maux de tête persistants, des douleurs orbitaires, des hémoptysies et de la rhinorrhée. La muqueuse nasale est congestive et érythémateuse. Le traitement de cette atteinte se fait à l'aide d'une corticothérapie locale et d'un lavage des fosses nasales (53).

3.3.2 Les manifestations ostéo-articulaires

Chez les patients MV, la survenue d'ostéoporose est fréquente. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer : une diminution de l'absorption digestive du calcium, des taux bas de vitamine D, une dégradation de l'état nutritionnel ou encore des traitements prolongés aux corticoïdes. L'ostéoporose exposant les patients à un risque de fracture plus important, le dépistage doit être régulier par la réalisation d'une ostéodensitométrie. Le traitement repose sur une supplémentation vitamino-calcique et sur l'utilisation de biphosphonates par voie IV dans certains cas (49).

Les patients MV présentent également des manifestations articulaires. Parmi elles, on note les arthrites épisodiques de la mucoviscidose pouvant durer d'un jour à plusieurs semaines et qui ont une répartition symétrique. L'ostéo-arthropathie hypertrophiant pneumique provoque des douleurs au niveau des os longs et la cyphose dorsale qui entraîne des rachialgies (54).

3.3.3 L'atteinte génitale

Chez les patients MV, la puberté est retardée pour les deux sexes (49). Chez l'homme, la stérilité est constatée dans plus de 95 % des cas. Elle est obstructive. Les testicules produisent des spermatozoïdes normaux mais les canaux déférents par lesquels ils cheminent n'existent pas (agénésie des canaux) ou sont interrompus (dysgénésie des canaux) (55). Chez la femme, il n'est pas constaté de stérilité. On parle plutôt d'une baisse de la fertilité. Il n'y a pas d'anomalie morphologique de l'appareil génital mais c'est la glaire cervicale qui est modifiée. En effet, celle-ci étant épaissie et pauvre en eau, elle rend difficile la montée des spermatozoïdes vers l'utérus. Une grossesse est envisageable en s'assurant au préalable que l'état nutritionnel et respiratoire de la femme sont corrects (49).

4 Diagnostic de la mucoviscidose

Les manifestations respiratoires et/ou digestives en plus d'un retentissement sur la croissance font évoquer le diagnostic de mucoviscidose. Dans 70 % des cas, le diagnostic est réalisé avant l'âge d'un an et dans 86 % des cas avant l'âge de cinq ans (56), mais il peut également être posé à l'âge adulte ; c'est le cas pour 3 % des patients MV. Ce diagnostic tardif s'explique par des mutations génétiques plus rares n'entraînant pas de pathologies pulmonaires sévères (57).

4.1 Diagnostic néonatal de la mucoviscidose (DNM)

Après plusieurs expériences dans certaines régions françaises comme la Normandie, la Bretagne, le Centre et les Pays de la Loire, la France est devenue en 2002 le premier pays au monde à généraliser le dépistage néonatal de la mucoviscidose (DNM) (58).

4.1.1 Le dépistage de la Trypsine ImmunoRéactive (TIR)

Le dépistage de la mucoviscidose se fait, en première intention, par un dosage sanguin de la TIR, proenzyme sécrétée par le pancréas. Le prélèvement de sang capillaire s'effectue

72 heures après la naissance, à l'aide d'une microlancette, au bord externe du talon. Le sang est ensuite déposé sur un papier buvard ou carton de Guthrie pour analyse (59).

Chez les patients MV, les premières heures de vie sont associées à un taux élevé de TIR sanguine. C'est la conséquence du passage du trypsinogène dans le sang du fait de l'obstruction des acini pancréatiques (56). Le prélèvement de sang est adressé au laboratoire régional de dépistage pour dosage de la TIR (59). Deux techniques de mesures sont validées : un dosage radio immunologique par compétition et un dosage en excès d'anticorps avec détection par mesure de fluorescence en temps résolu (60). La valeur seuil d'alerte de la TIR à 72 heures est fixée à 55 µg/L. Ce dépistage présente une bonne sensibilité mais une spécificité insuffisante qui est à l'origine de trop nombreux cas de faux positifs. Afin de confirmer le diagnostic, ce test doit être couplé à la biologie moléculaire pour l'étude du gène *cftr* (Figure 10) (59).

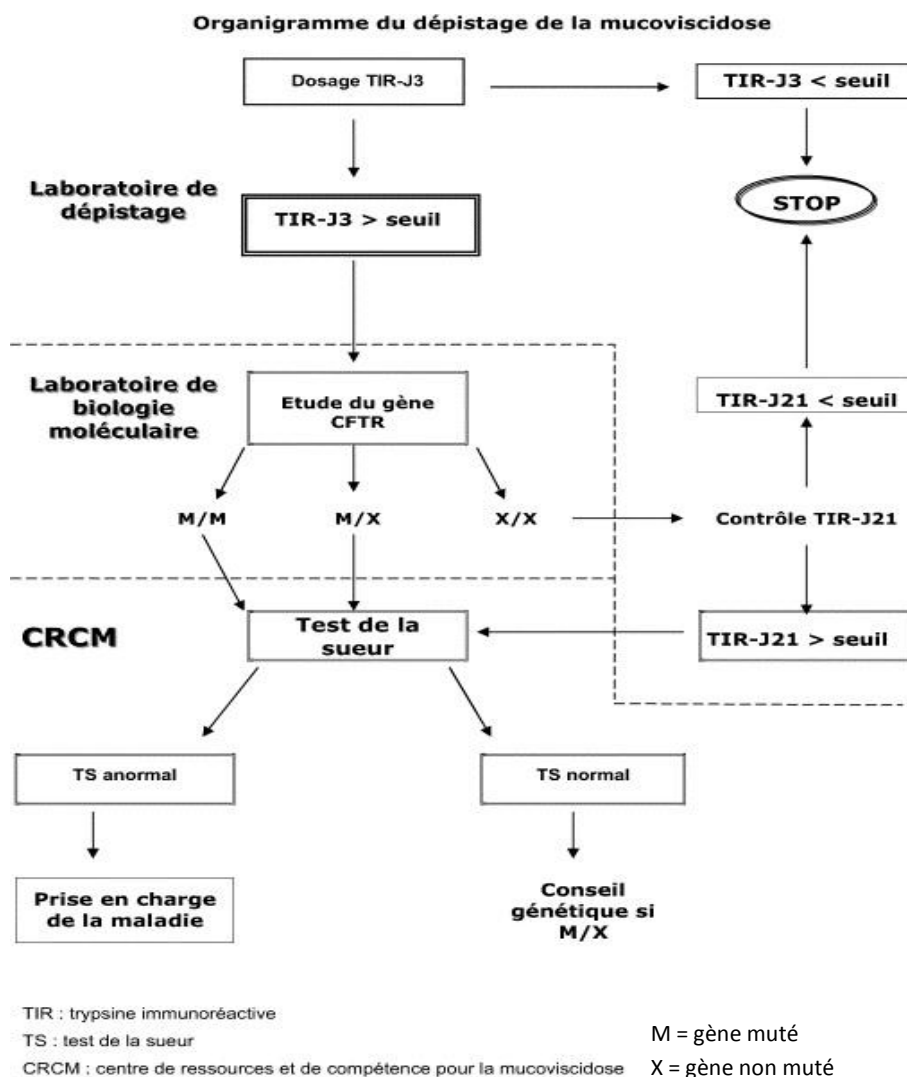


Figure 10 : Organigramme de dépistage de la mucoviscidose (59)

4.1.2 La recherche de mutations

La loi de bioéthique exige, lors de la réalisation d'une étude génétique, le consentement écrit et éclairé des parents. Il est recueilli dès le premier prélèvement effectué sur leur enfant (prélèvement de dépistage). Les parents donnent un accord anticipé et apposent leur signature directement sur le papier buvard de dépistage. Ce document est conservé au laboratoire régional de dépistage. La recherche de mutation n'est effectuée qu'en cas de dépistage positif (61).

La recherche de mutations se fait par une technique d'amplification spécifique (59). Trois cas de figure sont alors possibles (Figure 10) :

- l'enfant est porteur de deux mutations : il a la mucoviscidose, confirmée par la positivité du test de la sueur et il sera pris en charge par un centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM) (59) ;
- l'enfant est porteur d'une seule mutation, il subit un test de la sueur :
 - s'il est positif, l'enfant est pris en charge par un CRCM ;
 - s'il est négatif, l'enfant est hétérozygote simple donc non malade (59) ;
- l'enfant n'est porteur d'aucune mutation mais le taux sanguin de TIR est élevé. Dans ce cas, l'enfant est convoqué à la maternité à trois semaines de vie pour un nouveau dosage sanguin de TIR. Si ce dosage révèle un taux de TIR au dessus de la valeur seuil fixée à 40 µg/L, l'enfant est adressé au CRCM pour réalisation d'un test de la sueur (59).

4.1.3 Le test de la sueur

Le test de la sueur est l'examen de référence, il est indispensable pour confirmer le diagnostic de mucoviscidose. Ce test est réalisé par un personnel qualifié et entraîné, dans un laboratoire spécialisé. Il a été démontré que la sueur des patients MV présente une concentration en électrolytes anormalement élevée. En effet, le dysfonctionnement de la protéine CFTR située au niveau des glandes sudoripares cause un défaut d'absorption de chlore et de sodium. Ceci entraîne un syndrome de perte de sel sudoral (9).

Le test consiste à mesurer la concentration en chlore d'un échantillon de sueur d'au moins 100 mg. L'échantillon de sueur est recueilli par iontophorèse à la pilocarpine. Cette méthode utilise un ampèremètre à ionisation muni de deux électrodes qui va permettre la

pénétration transcutanée de la pilocarpine, substance cholinergique, qui va stimuler les glandes sudoripares. On dépose au niveau de la zone de prélèvement (en général, face interne du bras), un papier filtre pour recueillir la sueur. Le papier est maintenu une heure et il est recouvert d'un pansement occlusif pour éviter tout risque d'évaporation (62).

A partir de l'échantillon de sueur obtenu, on détermine le taux de chlorures. Si ce taux est inférieur à 40 mmol ou mEq/L, le test à la sueur est considéré comme normal. Si ce taux est supérieur à 60 mmol/L, le test est positif. Pour des valeurs comprises entre 40 et 60 mmol/L, le résultat est douteux. Un nouveau test sera réalisé (58).

Le test de la sueur a une grande valeur prédictive, mais il peut être mis en défaut, en particulier lorsque la mesure est difficile ou si les résultats sont proches de la normale. On peut alors utiliser une autre méthode spécialisée : la mesure de différence de potentiel (DDP) au niveau de la muqueuse nasale. Les transports actifs d'ions à travers l'épithélium des voies aériennes génèrent une DDP transépithéliale mesurée avec un voltmètre. On peut ainsi apprécier les altérations du transport d'ions chlorures et sodium causées par le dysfonctionnement de la protéine CFTR. Chez les patients MV, la DDP nasale est deux fois plus élevée que chez les sujets sains (58).

4.1.4 Les bénéfices du dépistage

Avant la généralisation du dépistage néonatal, le diagnostic de mucoviscidose était difficile. La mise en place du DNM a permis un dépistage précoce, en identifiant 98 % des cas avant l'âge d'un mois, et l'orientation des patients vers un CRCM pour une prise en charge optimale (56).

De nombreux arguments sont en faveur d'un dépistage précoce de la mucoviscidose car il permet d'améliorer le développement staturo-pondéral et l'état nutritionnel et de diminuer la morbidité (59).

4.2 Diagnostic anténatal (ou prénatal)

Ce type de diagnostic est proposé dans deux cas de figure :

- un enfant est déjà atteint dans la fratrie ou l'un des membres du couple est apparenté à un sujet atteint (58) ;
- des anomalies échographiques sont observées au niveau du tube digestif durant la vie fœtale (63).

Dans le premier cas, si les parents ne connaissent pas leur génotype, la recherche de mutation est indispensable. Si les deux parents sont hétérozygotes, l'équipe médicale propose un diagnostic prénatal. Ce dernier est réalisé par biopsie de trophoblastes à 11 semaines d'aménorrhée ou par amniocentèse si la recherche est plus tardive (9). Les parents doivent donner leur consentement écrit et éclairé. Ils doivent également évoquer leur attitude en cas de découverte d'un fœtus atteint : poursuite ou non de la grossesse (interruption médicale de grossesse = IMG) (64).

Dans le deuxième cas, les anomalies observées à l'échographie n'étant pas spécifiques de la mucoviscidose, un diagnostic prénatal est proposé. En effet, on peut également observer des anomalies à l'échographie, en cas de trisomie 21 ou d'infection par le cytomégalovirus (63).

4.3 Diagnostic préimplantatoire

Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) permet la sélection d'embryons dépourvus d'anomalie génétique, en vue de leur transfert *in utero*. Pour avoir accès au DPI, il est nécessaire d'utiliser une méthode de procréation médicalement assistée (PMA) : la fécondation *in vitro* (FIV). L'équipe médicale réalise une ponction sur des embryons de trois jours. Le diagnostic de l'anomalie génétique se fait par biologie moléculaire. Seuls les embryons dépourvus de l'anomalie recherchée seront transférés *in utero* (65).

Cette technique permet d'éviter le recours au diagnostic prénatal et à l'avortement thérapeutique qu'il peut induire. Cependant, en raison du risque d'erreur de génotypage sur cellule unique, un diagnostic prénatal est toujours recommandé (65).

5 Prise en charge

La mise en place du dépistage néonatal de la mucoviscidose a nécessité la création des CRCM, accrédités par le Ministère de la Santé en avril 2002, pour un accompagnement optimal des patients dépistés et de leur famille. Chaque centre de soins regroupe des médecins, des infirmières, des kinésithérapeutes, des pharmaciens, des diététiciens mais également des assistantes sociales et des psychologues. En effet, la mucoviscidose étant une maladie aux multiples manifestations, sa prise en charge doit être pluridisciplinaire (3). Les missions des CRCM sont multiples :

- confirmation et explication du diagnostic pour les nouveaux dépistés ;
- définition de la stratégie thérapeutique ;
- coordination des soins ;
- activité de recherche ;
- mise en place d'une démarche d'évaluation (3).

5.1 Prise en charge respiratoire

5.1.1 La kinésithérapie respiratoire

L'objectif de cette technique est de désencombrer les voies aériennes. La kinésithérapie respiratoire fait partie intégrante de la prise en charge de la mucoviscidose (42). Elle joue trois rôles reconnus dans la mucoviscidose :

- permettre un drainage bronchique ;
- aider au prélèvement de sécrétions bronchiques pour des analyses bactériologiques ;
- permettre la surveillance du statut respiratoire (41).

La kinésithérapie respiratoire va augmenter la clairance mucociliaire par mobilisation des sécrétions et ainsi, rendre possible un désencombrement le plus profond possible. Ce drainage bronchique permet d'éviter la stase, donc l'accumulation de sécrétions dans l'arbre bronchique. Cette technique permet un déplacement progressif des sécrétions. La toux termine le travail du kinésithérapeute en évacuant les sécrétions récoltées dans les voies aériennes supérieures (42). Seules les techniques de désencombrement bronchique par modulation du flux respiratoire sont reconnues efficaces et recommandées. Par exemple, l'augmentation du

flux expiratoire peut être soit rapide, pour mobiliser les sécrétions siégeant dans les grosses bronches et la trachée, soit lente, pour mobiliser les sécrétions plus profondes (66).

Le kinésithérapeute par sa présence quotidienne surveille le statut respiratoire de son patient. Il peut détecter une exacerbation débutante en constatant l'aggravation de l'encombrement bronchique ou un aspect purulent inhabituel des crachats (41).

Les séances de kinésithérapie respiratoire doivent commencer dès le diagnostic de la maladie, même si les signes respiratoires paraissent mineurs. La fréquence des séances est variable. Pour les sujets peu encombrés et stables, une séance par jour suffit. Si l'encombrement bronchique est plus important et si la première séance ne suffit pas pour un désencombrement satisfaisant, il est nécessaire d'en pratiquer une seconde. La durée de la séance dépend du degré d'encombrement et de l'état de fatigue du patient. En général, elle dure entre 15 et 20 minutes (67).

5.1.2 L'aérosolthérapie

Cette technique permet l'administration, sous forme d'aérosols, de médicaments à visée pulmonaire directement au niveau de leur site d'action. L'efficacité et la rapidité d'action des médicaments sont augmentées, tout en limitant les effets secondaires systémiques (68).

Un aérosol est constitué d'une multitude de fines particules solides ou liquides en suspension dans l'air et leur taille conditionne leur lieu de dépôt. Les grosses particules, d'un diamètre supérieur à cinq micromètres, se déposent à la partie supérieure de l'arbre bronchique : oropharynx, voies aériennes supérieures, grosses bronches. Celles ayant un diamètre entre 0,5 et 0,6 micromètres progressent plus loin dans l'arbre bronchique et atteignent les voies aériennes distales et les poumons. Le lieu de dépôt des particules dépend également de la façon d'inhaler le nuage de médicament. Si le patient pratique un débit d'inspiration trop rapide, l'aérosol se dépose dans les voies aériennes supérieures. A l'inverse, s'il pratique une inspiration trop lente et profonde, le dépôt se fait dans les voies respiratoires basses. Il faut donc trouver un juste équilibre pour garantir l'efficacité de l'aérosol (69).

5.1.2.1 Les appareils de nébulisation

Trois principes de nébulisation sont utilisés pour produire un aérosol médicamenteux : la nébulisation pneumatique, la nébulisation ultrasonique et la nébulisation à membrane.

5.1.2.1.1 Les nébuliseurs pneumatiques

L'aérosol est produit grâce à une source de gaz comprimé provenant d'un compresseur d'air ou d'une prise murale à l'hôpital. L'air, entrant dans le nébuliseur, va ainsi atomiser la solution médicamenteuse présente dans le réservoir du nébuliseur. Les gouttelettes produites sont projetées sur un barreau d'impaction pour réduire leur taille. L'aérosol produit est alors inhalé par le patient (Figure 11). Les nébuliseurs pneumatiques peuvent accueillir tous types de médicaments, que ce soit des solutions, des suspensions ou des huiles. Ce type d'appareil comporte néanmoins des inconvénients : un niveau sonore parfois élevé et un encombrement conséquent de certains compresseurs (68).



Figure 11 : Nébuliseur pneumatique (70)

5.1.2.1.2 Les nébuliseurs ultrasoniques

L'aérosol est généré par la vibration à haute fréquence (de l'ordre du mégahertz) d'un quartz piézoélectrique, situé au fond de la cuve. Plus la fréquence de vibration du quartz est élevée, plus les particules sont de petites tailles (68).

Il existe deux types de nébuliseurs ultrasoniques (Figure 12) :

- les nébuliseurs ultrasoniques sans interface d'eau : la nébulisation se fait directement au contact du quartz. Pendant son fonctionnement, le quartz chauffe ce qui peut dégrader certaines molécules thermosensibles et ainsi compromettre leur efficacité (68) ;
- les nébuliseurs ultrasoniques avec interface d'eau : le médicament est contenu dans une coupelle jetable qui repose sur un réservoir d'eau. L'eau qui transmet les vibrations du quartz absorbe la chaleur et limite la hausse de température du médicament (68).

Les nébuliseurs ultrasoniques sont silencieux et peuvent générer de grande quantité d'aérosol. Cependant, ils ne peuvent pas accueillir les huiles et les suspensions. Ils ont également un encombrement assez important (68).

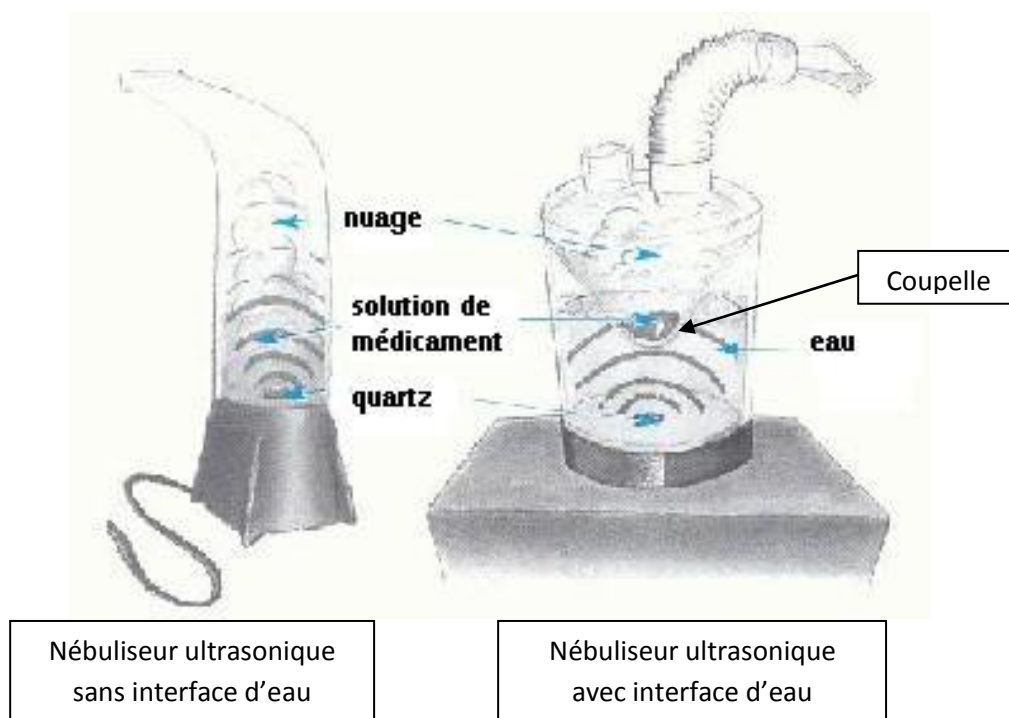


Figure 12 : Nébuliseur ultrasonique (70)

5.1.2.1.3 Les nébuliseurs à membrane

Ces appareils sont composés d'un boîtier électronique auquel est raccordé le nébuliseur. Au sein du nébuliseur, se trouve une membrane percée de nombreux trous de faible diamètre (de l'ordre du micromètre). Cette membrane est entourée d'un élément piézoélectrique entraînant sa vibration. La solution médicamenteuse passe à travers la membrane vibrante qui va ainsi transformée le liquide en gouttelettes (71).

Contrairement aux nébuliseurs ultrasoniques, l'appareil permet de nébuliser les solutions ou les suspensions sans entraîner d'élévation de température du médicament (71).

En France, le type d'appareil disponible est le e-Flow®rapid. Il possède de nombreux avantages : la durée d'inhalation est courte (entre 5 et 10 minutes), il est de petite taille, silencieux, facile à transporter et fonctionne sur batterie (Figure 13) (71).



Figure 13 : Nébuliseur e-Flow®rapid (71)

5.1.2.2 Les médicaments nébulisés

5.1.2.2.1 Les bronchodilatateurs

Les β 2-mimétiques peuvent être administrés dans le cadre de la mucoviscidose car ils améliorent les battements ciliaires et donc la clairance mucociliaire. Deux molécules sont utilisées : le salbutamol (VENTOLINE®) et la terbutaline (BRICANYL®) (41).

Les anticholinergiques tels que l'ipratropium (ATROVENT®) semblent avoir un effet néfaste sur la clairance mucociliaire car ils épaississent les sécrétions bronchiques et diminuent la toux (41).

Trois situations cliniques de la mucoviscidose peuvent justifier l'utilisation de bronchodilatateurs :

- lors d'exacerbations aiguës, les bronchodilatateurs de courte durée d'action améliorent clairement l'état clinique et le confort du patient (37) ;
- en période stable, les β 2-mimétiques de longue durée d'action peuvent être utilisés au long cours, selon la symptomatologie du patient, avec une surveillance régulière des fonctions respiratoires (37) ;
- avant une séance de kinésithérapie respiratoire, le drainage bronchique peut être facilité par une nébulisation de β 2-mimétique de courte durée d'action (37).

5.1.2.2.2 Les mucomodificateurs

Chez les patients MV, les sécrétions bronchiques sont très sèches et très visqueuses. Les mucomodificateurs, en rendant le mucus plus fluide, facilitent son évacuation lors du drainage bronchique.

5.1.2.2.2.1 La rhDNase ou dornase alfa : PULMOZYME®

PULMOZYME® est le premier médicament spécifique de la mucoviscidose. La rhDNase est une enzyme (désoxyribonucléase recombinante humaine), obtenue par génie génétique. La rhDNase est similaire à l'enzyme humaine endogène qui hydrolyse l'ADN extracellulaire. Cette molécule va donc cliver l'ADN libéré en grande quantité par les polynucléaires et les macrophages présents dans les sécrétions bronchiques. Ceci permet donc de diminuer la viscosité du mucus (41).

PULMOZYME® est inscrit sur la liste I des substances vénéneuses. Il est soumis à une prescription initiale hospitalière semestrielle. Il s'administre par l'intermédiaire d'un nébuliseur pneumatique ou à membrane vibrante. Ce médicament doit être conservé entre +2 et +8 °C. La posologie est de 2,5 mg, soit une ampoule par jour au long cours. Pour les patients âgés de 21 ans et plus, on peut augmenter la posologie à une ampoule deux fois par

jour (72). Il est recommandé de réaliser un drainage bronchique proximal (désencombrement des gros troncs bronchiques) avant la nébulisation de PULMOZYME®. La séance de kinésithérapie respiratoire peut être pratiquée 30 minutes après la nébulisation (37). L'administration de PULMOZYME® est à éviter le soir. La tolérance est bonne en général mais quelques effets indésirables ont été mis en évidence tels que des altérations de la voix ou des pharyngites (72).

5.1.2.2.2 Le sérum salé hypertonique

Le sérum salé hypertonique améliore les caractéristiques rhéologiques du mucus par deux phénomènes : soit par un effet osmotique, soit par un effet sur la structure moléculaire du mucus. Il augmente également la clairance mucociliaire (41).

5.1.2.2.3 La N-acétylcystéine

La N-acétylcystéine (MUCOMYST®) est un mucolytique qui, par rupture des ponts disulfures des mucoprotéines (dont les mucines), permet de fluidifier les sécrétions bronchiques, facilitant ainsi l'expectoration. La posologie est de 1 à 2 ampoule(s) de 5 mL par aérosol (73).

5.1.2.2.3 Les anti-inflammatoires

Au cours de la mucoviscidose, l'inflammation joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'atteinte respiratoire. On utilise principalement les corticoïdes avec pour objectif d'améliorer la fonction pulmonaire et de réduire l'hyperréactivité bronchique (74).

La principale spécialité utilisée est le PULMICORT® (budésonide) sous la forme d'un turbuhaler (inhalateur de poudre sans gaz propulseur). La posologie varie, chez l'adulte, de 200 à 400 microgrammes à raison de 2 à 4 fois par jour. Pour garantir une bonne inhalation du médicament, le patient doit d'abord réaliser une expiration profonde pour vider ses poumons, puis il effectue une inspiration rapide. Une fois la dose prise, le patient pratique une apnée d'une dizaine de secondes. Les corticoïdes, du fait de leurs propriétés immunosuppressives, peuvent être responsables de candidoses oropharyngées. Un rinçage de la bouche à l'eau, après l'inhalation, est donc recommandé (75).

5.1.2.2.4 Les antibiotiques

Seuls trois antibiotiques ont l'AMM pour administration en aérosol dans le cadre de la mucoviscidose : la tobramycine, la colimycine et l'amikacine (76).

5.1.2.3 La séance d'aérosolthérapie en pratique

Avant de préparer un aérosol, il est important de se laver soigneusement les mains. Il faut ensuite s'installer le plus confortablement possible, en position droite. Au niveau de l'interface, on privilégie les embouts buccaux pour que le médicament atteigne plus facilement les poumons. Dans le cas des nourrissons, l'emploi d'embout buccal est difficile, on utilise alors un masque qui englobe le nez et la bouche, mais la dose de médicament atteignant les poumons est diminuée. Le patient doit pratiquer de grandes inspirations permettant aux particules d'atteindre les voies aériennes profondes (76).

Une fois la séance d'aérosolthérapie terminée, il est essentiel de démonter entièrement le nébuliseur afin de nettoyer toutes les pièces. On procède ensuite à un rinçage abondant à l'eau chaude puis un séchage à l'aide d'un linge propre (77).

Le nébuliseur doit être désinfecté au moins une fois par semaine. On l'immerge pendant une heure dans de l'eau de Javel diluée à 12° puis il est rincé et séché. Des solutions désinfectantes sont à la disposition des patients comme MILTON® (2 bouchons ou un comprimé pour 5 litres d'eau froide) ou SOLUSTERIL® (2 comprimés dans 4 litres d'eau froide) (76).

5.1.3 L'antibiothérapie par voie générale

L'antibiothérapie est une stratégie essentielle dans le cadre de la mucoviscidose. Elle a pour objectif de prévenir, d'éradiquer ou de limiter toutes infections au niveau pulmonaire. Ces infections sont dues principalement à trois germes : *S. aureus*, *H. influenzae* et *P. aeruginosa*. Cependant, en raison de l'augmentation de la durée de vie des patients et de l'amélioration des méthodes de suivi et de diagnostic bactériologiques, de nouveaux microorganismes sont à présent identifiés (mycobactéries atypiques, bacilles à Gram négatif non fermentants,...). Le rôle pathogénique de ces derniers, restant parfois mal connu.

En l'absence d'antibiothérapie, l'infection par ces germes est précoce et délétère. En effet, de part la réaction inflammatoire qu'elle génère, l'infection entraîne la destruction du tissu pulmonaire (37). Chez les patients MV, les modalités de traitement par antibiotiques doivent être adaptées aux particularités pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments. Sur le plan pharmacocinétique, on note d'abord une augmentation du volume de distribution, puis une pénétration limitée des antibiotiques au sein du mucus et enfin une élimination des antibiotiques par voie rénale ou hépatique accrue. De ce fait, les posologies d'antibiotiques utilisés dans la mucoviscidose sont élevées. La possibilité pour les infections de passer à la chronicité impose une stratégie à long terme pour éviter l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques. La posologie des antibiotiques doit être individualisée. Lorsque les antibiotiques sont administrés par voie IV, il est important de faire des contrôles des taux sanguins d'antibiotiques (78).

L'infection à *H. influenzae* est précoce mais elle est moins nocive que les deux autres germes. L'infection par *S. aureus* pourrait favoriser l'infection à *P. aeruginosa* (31). La prise en charge thérapeutique de l'infection à *P. aeruginosa* sera traitée dans une partie ultérieure.

5.1.3.1 Traitement de l'infection à *Staphylococcus aureus*

Ce germe colonise précocement le tractus respiratoire des patients MV. Une distinction est faite entre les souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM), les plus fréquentes, et les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) dont la prévalence augmente. Lors d'une exacerbation, le traitement se fait par voie orale en monothérapie pendant une durée de 14 jours (37). *S. aureus* est sensible à de nombreux antibiotiques : oxacilline, cloxacilline, certaines céphalosporines de première génération, cotrimoxazole, acide fusidique, rifampicine ou encore synergistines (Tableau III). Le traitement de première intention d'une exacerbation à *S. aureus* se fait au moyen d'une β -lactamine par voie orale, oxacilline ou cloxacilline, avec possibilité de l'associer à l'acide fusidique pendant au moins 14 jours. Si le patient est allergique à la pénicilline, on bascule sur l'association acide fusidique-rifampicine. Ces deux antibiotiques ne doivent jamais être utilisés en monothérapie du fait d'un risque élevé d'apparition de résistance (38). Lors de la découverte d'un SARM, la réalisation d'un antibiogramme aide au choix de la thérapie. Une bi-antibiothérapie est

recommandée : l'association pristinamycine-rifampicine par exemple. La vancomycine et la teicoplanine de la famille des glycopeptides sont une alternative (38).

Lors d'infection sévère, une bi-antibiothérapie par voie parentérale est nécessaire : céphalosporines de troisième génération-fosfomycine ou glycopeptides-aminosides (Tableau IV) (38).

Tableau III : Principaux antibiotiques anti-*Staphylococcus aureus* utilisés per os (38)

Nom	Spécialité	Posologie mg/kg/j	Nombre de prise/j
Acide fusidique (en association)	FUCIDINE	30-60 ($\leq 1,5$ g/j)	2-3
Amoxicilline + acide clavulanique	AUGMENTIN	80 (≤ 3 g/j)	3
Céfalexine	CEPOREXINE	50-100	3
Ciprofloxacine	CIFLOX	30-40 ($\leq 1,5$ g/j)	2-3
Erythromycine	ERYTHROCYNE	50 (≤ 3 g/j)	2
Linézolide (AMM >18 ans)	ZYVOXID	10	2
Minocycline (>8 ans)	MINOCINE	4	2
Oxacilline, Cloxacilline	BRISTOPEN	100-150	3-4
Pristinamycine	PYOSTACINE	50 (≤ 4 g/j)	2
Rifampicine (en association)	RIFADINE	20-30	2

Tableau IV : Principaux antibiotiques anti-*Staphylococcus aureus* utilisés par voie IV (38)

Nom	Spécialité	Posologie mg/kg/j	Nombre de prise/j
Amikacine	AMIKLIN	20-30	1-3
Amoxicilline + acide clavulanique	AUGMENTIN	200	3-4
Ciprofloxacine	CIFLOX	30-40	2-3
Linézolide (AMM>18 ans)	ZYVOXID	10	2
Oxacilline	BRISTOPEN	300	3-4
Rifampicine (en association)	RIFADINE	20-30	2
Teicoplanine	TARGOCID	20	1-2
Tobramycine	NEBCINE	8-10	1-3
Vancomycine	VANCOMYCINE	40	4

5.1.3.2 Traitement de l'infection à *Haemophilus influenzae*

Une monothérapie par voie orale pendant 15 jours suffit à éradiquer l'infection à *H. influenzae*. On utilise l'association amoxicilline-acide clavulanique ou une céphalosporine (79).

5.1.3.3 Effets indésirables des antibiotiques

De part leurs effets indésirables, les concentrations sanguines des aminosides doivent être évaluées et adaptées à cause d'une variabilité inter-individuelle. Avant une nouvelle injection, le dosage s'effectue en résiduel alors qu'après la fin de l'injection, il se fait au niveau du pic sérique (80).

Les antibiotiques étant utilisés au long cours, il est indispensable de surveiller l'apparition d'effets indésirables. Les aminosides sont néphrotoxiques et oto-toxiques. Une surveillance de la fonction rénale s'impose au début, au milieu et en fin de cure. Un audiogramme haute fréquence est également réalisé une fois par an. Les fluoroquinolones peuvent causer des troubles articulaires tels que des tendinopathies ou des arthropaties. Pour la famille des β -lactamines, le principal effet indésirable est l'allergie (80).

5.1.3.4 Les vaccinations

Pour prévenir tous risques d'infection, le respect du calendrier vaccinal est essentiel. Les vaccinations habituellement recommandées sont :

- Pour les enfants : diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche acellulaire, *Haemophilus influenzae* de type b, vaccin anti-pneumococcique 23 valences, hépatite B, rougeole, oreillons, rubéole et grippe (80).
- Pour les adultes : diphtérie, tétanos, poliomyélite et grippe (80).

5.2 Prise en charge métabolique et nutritionnelle

5.2.1 Les extraits pancréatiques

L'administration, par voie orale, d'extraits pancréatiques permet de traiter l'insuffisance pancréatique exocrine. Ceux-ci se présentent sous forme de microsphères contenues dans des gélules, avec un enrobage gastro-résistant pour éviter l'inactivation par l'acidité gastrique (Tableau V) (46). Les extraits apportent les enzymes nécessaires à la digestion : lipase, protéase ou encore amylase. Cette supplémentation permet d'obtenir une absorption presque normale des graisses, des protéines et des sucres et de corriger ainsi la mauvaise digestion de ces nutriments (81). Pour objectiver l'efficacité des extraits pancréatiques, il faut s'assurer de l'absence de diarrhées graisseuses et de douleurs abdominales, parallèlement au maintien du poids chez l'adulte et d'une bonne croissance chez l'enfant (46).

Les gélules sont administrées au début du repas (46). La posologie des extraits pancréatiques est exprimée en Unité Lipase (UL) qui correspond à l'activité lipolytique. Elle est adaptée à la teneur en lipides des repas, au degré d'insuffisance pancréatique et à la tolérance clinique (82). Chez le nourrisson, la posologie varie entre 2000 et 4000 UL/120mL de lait ; les microsphères doivent être extraites de la gélule et mélangées à de l'eau ou à une boisson acide telle que du jus d'orange. Chez l'enfant de moins de 4 ans, la dose initiale est de 1000 UL/kg/repas et de 500 UL/kg/repas pour les enfants de plus de 4 ans. Il est recommandé de ne pas dépasser la dose de 10 000 UL/kg/j, avec un maximum de 250 000 UL/j (46). L'efficacité du traitement enzymatique substitutif est optimale au bout de 2 à 3 mois d'utilisation quotidienne. L'administration de quantité excessive d'enzymes gastro-protégées (supérieures à 6000 UL/kg/repas) peut être responsable d'une colopathie fibrosante qui se manifeste par des signes d'obstruction intestinale distale et des rectorragies (83).

Si l'insuffisance pancréatique exocrine n'est pas contrôlée malgré une bonne observance, il sera prescrit un traitement adjuvant. Son but est de diminuer l'acidité gastrique gênante pour l'action des enzymes pancréatiques dégradées dans l'estomac, malgré l'enveloppe gastro-protectrice. On a recours soit aux antisécrétoires, soit aux inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) (83).

Tableau V : Spécialités utilisées pour le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine (81)

Nom commercial	Gastro-protégé	Présentation	Activité enzymatique (Unités Ph Eur)		
			Lipolytique	Protéolytique	Amylolytique
CREON® 12 000U	Oui	Gélule	12000	700	12000
CREON® 25 000 U	Oui	Gélule	25000	1000	18000
EUROBIOL® 25000 U	Oui	Gélule	25000	1250	22500
EUROBIOL® 12500 U	Non	Poudre	100000	57500	12500

5.2.2 La prise en charge du diabète

La prise en charge thérapeutique a deux objectifs principaux : contrôler l'hyperglycémie pour réduire les complications aiguës et chroniques du diabète et maintenir un statut nutritionnel optimal. L'équipe médicale doit être consciente qu'une certaine flexibilité du traitement antidiabétique peut être accordée, sachant que le traitement de la mucoviscidose est lui-même contraignant (47).

Au stade d'intolérance au glucose, des conseils nutritionnels sont prodigués au patient et une auto-surveillance glycémique est mise en place. Dans le cas de diabète avéré, on a recours à l'insuline. En effet, le diabète de la mucoviscidose étant insulino-prive, l'insulinothérapie est le traitement de première intention auquel on associe des conseils hygiéno-diététiques (48). Le choix de l'insuline, de la posologie et du schéma d'administration, relèvent du profil glycémique du patient et de son mode de vie. Le plus souvent, il s'agit d'un mélange d'insuline rapide et intermédiaire à raison de deux injections par jour avec une posologie initiale de 0,5 à 1 UI/kg/j (47).

5.2.3 L'acide urodésoxycholique

Pour traiter l'atteinte hépatobiliaire, on utilise un acide biliaire hydrophile : l'acide urodésoxycholique (Tableau VI). Il augmente le flux biliaire et fluidifie la bile. Cette substance possède des propriétés cytoprotectrices vis-à-vis de l'hépatocyte. Le traitement par l'acide urodésoxycholique doit débiter dès les premières manifestations d'atteintes hépatiques, qu'ils s'agissent d'anomalies biologiques ou échographiques persistantes. La posologie efficace est de 20 mg/kg/j en 2 prises quotidiennes. Après quelques semaines de traitement, on observe une amélioration voire une normalisation biologique (51).

Tableau VI : Spécialités utilisées pour le traitement de l'atteinte hépatobiliaire (81)

Nom commercial	Présentation	Dosage en mg
DELURSAN®	Comprimé	250 et 500
URSOLVAN®	Gélule	200

5.2.4 La prise en charge nutritionnelle

La présence d'une diététicienne au côté du patient est indispensable. L'alimentation est libre, hypercalorique et normolipidique (81). Les apports énergétiques doivent être légèrement supérieurs aux apports journaliers recommandés (100 à 110 %) pour maintenir un état nutritionnel satisfaisant. Afin d'atteindre ces objectifs, il faut privilégier des aliments riches en calories glucido-lipidiques (82). La prise en charge nutritionnelle dépend de plusieurs facteurs : le bilan clinique, les marqueurs biologiques, protéiques, lipidiques, minéraux et vitaminiques et le degré d'insuffisance pancréatique exocrine (84).

5.2.4.1 Les suppléments vitaminiques

L'insuffisance pancréatique exocrine est responsable d'une malabsorption des vitamines liposolubles c'est-à-dire les vitamines A, D, E et K (85). Les vitamines A et E sont des antioxydants majeurs. Leur déficit retentit sur la trophicité des muqueuses et sur l'immunité cellulaire et peut donc jouer un rôle délétère sur l'évolution de l'atteinte respiratoire. Une carence en vitamine D participe à la déminéralisation osseuse. La vitamine K intervient dans le système de coagulation et dans le métabolisme osseux. Elle est apportée de deux façons : par l'alimentation ou par la synthèse endogène grâce à la flore intestinale. Les carences en vitamine K sont rares, sauf en cas de saignements au cours de la première année de vie, auquel cas, on la prescrit à la posologie de 5 à 10 mg une fois par semaine. A un âge plus avancé, du fait d'antibiothérapie prolongée qui détruit la flore intestinale, une supplémentation peut s'avérer nécessaire (86). Les taux plasmatiques des vitamines liposolubles doivent être évalués au moins une fois par an. Ces carences vitaminiques étant très précoces, il faut pallier leur déficit dès le diagnostic de la maladie, sans attendre la survenue d'une insuffisance pancréatique exocrine. Les compléments se présentent sous la forme de complexes poly-vitaminiques solubles (Tableau VII). Ils sont administrés à double dose de la posologie usuelle (81).

Tableau VII : Recommandations concernant les suppléments vitaminiques au cours de la mucoviscidose (85)

Vitamines	Posologie en prévention	Spécialités remboursées dans la mucoviscidose	Dosage de la forme pharmaceutique
A	5000 à 10 000 UI/j	A 313®	Capsule à 50 000 UI
D	400 à 1 000 UI/j	STEROXYL® UVESTEROL D® ZYMA D®	Goutte à 400 UI Dose à 1000 UI Goutte à 300 UI
E	50 à 400 UI/j	TOCO 500® DERMORELLE®	Capsule à 500 mg Capsule à 200 mg
K	Au cours de la 1 ^{ère} année de vie ou lors d'antibiothérapie prolongé : 5 à 10 mg une fois/semaine	Vitamine K1 ROCHE®	Ampoule à 2 et 10 mg
A, D, E, K	2 mL/j	Aucune spécialité multivitamines n'est remboursée UVESTEROL ADEC®	
Vitamines hydrosolubles	Aucune supplémentation nécessaire si alimentation normale		

Les vitamines hydrosolubles B12 et C sont correctement absorbées et ne posent pas de problème de carence, sauf cas particuliers (85).

5.2.4.2 Les minéraux et oligo-éléments

Du fait d'une sudation importante, les patients MV ont des besoins en eau et en sodium plus importants. Une vigilance particulière doit être apportée durant les périodes estivales où des déshydratations aiguës peuvent survenir (86). Chez le nourrisson, la supplémentation s'obtient par l'apport de soluté de réhydratation entre les biberons. Chez les enfants et les adultes, il est possible d'administrer le sodium sous forme de gélules (82)

En ce qui concerne les oligo-éléments (fer, zinc, sélénium, magnésium), une supplémentation est nécessaire lorsque la carence est confirmée car elle peut perturber la lutte contre les infections. A cet effet, des spécialités sont disponibles :

Fer : TARDYFERON®, TIMOFEROL®, FERROSTRANE®.

Zinc : OLIGOSOL Zn®, GRANIONS Zn®.

Sélénium : OLIGOSOL Se®, GRANION Se®.

Magnésium : MAG 2®, SPASMAG® (82).

5.3 Prise en charge des complications digestives

5.3.1 Le syndrome d'obstruction intestinale distale (SOID)

Dans les formes débutantes de SOID, l'utilisation de N-acétylcystéine aide à résoudre les symptômes. Il est administré à la posologie d'une dose toutes les 6 heures pendant un jour. En cas d'obstruction importante, mais non compliquée, on a recours aux solutions de polyéthylène glycol par voie orale (COLOPEG®, KLEAN-PREP®, FORSTANS®) à la posologie de 20 à 40 mL/kg/h. Ces préparations pouvant entraîner des nausées, il n'est pas rare de leur associer du MOTILIUM® (dompéridone) pour améliorer la tolérance. En cas de formes compliquées d'occlusion, une intervention chirurgicale est nécessaire. L'utilisation de médicaments contenant du polyéthylène glycol est alors contre-indiquée (50).

5.3.2 La constipation

La prise en charge de la constipation est identique à celle des patients indemnes de mucoviscidose. Des règles hygiéno-diététiques telles que l'enrichissement du régime en fibres et l'augmentation de l'apport hydrique sont mises en place. La thérapeutique utilise des laxatifs osmotiques doux comme le macrogol 4000 (FORLAX®) à la posologie d'un à deux sachet(s) par jour. En aucun cas, la réduction de la posologie des extraits pancréatiques ne doit être préconisée pour traiter la constipation (50).

5.3.4 Le reflux gastro-oesophagien (RGO)

La prise en charge thérapeutique du RGO se fait au moyen d'IPP tels que le MOPRAL® (Oméprazole) ou le PARIET® (Rabéprazole). En général, le traitement est prescrit pour 6 à 8 semaines, mais doit souvent être permanent du fait de nombreuses rechutes. Des règles hygiéno-diététiques classiques sont prodiguées : surélever le lit, éviter les boissons gazeuses, le port de vêtements trop serrés et la position allongée juste après le repas (50).

5.4 Prise en charge psychologique

La mucoviscidose est une pathologie qui a un fort impact psychologique sur le patient, sa famille et son entourage (87). Une prise en charge psychologique doit être systématiquement proposée (82). Dans les CRCM, le psychologue fait partie intégrante de l'équipe soignante. Il est présent lors des consultations et disponible lors des hospitalisations. Différents objectifs doivent être atteints : prévention, évaluation de la situation et intervention si nécessaire. La prise en charge psychologique doit être permanente et ne doit pas attendre seulement les périodes de véritables difficultés. Elle s'adresse aussi bien au patient qu'à l'entourage familial (87). Un trouble dépressif majeur doit être traité au moyen d'une psychothérapie ou d'antidépresseurs (80).

Partie II

*Pseudomonas
aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, plus communément appelé « bacille pyocyanique », du grec « puon » = pus et « kuanos » = bleu foncé, a été isolée pour la première fois en 1882 par Gessard, pharmacien des armées (88). Le genre *Pseudomonas* fut créé en 1900 par Migula. *P. aeruginosa* en est l'espèce la plus connue, la plus répandue et la plus pathogène (89).

1 Habitat et transmission

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire. Elle vit à l'état saprophyte dans l'environnement. On la trouve dans les milieux humides, l'eau, le sol et à la surface des végétaux. Elle peut coloniser les muqueuses digestives et la peau de l'homme et des animaux, où cette bactérie vit en commensalité (88). Plusieurs sites peuvent être colonisés : tube digestif, tractus respiratoire, zones cutanées humides ou encore tractus urinaire. *P. aeruginosa* est fréquemment isolé en milieu hospitalier dans l'environnement humide proche des malades (éviers, siphons, vases) (90). Cette bactérie peut également contaminer des solutions d'antiseptiques, notamment les ammoniums quaternaires (91). Une transmission interhumaine de la bactérie est possible par manuportage par le personnel ou à partir de matériels ou de fluides contaminés (90). *P. aeruginosa* peut persister et se multiplier dans divers milieux et sur des matériels surtout s'ils sont humides et même dans des conditions défavorables (88). Cette bactérie supporte cependant mal la dessiccation (89).

2 Morphologie et caractéristiques de culture

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif mesurant 1 à 3 µm de long et 0,5 à 1 µm de large (90). *P. aeruginosa* possède un métabolisme aérobie strict. Cette bactérie est munie d'un flagelle polaire unique (ciliature monotriche) permettant sa mobilité (Figure 14) (92). Elle peut être entourée d'une pseudo-capsule ou « slime » pouvant intervenir dans la pathogénicité de la bactérie (90).

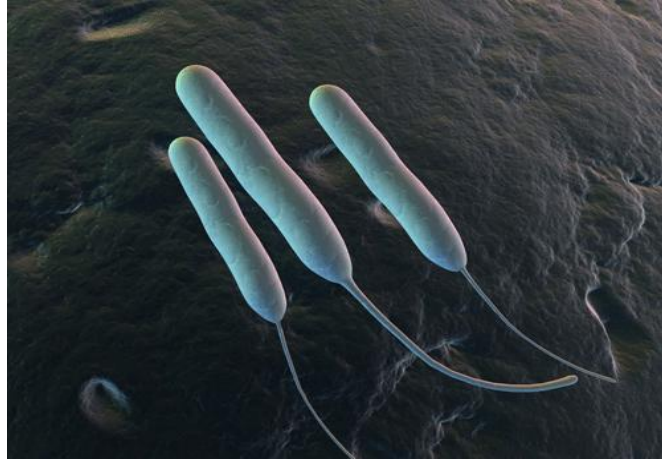


Figure 14 : La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (93)

P. aeruginosa peut être cultivée sur tous les milieux en aérobiose placés à une température comprise entre 30°C et 37°C. Une odeur caractéristique de seringa se dégage des cultures, du fait de la production d'ortho-amino-acétophénone. Le milieu Drigalski, sélectif pour *P. aeruginosa*, permet d'isoler la bactérie (Figure 15) (90). Ce milieu est une gélose lactosée, pouvant différencier les bactéries en fonction de leur aptitude à fermenter le lactose. La présence de cristal violet et de désoxycholate de sodium inhibe le développement des bactéries à Gram positif. La fermentation du lactose entraîne une production d'acide, provoquant alors le virage au jaune de l'indicateur de pH : le bleu de bromothymol. *P. aeruginosa* ne fermentant pas le lactose, les colonies apparaissent bleu-vert avec des reflets métalliques caractéristiques après ensemencement sur ce milieu de culture (94, 95).

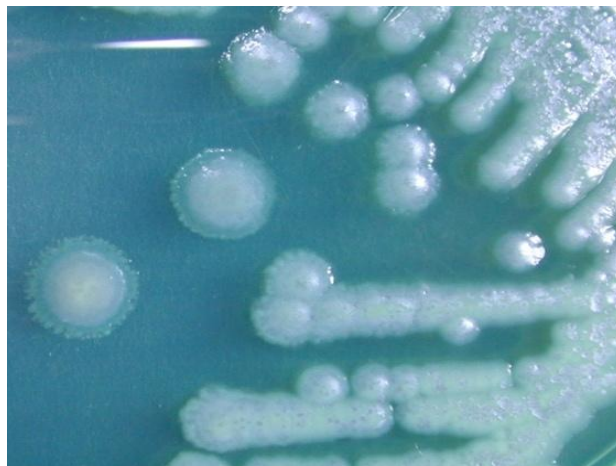


Figure 15 : Colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Drigalski (96)

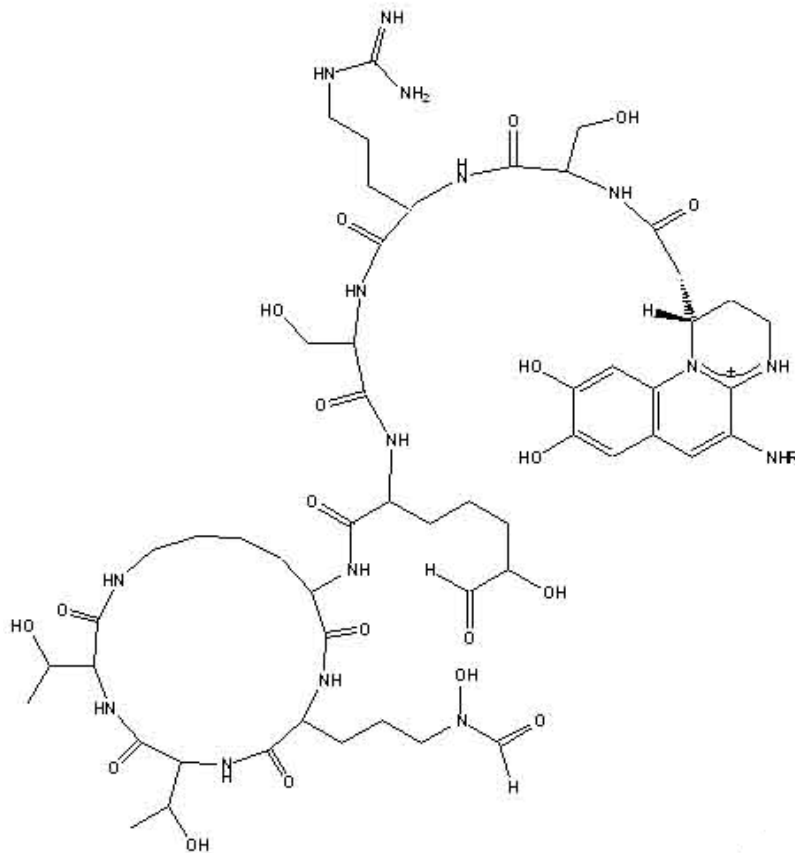
Un autre type de milieu sélectif pour *P. aeruginosa* est disponible. Il s'agit du milieu cétrimide qui est utilisé pour la recherche de la bactérie dans des produits très contaminés ou dans les eaux (90). Il sert à la fois à l'isolement et au dénombrement de *P. aeruginosa*. Dans ce milieu on trouve du cétrimide, antiseptique de la famille des ammoniums quaternaires, qui inhibe le développement d'une grande variété de microorganismes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *P. aeruginosa*. Le milieu cétrimide peut être additionné d'acide nalidixique, agent antibactérien, bloquant la réplication de l'ADN des microorganismes qui lui sont sensibles. La formule du milieu cétrimide est dérivée de celle du milieu de King A. Ce dernier favorise la production d'un pigment, la pyocyanine, par la bactérie. La présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium dans le milieu cétrimide stimule la production de pyocyanine (97, 98). Les caractéristiques et le rôle de ce pigment seront explicités ultérieurement.

Après culture sur gélose, on observe trois types de colonies :

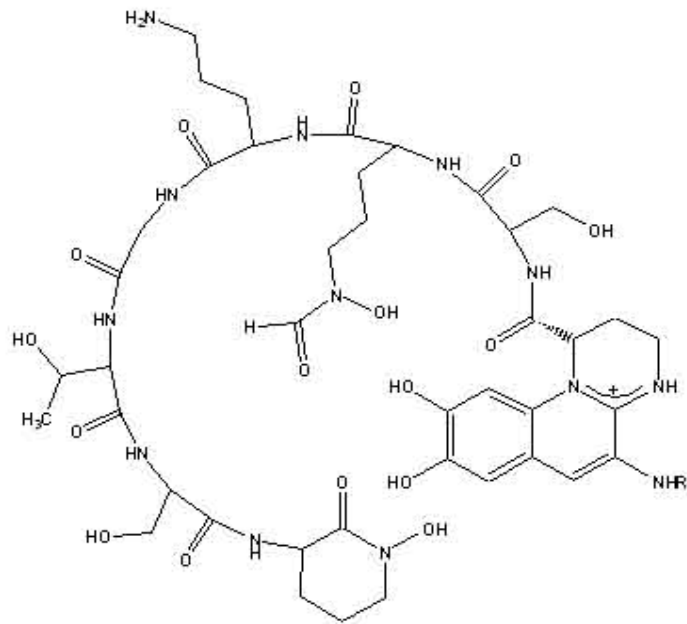
- Colonies La (« large ») : ce sont des colonies isolées, grandes avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier. De plus, elles ont un aspect métallique et irisé caractéristique, dû à une autolyse par des enzymes protéolytiques bactériennes (88).
- Colonies Sm (« small ») : ce sont des colonies de petites tailles, mates et légèrement bombées avec un bord circulaire régulier (88).
- Colonies M (muqueuses) : elles correspondent à des colonies bombées, opaques, visqueuses et parfois même coulantes. Cet aspect muqueux des colonies est dû à la production par la bactérie d'un polysaccharide extracellulaire : l'acide alginique. Ce type de colonies est presque exclusivement isolé lors d'infections chroniques urinaires ou pulmonaires, notamment dans ce dernier cas, chez les patients MV (88).

3 Production de pigments

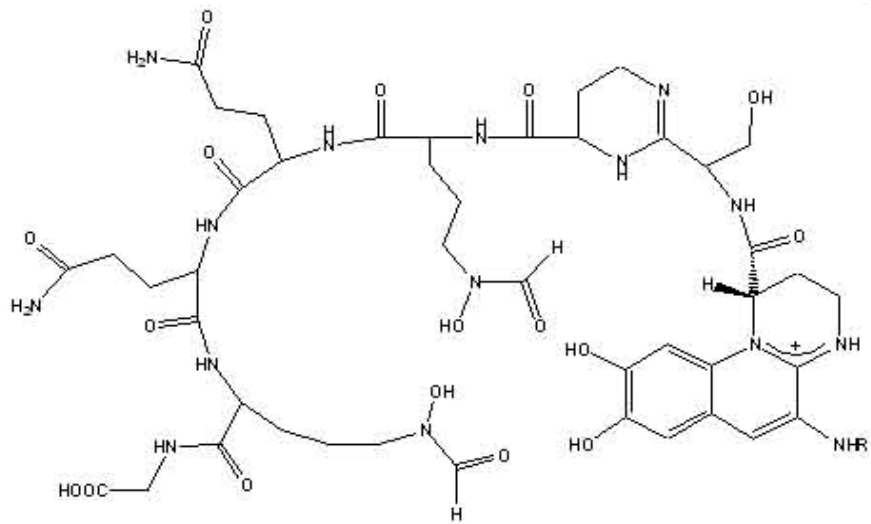
Une des caractéristiques de cette espèce est la production de pigments, pouvant être fluorescents ou non, et qui vont servir à l'identification de la bactérie. La pyoverdine est un pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme. Sa mise en évidence se fait sur le milieu de King B contenant phosphate, sulfate, glycérol et peptone. La production de pyoverdine est inhibée par les ions sodium et augmentée dans les milieux ferriprives. *P. aeruginosa* produit trois types de pyoverdine de structures chimiques très proches (Figure 16) (88). D'autres espèces du groupe des *Pseudomonas* fluorescents produisent ce pigment. Il s'agit de *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. simiae* ou encore *P. syringae* (99)



Pyoverdine du groupe I



Pyoverdine du groupe II



Pyoverdine du groupe III

Figure 16 : Structure chimique des trois types de pyoverdine (100)

La pyochéline, autre pigment fluorescent, joue, avec la pyoverdine, le rôle de sidérophore ; ces pigments sont capables de capter le fer dans l'environnement (Figure 17). La notion sera explicitée plus en détail dans un paragraphe ultérieur.

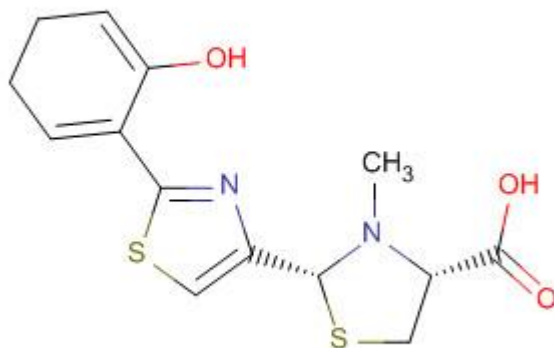


Figure 17 : Structure chimique de la pyochéline (100)

La pyocyanine, caractéristique de *P. aeruginosa*, est un pigment bleu soluble dans l'eau et le chloroforme. Ce pigment est mis en évidence dans le milieu de King A contenant du glycérol, de la peptone pepsique et une faible teneur en sels minéraux. Sa synthèse est réduite en présence d'un excès d'ions phosphates et sodium (Figure 18) (88).

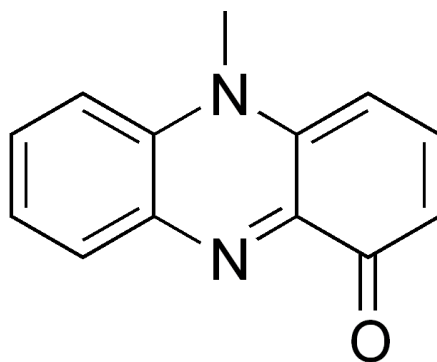


Figure 18 : Structure chimique de la pyocyanine (101)

En solution aqueuse, la pyocyanine possède la propriété de changer de couleur en fonction du pH et de son état d'oxydation. Ainsi, la pyocyanine oxydée est rouge en milieu acide (pH<4,9) et bleue en milieu neutre et alcalin (Figure 19) (102).

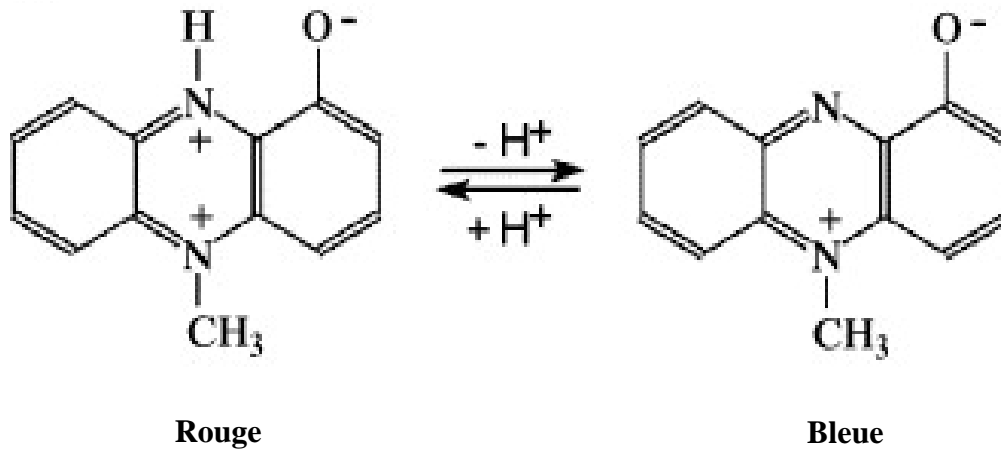


Figure 19 : Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique (103)

La pyoverdine, la pyocheline et la pyocyanine sont trois pigments jouant un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie puisqu'ils interviennent dans la multiplication et la persistance de la bactérie (90).

Il existe également des souches mélanogènes qui produisent un pigment brun-noir diffusant, nommé pyomélanine. Ce pigment est mis en évidence chez les souches ne produisant ni pyocyanine, ni pyoverdine. Ces souches particulières sont isolées de lésions purulentes (88).

On peut également trouver des variétés érythrogènes. Ces souches produisent un pigment rouge-brun, l'aéruiginosine, parfois appelé pyorubine (88).

La mise en évidence de souches apigmentées est possible mais peu fréquente (moins de 5 % des souches), elles sont souvent isolées de patients sous antibiothérapie (90).

4 Structure antigénique

Il est possible de sérotyper les différentes souches de *P. aeruginosa* par l'étude de l'antigène O lipopolysaccharidique thermostable, dont la structure sera précisée plus loin. Il existe 20 sérogroupe O (104) pouvant être identifiés par agglutination sur lame au moyen d'antisérums. Actuellement, 17 antisérums sont disponibles, permettant l'identification de 90 à 95 % des souches. Les sérotypes O1, O5, O6 et O11 sont les plus fréquemment isolés. Néanmoins, certaines souches ne sont pas identifiables. C'est le cas des souches polyagglutinables ou autoagglutinables. Des changements de sérotype peuvent se produire après un traitement antibiotique (90).

5 Le génome de *Pseudomonas aeruginosa*

La taille du génome de *P. aeruginosa* est estimée entre 5,2 et 7 millions de paires de bases. Ce génome est constitué, à hauteur de 65 %, par les bases azotées guanine et cytosine (105). *P. aeruginosa* possède un unique chromosome circulaire ainsi que de nombreux plasmides. Actuellement, seules les souches PAO1 et PA14 de *P. aeruginosa* ont leur génome entièrement séquencé (Figure 20). Une des caractéristiques majeures du génome de cette bactérie est sa grande plasticité qui lui permet de s'adapter, en permanence, aux nouvelles conditions rencontrées (106).

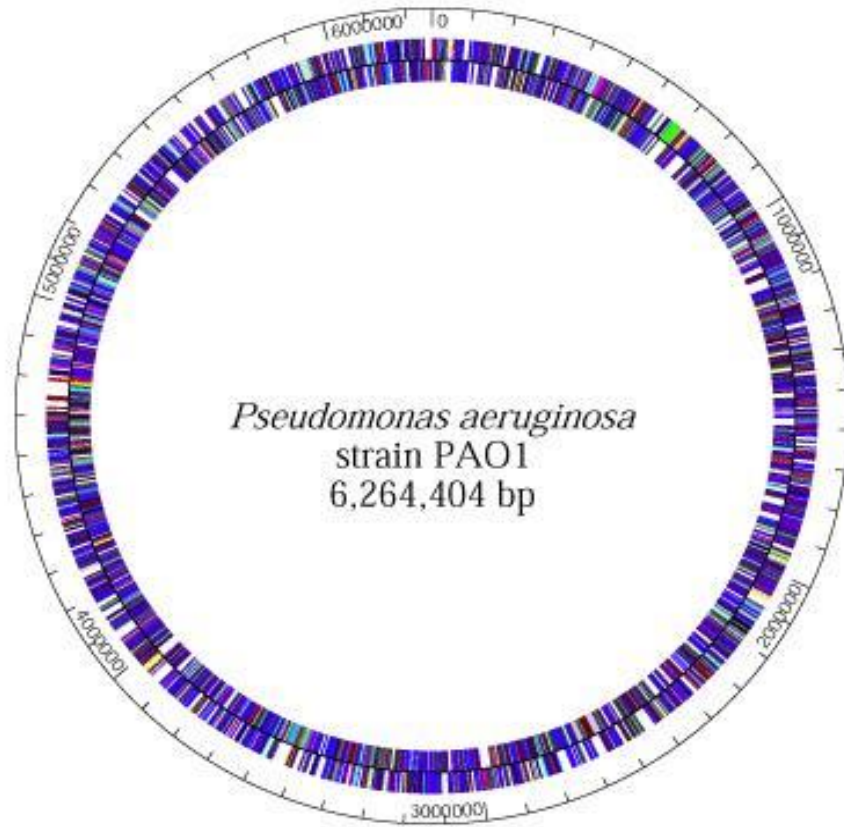


Figure 20 : Le génome de *Pseudomonas aeruginosa* souche PAO1 (106)

6 Les facteurs de pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa produit de nombreux facteurs de virulence pouvant être membranaires ou extracellulaires (90). Ceux-ci déjouent les défenses de l'hôte et permettent le développement de l'infection (89). Les facteurs de virulence assurent la pathogénicité de la bactérie en intervenant à différents niveaux : colonisation, survie de la bactérie et invasion des tissus (tableau VIII) (107). Beaucoup de ces facteurs ne sont pas produits de manière constitutive, mais plutôt en fonction du milieu dans lequel se trouve la bactérie (90).

Tableau VIII : Facteurs de pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* (107)

Facteurs impliqués dans l'adhérence de la bactérie	Facteurs impliqués dans la colonisation bactérienne	Facteurs responsables de lésions tissulaires
Pili de type IV	Chélateurs de fer	Exotoxines
Flagelle	Alginate	Protéases
Facteur d'attachement	Flagelle	Lipases
Lipopolysaccharide (LPS)		Hémolysines
Exoenzyme S		Cytotoxines

6.1 Les facteurs impliqués dans l'adhérence

Dans le cadre de la mucoviscidose, la colonisation de l'arbre respiratoire est précédée par une étape déterminante : celle de l'adhérence de la bactérie aux muqueuses respiratoires. Différents facteurs permettent ce mécanisme.

6.1.1 Les pili de type IV

Les pili sont des structures filamenteuses d'un diamètre de 6 nm. Ils sont formés par l'empilement de monomères de piline PilA assemblés en hélices. Sont également présentes des sous-unités minoritaires telles que PilV-X, PilE et FimU (Figure 21). Contrairement au flagelle, les pili ne possèdent pas de canal central (108).

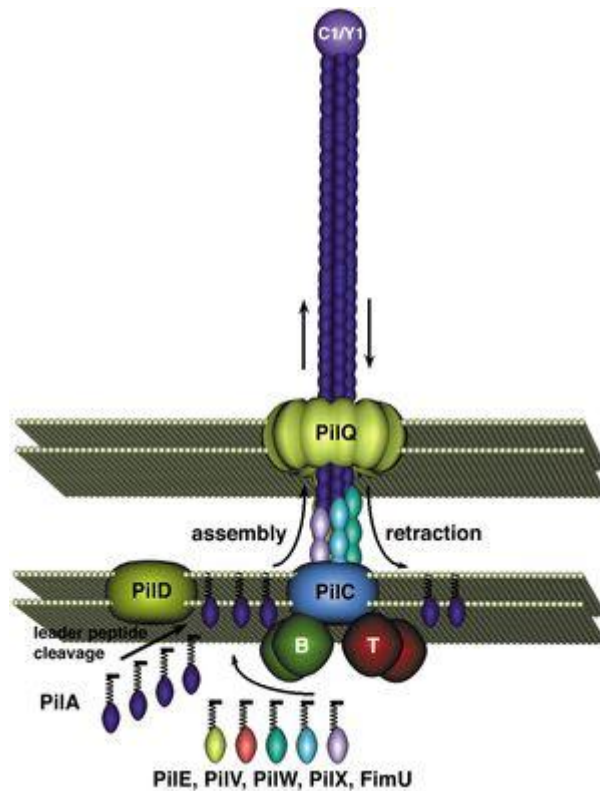


Figure 21 : Structure d'un pilus de type IV (109)

Les pili sont considérés comme la principale adhésine de *P. aeruginosa*. Ils jouent un rôle primordial dans l'infection, puisqu'ils permettent l'adhérence aux muqueuses respiratoires, entraînant la colonisation du tractus respiratoire. Des récepteurs, situés à la surface des cellules épithéliales pulmonaires, assurant la fixation de la bactérie par l'intermédiaire des pili de type IV. Ces récepteurs sont les régions glycosylées des glycosphingolipides asialo-GM1 et asialo-GM2 (92).

Les pili de type IV interviennent également dans le déplacement de la bactérie, indépendamment du flagelle. On observe deux modes de déplacement : le premier, appelé « twitching motility », au cours duquel la bactérie effectue un mouvement latéral le long de l'épithélium ; le second, appelé « swarming », possible grâce à la rétraction des pili, permet un déplacement de la bactérie dans les milieux humides (110).

6.1.2 Le flagelle

P. aeruginosa possède un flagelle polaire unique, mesurant 10 à 20 nm de diamètre, permettant sa mobilité. Le flagelle peut être décomposé en trois parties (Figure 22) :

- **le filament**, dont la longueur peut atteindre 10 μm . Il est constitué par l'assemblage de sous-unités protéiques comportant une seule protéine : la flagelline dont le poids moléculaire varie de 15 à 70 kDa. Le filament a la particularité d'être hélicoïdal, c'est-à-dire composé de 11 fibrilles disposées à la façon des torons d'une corde. Il est parcouru par un fin canal axial en son centre. Grâce à la flagelline, *P. aeruginosa* peut interagir avec les glycolipides GM1, les asialo-GM1 et les mucines. Ces dernières sont présentes dans le mucus respiratoire qui tapisse l'épithélium bronchique (92) ;
- **le corpuscule basal**, de forme cylindrique, possédant une architecture complexe avec une partie fixe et une partie mobile. Cette partie correspond au lieu d'insertion du flagelle au sein des membranes bactériennes (92) ;
- **le crochet**, élément très court, incurvé et flexible (92).

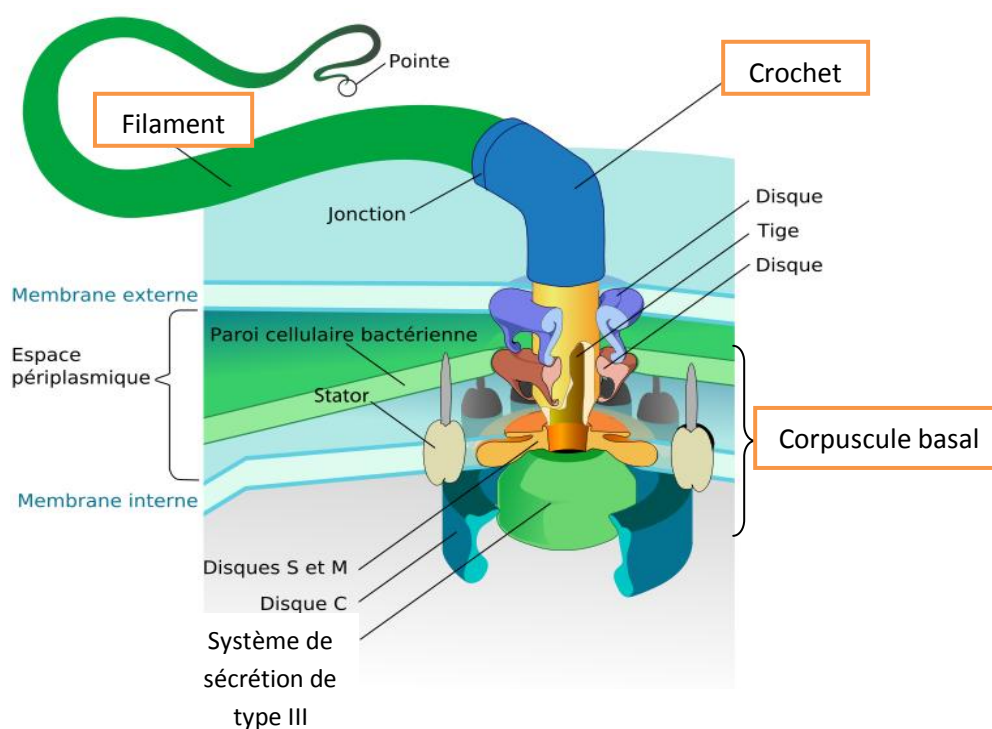


Figure 22 : Le flagelle de *Pseudomonas aeruginosa* (92)

6.1.3 Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS concerne uniquement les bactéries à Gram négatif. Ce constituant lipidique, présent au niveau de la face externe de la membrane bactérienne (92), peut être décomposé en trois parties (Figure 23) :

- **le lipide A ou endotoxine** : c'est une région hydrophobe insérée dans la bicouche phospholipidique membranaire (92). Les endotoxines sont des molécules complexes, de poids moléculaire élevé (2000 à 20 000 daltons), constituées d'une partie disaccharidique et d'une partie lipidique. Elles sont libérées suite à la lyse des bactéries. Les endotoxines sont thermostables et peu immunogènes, aucun anticorps n'est donc produit et il est impossible de développer un vaccin contre elles. Elles sont responsables d'un choc toxique (ou choc endotoxinique) entraînant le décès dans 50 % des cas. Les endotoxines agissent à plusieurs niveaux. Elles provoquent une forte fièvre. Elles entraînent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux, d'où la formation d'œdème et une chute générale de la pression artérielle. Elles agissent enfin sur l'hémostase en activant de façon anarchique la dégranulation des plaquettes dans les vaisseaux, provoquant une « coagulation intravasculaire disséminée » (111) ;
- **le noyau oligosaccharidique** ;
- **un polysaccharide antigène-O** : c'est la partie la plus variable du LPS. Il est constitué d'un enchaînement répété de sucres. Ces derniers peuvent être des hexoses classiques (glucose, galactose, mannose) ou plus particuliers comme le tyvélose ou le paratose. Comme nous l'avons déjà vu lors du paragraphe portant sur la structure antigénique, cette partie joue un rôle important car c'est grâce à elle que l'on identifie le sérotype. L'antigène O peut avoir une structure variable selon les colonies formées par les bactéries. Ainsi, lorsque l'antigène O est incomplet, les colonies sont plates, à bords irréguliers et d'aspect rugueux, alors qu'elles sont lisses et rondes lorsque l'antigène O est intact. Le phénotype rugueux est plus aisément phagocyté et perd ainsi son pouvoir pathogène (92).

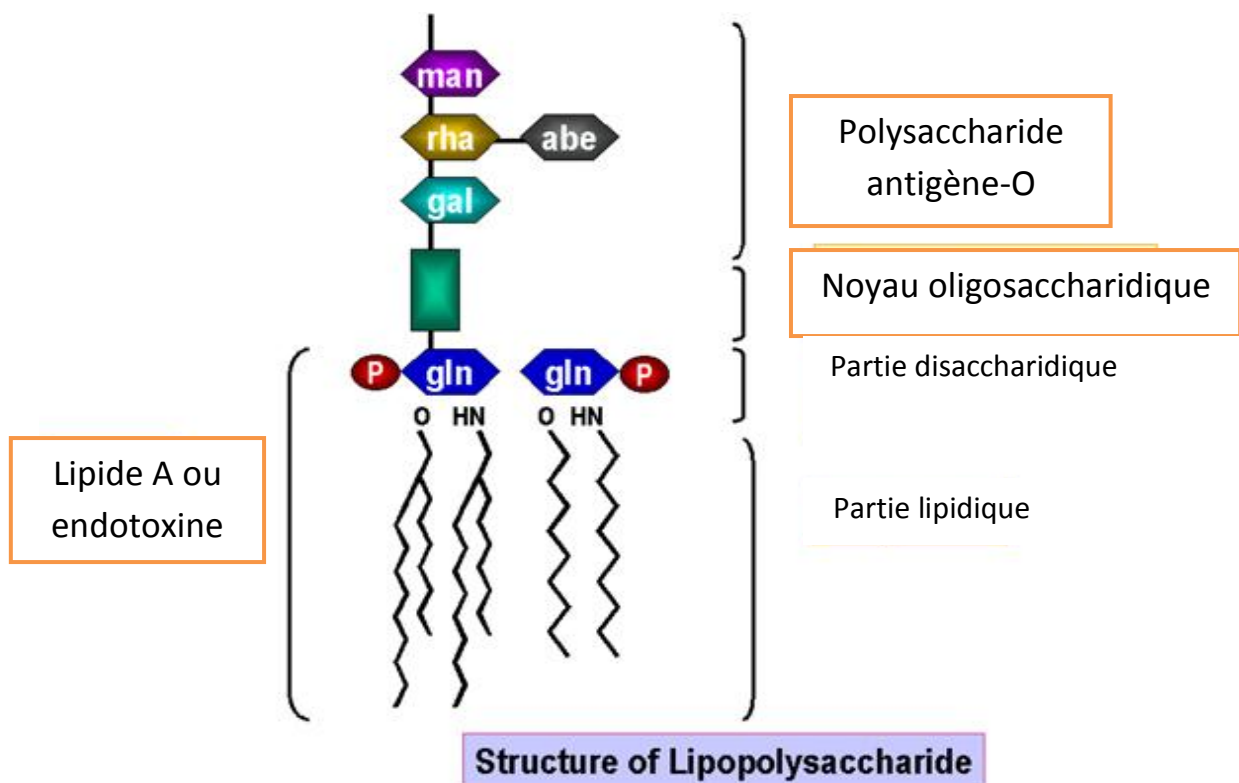


Figure 23 : Structure du lipopolysaccharide (112)

P. aeruginosa possède deux types de LPS : le LPS de type B (de fort poids moléculaire) et le LPS de type A (ne possédant que le core-lipid A contenant les chaînes d'acides gras et donc de faible poids moléculaire). Ce dernier présente une surface plus hydrophobe. L'attachement aux différents types de surfaces hydrophiles ou hydrophobes, varie en fonction de la composition du LPS (113).

6.1.4 Facteur d'attachement de type fimbriae (ou cup)

Ces facteurs interviennent principalement lors de l'adhérence de *P. aeruginosa* à des surfaces abiotiques, telles le verre ou le plastique. Ils jouent également un rôle dans la formation du biofilm (114).

6.1.5 L'exoenzyme S

L'exoenzyme S agit comme une adhésine en se fixant aux glycosphingolipides et aux cellules buccales (90).

6.2 Les facteurs impliqués dans la persistance et la multiplication de la bactérie

P. aeruginosa a besoin de fer pour assurer sa survie. Or, dans l'organisme, la concentration en fer libre se situe bien en dessous des besoins nécessaires à une bonne croissance bactérienne. La bactérie va alors sécréter dans le milieu extracellulaire des chélateurs du fer ou sidérophores. Il s'agit des deux pigments bactériens appelés pyoverdine et pyochéline (88). Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire, ayant une très forte affinité pour l'ion Fe^{3+} (115) et capables de chélater le fer et de le transporter. Ces pigments bactériens entrent en compétition avec la transferrine de l'hôte. Pour cela, ces sidérophores agissent de concert avec les exoprotéases et plus particulièrement l'élastase. Cette dernière provoque la coupure de la transferrine en petits peptides, source de carbone et d'azote ; le fer ainsi libéré est chélaté par les pigments bactériens et il est transporté à l'intérieur de la bactérie (88). Les sidérophores peuvent également obtenir le fer des ferritines, de l'hémoglobine et de diverses protéines de l'hôte contenant du fer. Les complexes ferri-sidérophores ainsi formés se placent au niveau de récepteurs membranaires bactériens spécifiques (FpvA). Le fer est alors internalisé et utilisé par la bactérie pour sa croissance (Figure 24) (92).

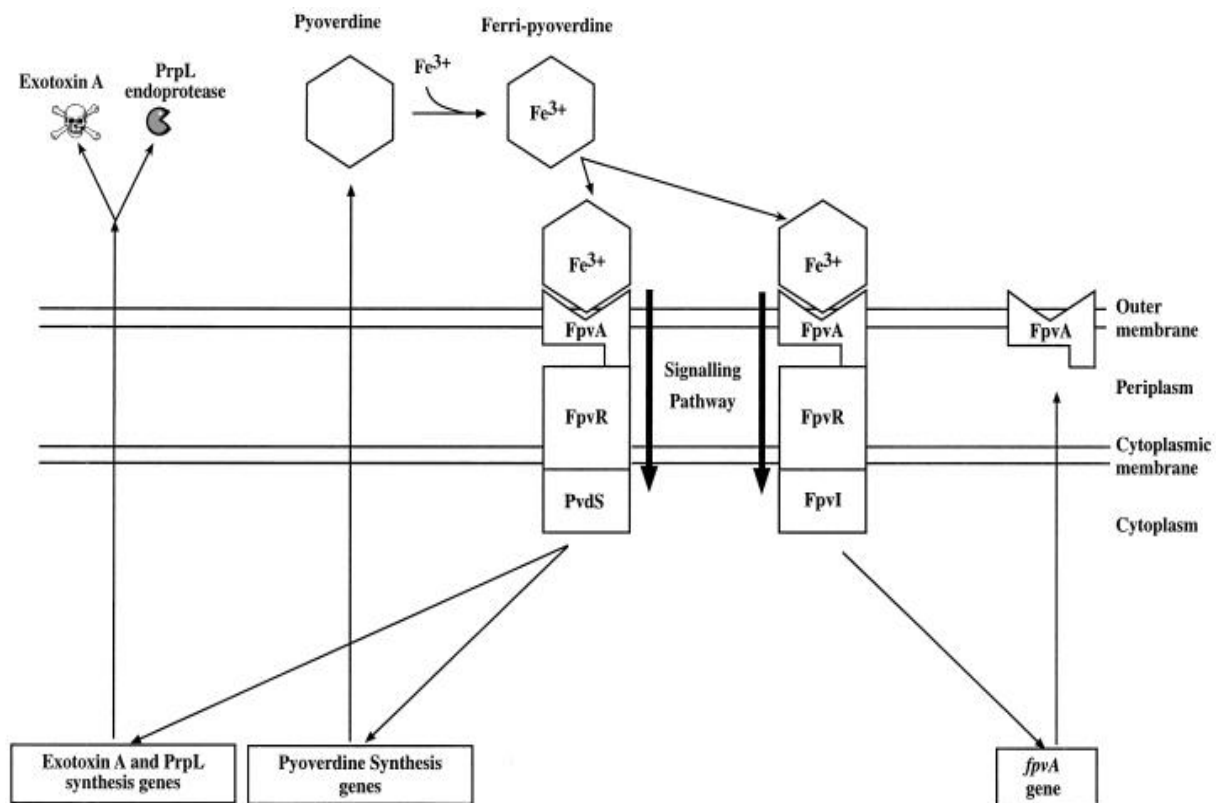


Figure 24 : Formation des complexes ferri-sidérophores et utilisation du fer par la bactérie (116)

A noter que la pyochéline catalyse la production de radicaux hydroxyles cytotoxiques à partir de peroxyde d'hydrogène ou d'anions superoxydes, produits par les polynucléaires neutrophiles. Ce pigment contribue ainsi à la destruction des cellules épithéliales pulmonaires (116).

6.3 Les facteurs responsables des lésions

6.3.1 La cytotoxine

La cytotoxine, anciennement appelée leucocidine, est une protéine localisée dans l'espace périplasmique de la bactérie. Elle est libérée après la phase de croissance exponentielle. La cytotoxine agit sur différents types de cellules, en particulier les leucocytes, sur lesquels elle va exercer son action lytique. Cette toxine va ainsi former des pores dans les membranes cellulaires des leucocytes, entraînant une augmentation de la perméabilité et une

libération d'enzymes lysosomales. L'action de la cytotoxine engendre une inflammation sévère et une nécrose tissulaire (89).

6.3.2 Les hémolysines

6.3.2.1 La phospholipase C

La phospholipase C est une enzyme extracellulaire thermolabile dont la synthèse est induite par une carence en phosphate. Cette enzyme libère des phosphorylcholines à partir de la phosphatidylcholine ou de la sphingomyéline. La phospholipase C exerce son action au niveau du surfactant pulmonaire où se trouvent des phosphatidylcholines en quantité abondante (90).

6.3.2.2 Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires thermostables de faible poids moléculaire, non enzymatiques et non antigéniques. Ce sont des composés cytotoxiques qui perturbent la mobilité des cils vibratiles tapissant l'épithélium respiratoire (90).

6.3.3 Les protéases

6.3.3.1 L'élastase

L'élastase (LasB), protéase majoritaire présente chez *P. aeruginosa*, occupe une place importante dans la pathogénicité de cette bactérie, puisqu'elle est responsable d'hémorragie et de nécrose tissulaire. C'est un facteur de virulence sécrété par la bactérie au cours d'une infection. L'élastase de *P. aeruginosa* est une métalloprotéinase à zinc (92).

Cette protéase possède une spécificité de substrats très large puisqu'elle peut s'attaquer à l'élastine, composant structural majeur du tissu pulmonaire, à la laminine, aux collagènes de type III et IV et aux protéoglycanes (92). L'élastase peut également inactiver de nombreuses protéines, telles que les immunoglobulines IgA et IgG, ainsi que des composants du complément (114).

L'activité de cette enzyme résulte de l'action combinée de la protéase Las A et de l'élastase Las B. En effet, ces dernières agissent en synergie, puisque Las A effectue une étape préalable de coupure de l'élastine, la rendant ainsi plus accessible à l'action protéolytique de Las B (89).

6.3.3.2 L'élastase LasD

Las D est une sérine protéase de 23 kDa. Elle possède une activité staphylolytique, c'est-à-dire qu'elle a la capacité de lyser les bactéries de type staphylocoque. Cette propriété permettrait à *P. aeruginosa* de concurrencer *S. aureus* au niveau des poumons (117).

6.3.3.3 La protéase alcaline

La protéase alcaline est codée par le gène *Apr A*. C'est une métalloprotéase à zinc de 50 kDa. Elle dégrade de nombreux composants du système immunitaire en s'attaquant aussi bien à des éléments du complément (C1q et C3), qu'à des cytokines telles que l'interféron γ ou le TNF- α . (118)

6.3.4 Les toxines ADP-ribosylantes

6.3.4.1 L'exotoxine A

Cette toxine possède un mécanisme d'action similaire à celui de la toxine diphtérique. Elle inhibe la synthèse de protéines par altération du facteur d'élongation EF2. Elle est produite par plus de 90 % des souches et possède des propriétés immunosuppressives. *In vitro*, elle se révèle toxique pour les macrophages par des altérations de leur morphologie, par un arrêt de la synthèse d'ADN et par une altération de leurs fonctions phagocytaires (88).

6.3.4.2 Les exoenzyme S, T, U et Y

Ces quatre exotoxines sont secrétées par le système de sécrétion de type III permettant leur injection directement dans le cytoplasme de la cellule cible, à la manière d'une seringue (90).

L'exoenzyme S possède une activité ADP-ribosyltransférase dont les cibles cellulaires sont la vimentine (119) et certaines immunoglobulines telles que les IgG ou les IgA. L'action de l'exoenzyme S sur la vimentine, composant du cytosquelette, produit une désorganisation de ce dernier (120). Cette toxine est également capable d'inhiber la phagocytose provoquant ainsi une résistance accrue de *P. aeruginosa* aux mécanismes de défenses immunitaires (121).

6.4 L'alginate

Durant la colonisation des poumons des patients MV, *P. aeruginosa* adopte un phénotype mucoïde. Ce phénotype particulier est caractérisé par la production d'un exopolysaccharide : l'alginate qui est un copolymère linéaire d'acide β -D-mannuronique et de son épimère, l'acide α -L-glucuronique (Figure 25) (122).

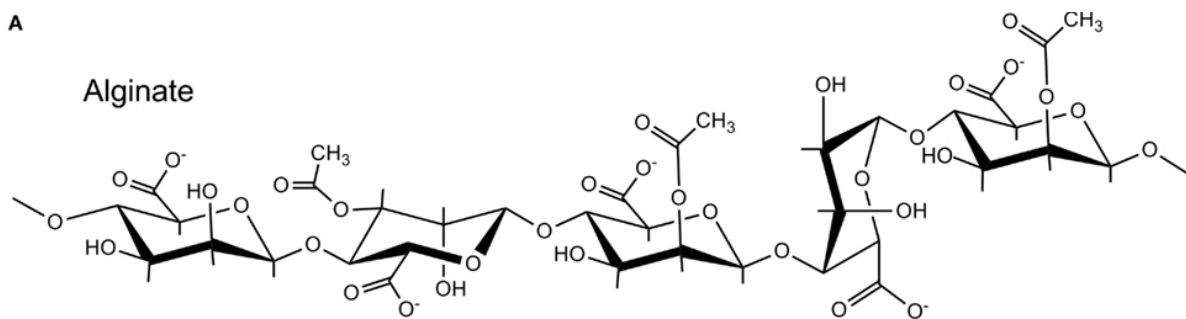


Figure 25 : Structure chimique de l'alginate (123)

Treize gènes sont nécessaires pour la biosynthèse et la sécrétion de l'alginate. Douze de ces gènes sont situés sur l'opéron *algD* (Figure 26) (124), et le dernier *algC* se trouve ailleurs dans le génome. *AlgC* intervient également dans la biosynthèse du lipopolysaccharide et des rhamnolipides (122).

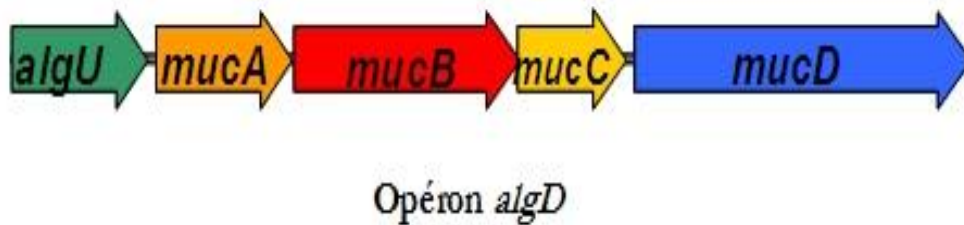


Figure 26 : Organisation de l'opéron *AlgD* (116)

L'alginate synthétisé est un facteur de virulence important (125), car il procure un avantage sélectif à *P. aeruginosa* et facilite sa survie dans les poumons de patients MV (126). Il engendre la mise en place d'une réponse immunitaire. L'hôte va produire de grandes quantités d'anticorps, notamment des classes IgG et IgA, dirigés contre l'alginate (127). L'alginate forme une capsule qui protège *P. aeruginosa* des défenses immunitaires de l'hôte, de l'action des antibiotiques et de la phagocytose (126).

Initialement, l'infection par *P. aeruginosa* est due à des souches non-mucoïdes et sensibles aux antibiotiques. La conversion vers le phénotype mucoïde est favorisée par la faible pression en oxygène, par la présence d'un épais mucus et par un biofilm en formation. Chez les patients MV, l'infection chronique par des souches mucoïdes de *P. aeruginosa* se traduit par un déclin plus rapide de la fonction respiratoire, notamment le VEMS est affecté, aussi bien chez les adultes que chez les enfants. La découverte de souches mucoïdes est un facteur de mauvais pronostic pour la fonction respiratoire, mais leur éradication par une antibiothérapie courante est difficile (128).

6.5 Le biofilm

Un biofilm correspond à une population de bactéries organisées en une communauté structurée (129). Les bactéries adhèrent à une surface et elles sont englobées, par la suite, d'une matrice exopolysaccharidique. *P. aeruginosa* privilégie cet état sessile, c'est-à-dire attaché à une surface, à un état planctonique dans lequel la bactérie vit de façon isolée dans le milieu. L'état sessile permet à la bactérie de s'installer durablement sur une surface et de coloniser le milieu environnant. Une bactérie se trouve rarement à l'état planctonique, celui-ci se limitant au passage de la bactérie d'une surface à une autre (127). Ce mode de croissance particulier en biofilm est souvent considéré comme une stratégie de survie pour les bactéries (130).

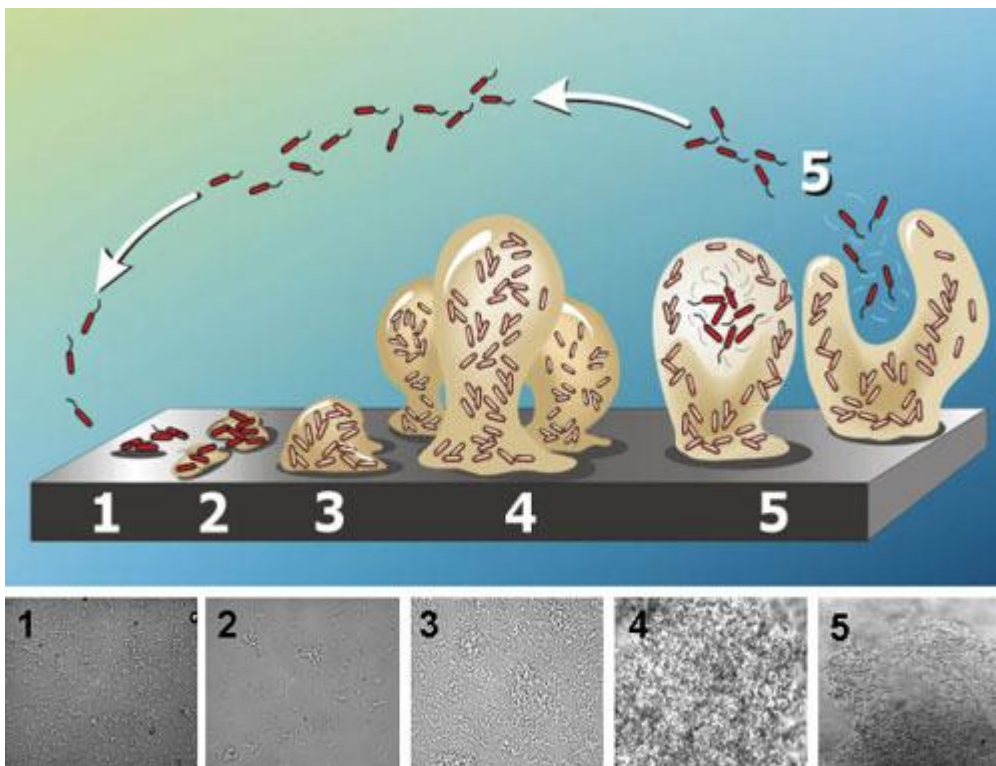


Figure 27 : Formation d'un biofilm (131)

La formation du biofilm se fait en 4 étapes principales (Figure 27):

- Adhésion réversible

P. aeruginosa, grâce à son flagelle, s'approche de la surface à coloniser et s'adsorbe transitoirement sur celle-ci pour évaluer sa composition. L'attachement des bactéries fondatrices du biofilm dépend des conditions de viscosité locale et de turbulence du milieu environnant. A ce stade, l'attachement de la bactérie à la surface est réversible (131).

- Adhésion irréversible

Par la suite, une association stable s'établit avec la surface ou avec d'autres microorganismes déjà présents. Les bactéries se rassemblent et forment des microcolonies qui vont se différencier afin de construire le biofilm. Lors de cette formation, les pili de type IV jouent un rôle essentiel. A ce stade, les bactéries sont ancrées à la surface et l'attachement est irréversible (131).

- Structuration et consolidation du biofilm

P. aeruginosa se met alors à synthétiser de l'alginate, représentant la matrice exopolysaccharidique. Cette matrice est volumineuse puisqu'elle représente environ 85% du volume total. Elle apporte de la solidité au biofilm mais permet tout de même de garder une certaine fluidité. Les microcolonies forment des tubes, semblables aux mycéliums des champignons, créant ainsi des canaux aqueux entre les colonies. Ces canaux forment un réseau de circulation rendant possible : l'apport d'oxygène et de nutriments aux régions les plus enfouies du biofilm, et l'évacuation des déchets produits par les bactéries. L'alginate est responsable de la viscosité des mucosités isolées de patients mucoviscidosiques (131).

- Colonisation des surfaces

Des lambeaux de biofilms se détachent et s'implantent sur des surfaces saines (90).

La présence de souches mucoïdes au niveau des poumons des patients MV est étroitement liée au caractère chronique de l'infection. Les bactéries se trouvent très majoritairement sous forme de biofilm, dont la présence dans les poumons de patients MV augmente la viscosité des sécrétions et engendre une obstruction des poumons. On ne sait pas avec précision où se localise le biofilm. Des études avancent le fait que la majorité des souches mucoïdes de *P. aeruginosa* se situent à l'intérieur du mucus, où les bactéries sont dans des conditions d'anaérobiose (127). D'autres études suggèrent que *P. aeruginosa* se développe directement sur les cellules épithéliales ou à l'intérieur (130). Une étude de Soong *et al.* (2006) vient renforcer cette dernière hypothèse. Ainsi, il existe des souches mutantes de *P. aeruginosa* ayant perdu la capacité à synthétiser la neuraminidase. Cette déficience rend impossible l'établissement d'une liaison avec le récepteur asialoGM1 des cellules épithéliales et le biofilm ne peut plus se former (132). Les souches de *P. aeruginosa* isolées de patients MV surexpriment le gène de la neuraminidase. Par conséquent, la construction du biofilm est potentialisée. Un contact direct entre *P. aeruginosa* et l'épithélium est donc fondamentale, surtout au stade précoce de la colonisation (133).

Comme nous l'avons déjà vu, une réponse immunitaire de l'hôte se met en place, via la production d'IgG et d'IgA dirigés contre l'alginate du biofilm. Le taux d'anticorps reflète la sévérité et l'ancienneté de l'infection chronique. Ces complexes anticorps-antigène accélèrent le processus inflammatoire. Au début de l'infection chronique, le biofilm est localisé. Au sein des poumons, on observe alors et des zones détruites par la réaction inflammatoire et des zones intactes. La dégradation des tissus pulmonaires est due à la progression de l'inflammation. Chez les patients infectés par des souches non mucoïdes, les taux d'anticorps sont bas, l'inflammation est moins marquée et la dégradation des tissus pulmonaires moins importante (127).

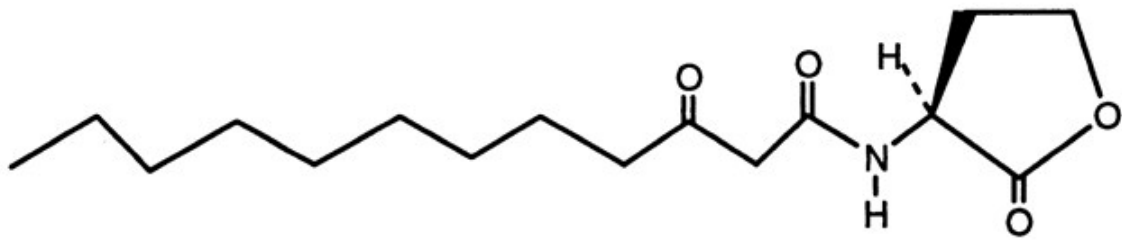
L'alginate, principal constituant du biofilm, contribue à la persistance de l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa*, en facilitant la formation de microcolonies et en limitant la toxicité des radicaux oxygénés produits par les macrophages (122). Deux autres substances jouent un rôle dans la formation du biofilm chez les patients MV. Il s'agit de l'ADN et de l'actine, retrouvés dans les crachats. L'ADN entre dans la composition du biofilm et facilite sa formation. L'actine, quant à elle, sert de site d'attachement à *P. aeruginosa* (130).

La formation d'un biofilm protège la bactérie, ainsi l'infection persiste au sein des poumons. Le biofilm pose d'importants problèmes pour la prise en charge thérapeutique, notamment chez les patients MV. En effet, les bactéries étant englobées dans la matrice exopolysaccharidique, la réponse immunitaire de l'hôte n'est pas efficace car la matrice fait écran, notamment à la phagocytose par les macrophages. Par ailleurs, la matrice exopolysaccharidique ralentit la pénétration des antibiotiques. Ceci entraîne une tolérance et une résistance des bactéries. La tolérance signifie que la bactérie n'est pas tuée mais elle est incapable de se développer en présence de l'antibiotique, tandis qu'une bactérie résistante peut proliférer en présence de celui-ci. L'ADN, situé dans la matrice du biofilm, est capable de neutraliser l'activité antimicrobienne des aminoglycosides (notamment la tobramycine), de par sa propriété à chélater les molécules cationiques (134). De plus, les bactéries se situant au sein du biofilm se trouvent dans un environnement pauvre en nutriments ; elles ont par conséquent un métabolisme ralenti et une croissance lente. Cela engendre une inefficacité de la plupart des antibiotiques (113).

6.6 Le « quorum sensing »

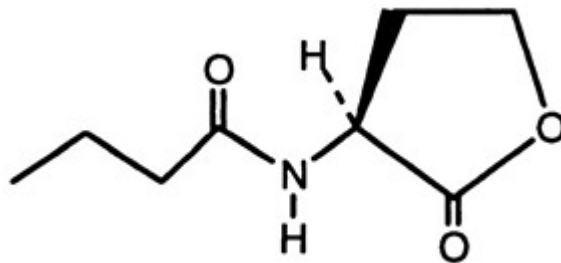
Le « quorum sensing » peut être considéré comme un véritable système de communication entre les bactéries. Il leur permet de coordonner leur comportement vis-à-vis d'un environnement particulier (135) et de contrôler la grande majorité des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (136). Dans un tel système, c'est la densité de bactéries qui fait varier la communication interbactérienne, d'où le terme de quorum (137). Ce système assure la synthèse de molécules de petite taille, les acylhomosérines lactones (AHL), et leur diffusion entre bactéries au travers des membranes (138). Les AHL sont des composés organiques contenant entre 4 et 16 atomes de carbone (134). Chez *P. aeruginosa*, deux AHL ont été mises en évidence : la 3-oxo-C12-HSL (Figure 28) et la C4-HSL (Figure 29).

Le « quorum sensing » amplifie et coordonne l'expression de gènes de virulence (élastase, exotoxine A, pyocyanine...) par activation de leur transcription (139). On estime que 6 à 10 % du génome est régulé par le « quorum sensing » (140).



N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone

Figure 28 : Structure chimique de la 3-oxo-C12-HSL (141)



N-butyryl-L-homosérine lactone

Figure 29 : Structure chimique de la C4-HSL (141)

Trois systèmes de « quorum sensing » sont connus chez *P. aeruginosa* : les systèmes *las*, *rhl* et PQS.

6.6.1 Le système *las*

C'est le premier système de « quorum sensing » découvert chez *P. aeruginosa*. Il est ainsi appelé car il régule l'expression de l'élastase LasB (140).

Le système *las* comporte deux gènes : le gène *lasR* qui code une protéine régulatrice LasR et le gène *lasI* qui code une enzyme auto-inductrice synthase LasI (142). L'enzyme LasI synthétise un type d'AHL : la N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) (Figure 30). Cette molécule peut traverser aisément les membranes bactériennes par diffusion, ce qui permet aux bactéries de communiquer entre elles (143).

Lorsque la concentration en bactéries est élevée, celle en 3-oxo-C12-HSL augmente jusqu'à atteindre un seuil critique. Ceci entraîne la liaison d'une molécule d'AHL à deux protéines LasR, le complexe résultant active alors la transcription de certains gènes. Cette activation est déclenchée de façon synchrone dans toute la population bactérienne (144). Parmi les gènes activés, *lasA* et *lasB* codent deux élastases et *aprA* code une protéase alcaline. Ces trois gènes codent des protéines qui participent à la destruction des tissus pulmonaires (143). Le gène *toxA* est également activé et il code une exotoxine ADP-ribosylante. La fixation du complexe 3-oxo-C12-HSL-LasR au niveau du gène *lasI* est à l'origine d'une amplification du signal, puisque ce gène est un auto-inducteur de la synthèse accrue de 3-oxo-C12-HSL (Figure 30) (145).

6.6.2 Le système *rhl*

Il est appelé ainsi car il régule la production de rhamnolipide (140). Le système *rhl* comporte également deux gènes : le gène *rhlR* qui code une protéine RhlR et le gène *rhlI* qui code une enzyme auto-inductrice synthase RhlI. Cette enzyme permet la synthèse d'un autre type d'AHL : la N-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL) (142). Lorsque la concentration en C4-HSL atteint un seuil critique, une molécule d'AHL se lie à deux protéines RhlR. Le complexe contrôle alors l'expression de l'opéron *rhlAB*, nécessaire à la synthèse de rhamnolipide, et l'expression d'une série de gènes dont *lasB*, *lasA*, *aprA* et *rhlI* (Figure 30) (146).

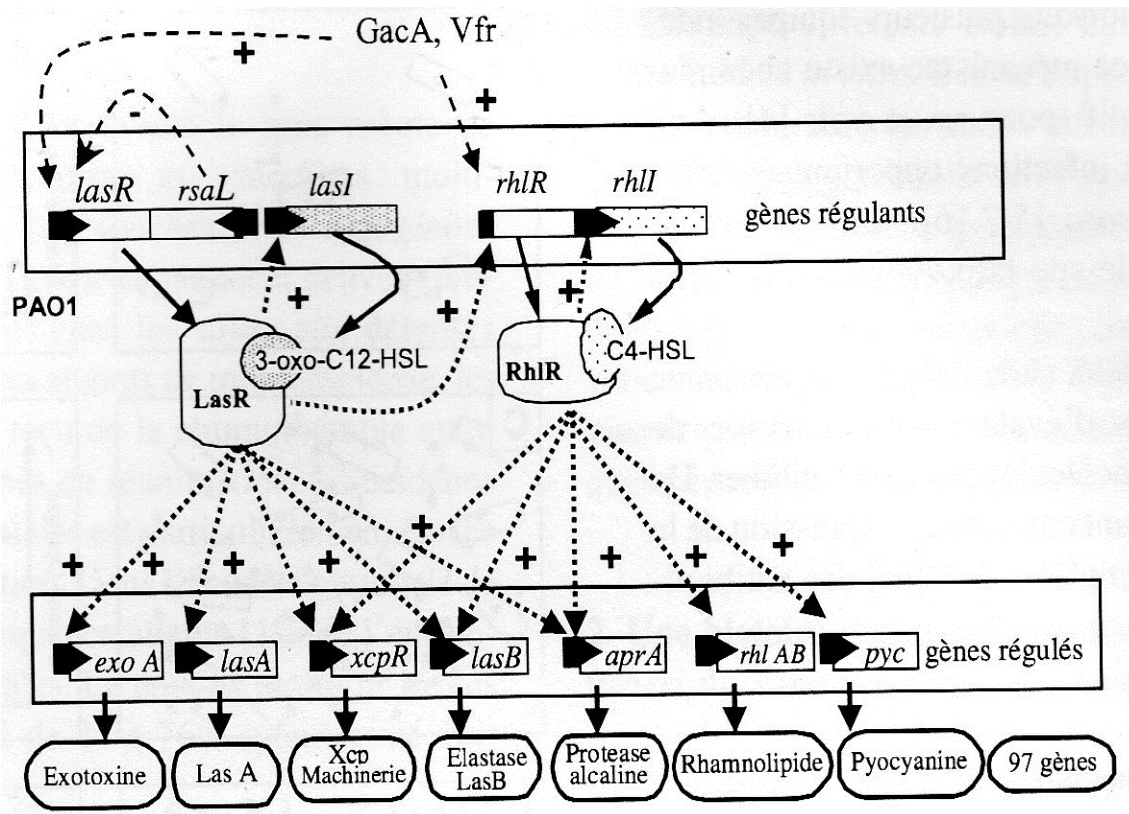


Figure 30 : Mécanisme moléculaire du « quorum sensing » chez *Pseudomonas aeruginosa* (147)

Les deux systèmes *las/rhl* présentent une analogie structurale, notamment au niveau des couples activateurs/inducteurs (LasR/LasI et RhlR/RhII) (148). Cependant, aucun des composants des deux systèmes ne peut remplacer ceux de l'autre. Des interactions existent quand même entre ces deux systèmes. Ainsi, le complexe 3-oxo-C12-HSL-LasR active la transcription de *rhlR* et de *rhlI* (149). De plus, les 3-oxo-C12-HSL peuvent entrer en compétition avec les C4-HSL au niveau du site de liaison à RhlI. Elles pourraient ainsi agir comme un antagonisme du système *rhl* (Figure 30). Ces deux systèmes sont donc hiérarchisés : le système *las* régule positivement le système *rhl* (150).

6.6.3 Le système PQS

Il existe un troisième système auto-inducteur dont la structure est très différente des deux autres. Il s'agit du 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone ou PQS (*Pseudomonas* quinolone signal).

Ce système présente des analogies de structure avec les antibiotiques de la famille des quinolones. La synthèse et la bioactivité du PQS dépend des systèmes *las* et *rhl*. La transcription des gènes nécessaire à la synthèse du PQS est régulée positivement par LasR et négativement par le système *rhl*. PQS appartient à la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) possédant une activité antimicrobienne. Les opérons *pqsABCDE* et *phnAB* sont impliqués dans la synthèse des HAQ. L'expression de ces deux opérons est régulée positivement par le facteur transcriptionnel associé à la virulence PqsR. La 4-hydroxy-2-heptylquinoline est transformé en PQS par PqsH dont l'expression est contrôlée par LasR (142).

Des AHL ont été mises en évidence dans les expectorations et les biopsies bronchiques des patients MV (144). L'AHL 3-oxo-C12-HSL exerce une activité immunomodulatrice chez l'hôte. En effet, elle inhibe la prolifération lymphocytaire en diminuant la production de TNF- α par le LPS et en favorisant la vasodilatation. Cette molécule est également capable d'induire l'apoptose des macrophages et des polynucléaires neutrophiles (151).

Le « quorum sensing » intervient dans la formation du biofilm (152). Il joue un rôle dans la troisième étape, correspondant à la structuration de ce biofilm. Le gène *lasI* est déterminant, car une souche mutée pour ce gène donne un biofilm plus fin, peu structuré et sensible à l'action d'un détergent à 0,2% SDS. L'ajout de 3-oxo-C12-HSL restaure un biofilm structuré (153).

Avec l'aide du « quorum sensing », *P. aeruginosa* est capable d'immobiliser et de tuer les polynucléaires, par la production de rhamnolipide (127).

7 Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est l'exemple type de la bactérie opportuniste. En Europe, cette bactérie est le troisième pathogène responsable d'infections nosocomiales après *Escherichia coli* et *S. aureus* (154). Elle touche principalement des personnes dont l'immunité est affaiblie localement (opérations chirurgicales, brûlures) ou de façon systémique (cancers) et les patients MV. L'infection par le bacille pyocyanique peut être favorisée par les traitements à base d'immunosuppresseurs, de corticoïdes ou encore d'antibiotiques à large spectre (90).

P. aeruginosa est à l'origine de plusieurs types d'infections :

- des infections pulmonaires : on observe des pneumopathies chez les malades trachéotomisés, notamment en service de réanimation, les insuffisants respiratoires sous antibiothérapie prolongée et les malades atteints d'hémopathies ou de cancers et recevant une chimiothérapie (88).
- des infections urinaires : elles sont très fréquentes et toujours nosocomiales, notamment en cas de sondage urétral à demeure, ou iatrogènes à la suite d'une exploration des voies urinaires (88).
- des infections ostéo-articulaires : on observe des ostéites (environ 10 % des cas) ou des arthrites septiques (environ 20 % des cas) (90).
- des surinfections de lésions cutanées, en particulier chez les grands brûlés (89).
- des septicémies : elles représentent 10 à 20 % des septicémies à bacilles à Gram négatif. Les principales portes d'entrées sont les bronchopneumopathies, les infections cutanées, les infections sur cathéter, les infections abdominales et urinaires hautes. Elles se manifestent sur des terrains débilisés : myélodysplasie, neutropénie, pathologie sous-jacente nécessitant une antibiothérapie antérieure, corticothérapie générale ou chimiothérapie antitumorale. Elles sont favorisées par l'immunosuppression. Ainsi, les septicémies ont une fréquence élevée chez les patients sidéens (89).
- des endocardites (environ 1 %) peuvent être causées par *P. aeruginosa*. Chez les toxicomanes, ce sont principalement des endocardites tricuspidiennes (90 % des cas) (88).

8 Diagnostic microbiologique

8.1 Examen direct et coloration de Gram

Après montage entre lame et lamelle d'une goutte d'échantillon, on observe des bacilles très mobiles se déplaçant en ligne droite grâce à leur flagelle. Les bacilles sont fins et souvent incurvés. On réalise également une coloration de Gram qui se révèle négative (Figure 31) (90).

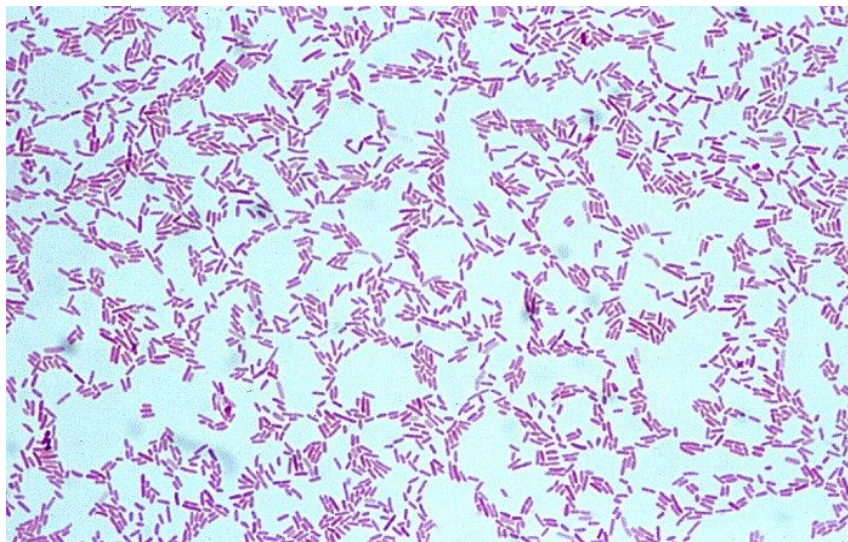


Figure 31 : *Pseudomonas aeruginosa* en coloration de Gram (155)

8.2 Identification par tests biochimiques

Le diagnostic est facilité par un test à l'oxydase qui se révèle positif (Figure 32) (90).

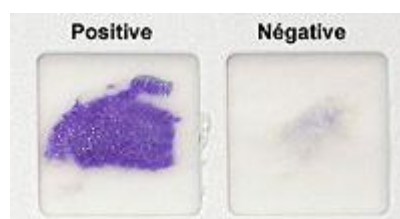


Figure 32 : Le test à l'oxydase (156)

L'identification conventionnelle utilise les réactions d'oxydation différentielle des glucides. Celles-ci se font dans des milieux peu tamponnés et peu peptonés comme les milieux « OF » (Oxydation-Fermentation) de Hugh et Leifson. Les tests d'assimilation de substrats carbonés (auxanogrammes) sont également employés (90). La galerie API 20NE (Biomérieux) est un système d'identification qui combine les deux tests (8 épreuves conventionnelles et 12 épreuves d'auxanogrammes). La galerie est incubée entre 30°C et 37°C pendant 24 à 48 heures avant son interprétation (Figure 33) (157)



Figure 33 : Galerie API 20NE (158)

8.3 Identification par la technique Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry = MALDI-TOF MS

La méthode d'étude MALDI-TOF est une technique de spectrométrie de masse (159). Elle permet l'étude du phénotype des bactéries (160) par l'analyse de leurs protéines totales (protéines ribosomales et protéines associées aux membranes) (161). Le principe de la spectrométrie de masse est la séparation en phase gazeuse de particules chargées, les ions, en fonction de leur rapport masse/charge. On obtient ainsi un spectre des masses moléculaires des différents composés de la bactérie. L'échantillon de bactéries à identifier provient de cultures sur milieux solides, on parle alors d'acquisition sur bactéries intactes. Aucune étape de purification préalable n'est nécessaire. Les bactéries obtenues en culture sont déposées sur une plaque métallique support. Elles subissent ensuite une transformation au cours d'un processus de désorption-ionisation. La plaque est séchée et recouverte d'une matrice. Les

propriétés intrinsèques de la matrice permettent la cristallisation à température ambiante : c'est l'étape de co-cristallisation. Une lumière laser est diffusée sur la matrice qui va absorber l'énergie photonique. Cette absorption d'énergie provoque la rupture des liaisons intermoléculaires. C'est l'étape de désorption correspondant à l'expansion en phase gazeuse du mélange matrice-échantillon. Les molécules sont ensuite transformées en ions lors du processus d'ionisation. La matrice ionisée transfère alors, soit des protons H^+ (formation d'ions positifs), soit des électrons (formation d'ions négatifs) vers les molécules de l'échantillon. Les ions formés, qui ont des masses et des charges différentes, sont soumis à un champ électrique et « volent » jusqu'à un détecteur situé à l'extrémité du tube de vol. Ainsi, la distance parcourue en un temps donné (« Time-Of-Flight ») est fonction du rapport masse/charge. Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. C'est pourquoi, les ions ayant une masse élevée atteignent le détecteur moins rapidement que ceux ayant une masse plus faible. L'arrivée des ions au bout du tube de vol est détectée et enregistrée par un multiplicateur d'électrons, et le signal est traité par informatique. Chaque ion détecté est caractérisé par sa masse, sa charge, le rapport masse/charge et l'intensité relative du signal. Cette dernière donnée permet une approche quantitative de la présence de la molécule correspondante, dans l'échantillon étudié. On obtient alors une empreinte spectrale sous forme de pics, caractérisés chacun par un rapport masse/charge et une intensité. (Figure 34) (159).

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

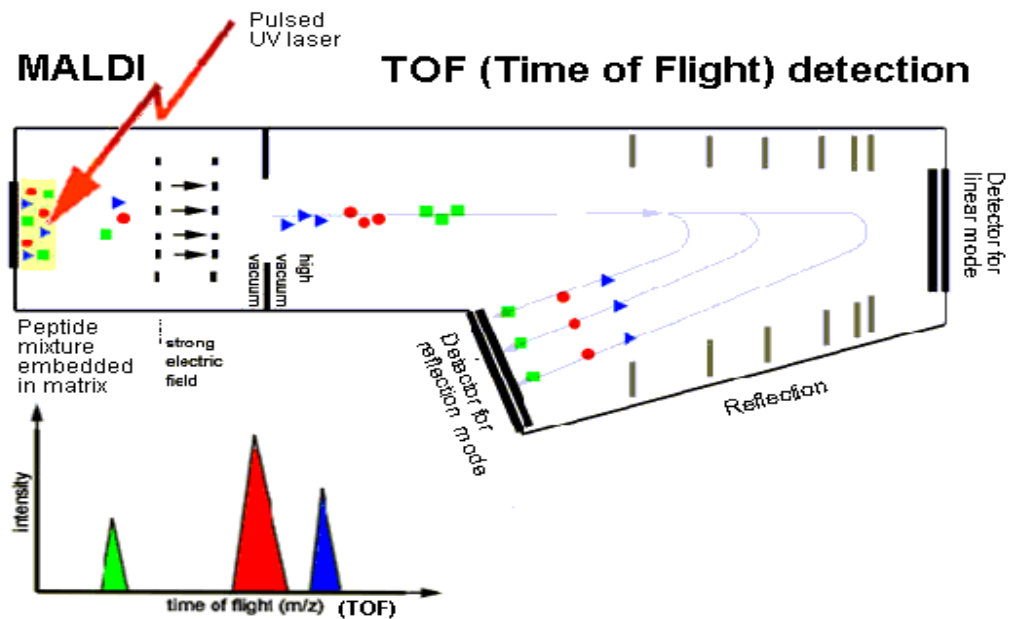
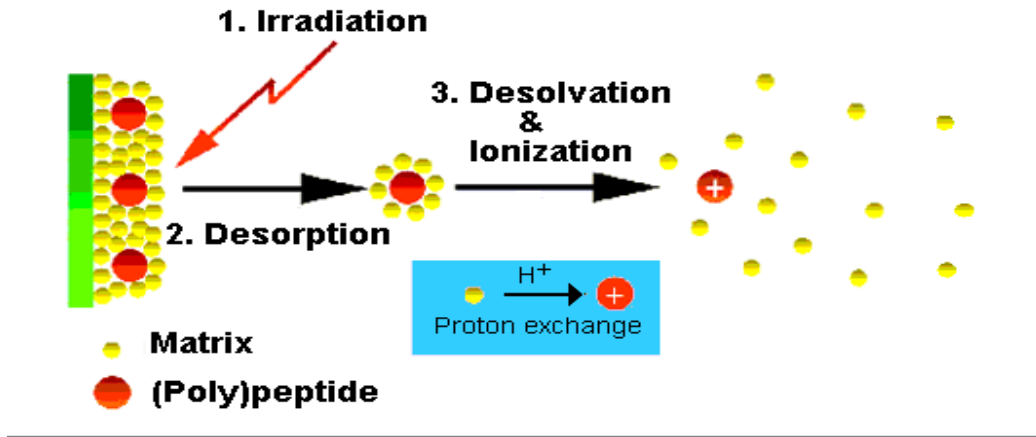


Figure 34 : Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (162)

La majorité des pics détectés correspond aux protéines ribosomales, constamment exprimées et conservées par la bactérie, représentant une grande proportion du protéome bactérien (160). Chaque espèce bactérienne possède un spectre qui lui est propre. Après comparaison du spectre obtenu aux spectres contenus dans les bases de données, on peut ainsi facilement identifier *P. aeruginosa*. (Figure 35) (159).

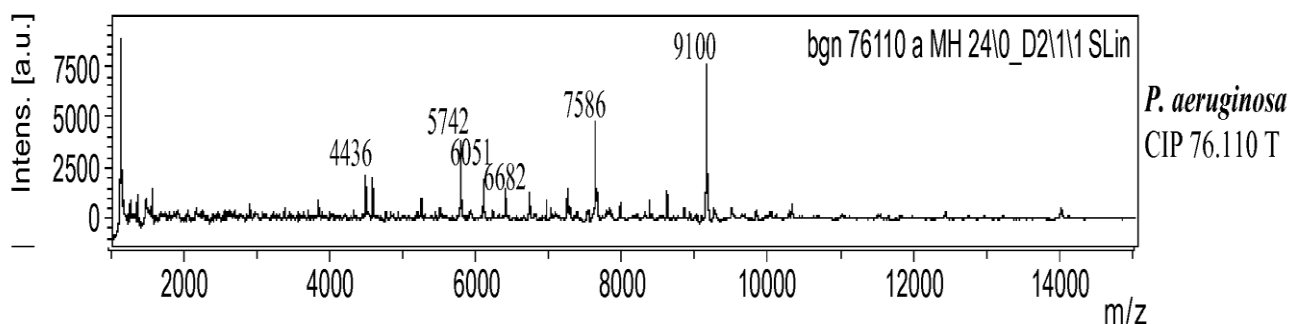


Figure 35 : Spectre MALDI-TOF MS de *Pseudomonas aeruginosa* (160)

Plusieurs bactéries infectent les poumons des patients MV. Il est indispensable de disposer d'une technique d'identification rapide et fiable, pour permettre un suivi et une thérapie antibiotique adaptée à chaque bactérie (163). Ces éléments clés sont réunis dans la technique MALDI-TOF (160). De plus, ce procédé permet d'identifier des bactéries pour lesquelles les techniques biochimiques habituelles sont insuffisantes. C'est le cas, par exemple, des bactéries *Burkholderia* du complexe *cepacia* et *Pandoraea* spp (164).

Le caractère mucoïde des souches isolées des patients infectés chroniquement par *P. aeruginosa* constitue un obstacle aux tests d'identification biochimique. La technique MALDI-TOF a l'avantage de permettre l'identification de ces souches (160).

Après acquisition de l'automate, la technique est peu coûteuse (165) et précise (166). De plus, lorsque les paramètres sont standardisés, la reproductibilité et la précision des résultats intra- ou inter-laboratoire sont fiables (159). Une telle technique est simple et peut être réalisée par un personnel débutant. Grâce à tous ces avantages, ce procédé pourrait remplacer les techniques phénotypiques habituelles (160).

8.4 Identification par la technique Polymerase Chain Reaction = PCR

La PCR est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation par l'action d'une ADN polymérase. Le cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (167).

La mise en place rapide d'un traitement antibiotique agressif, lors de la primo-infection par *P. aeruginosa*, permet d'espérer une éradication et de retarder la colonisation chronique (168). La PCR permet une détection précoce de la présence de *P. aeruginosa* (169). Les techniques habituelles d'identification, telles que la mise en culture ou l'étude des caractères biochimiques, ont des limites. De plus, des confusions sont possibles à cause des variations phénotypiques de la bactérie (170). Ces variations peuvent consister en l'arrêt de la production de pigment, au passage à un phénotype mucoïde ou en l'apparition d'un polysaccharide rugueux dépourvu d'antigène O (171). Les souches mucoïdes vivant en anaérobiose se développent difficilement dans les conditions de culture habituelles en aérobie. Les poumons des patients MV abritant de nombreuses bactéries, des erreurs d'identification entre *P. aeruginosa* et des bacilles à Gram négatif voisins peuvent être commises, lorsque l'on utilise les milieux de culture habituels (172).

La PCR permet d'augmenter le taux de détection de bactéries, comparativement à la culture, ainsi que la qualité de l'identification (173). Lors d'une PCR, plusieurs gènes peuvent être ciblés tels que *fliC*, *oprL*, *gyrB*, *algD*, *ecfX* ou encore l'ARNr16S. La spécificité de la technique dépend en grande partie du choix de l'amorce. En effet, il est primordial d'utiliser des amorces qui se lient uniquement aux gènes cibles. L'utilisation du gène *oprL* pour la PCR, contrairement à celle de *fliC*, donne d'excellents résultats (169). Le gène *oprL* est très spécifique de *P. aeruginosa*, la limite de détection est alors de 15 bactéries/mL (174). L'utilisation simultanée de deux gènes cibles lors de la PCR améliore la technique (175). La combinaison *gyrB/ecfX* montre une meilleure spécificité (172). Il est à noter que *P. aeruginosa* est capable d'échanger du matériel génétique avec d'autres bactéries pouvant avoir un impact sur la spécificité de la PCR (175).

Dans la détection précoce de la bactérie, la PCR possède une très bonne sensibilité de 93 % contre 82 % pour la culture (171). Cette sensibilité étant optimale lorsque le taux de bactéries présentes dans l'échantillon est élevé. Cependant, lorsque la concentration en bactéries est faible, comme c'est le cas de patients récemment colonisés, la technique montre des limites et peut faillir à la mise en évidence des bactéries. Différents paramètres influencent la sensibilité, tels que le pré-traitement de l'échantillon (168), la méthode d'extraction de l'ADN ou le cycle de PCR choisi (169). Pour que la PCR puisse être utilisée par tous les laboratoires, il est indispensable de fixer avec précision chacun de ces paramètres (169).

Lorsque l'on confronte la culture et la PCR, trois cas de figures sont possibles :

- on obtient une culture et une PCR positives, la bactérie est présente dans l'arbre bronchique (169) ;
- le résultat de la culture est négatif et celui de la PCR est positif :
 - dans certains cas, le résultat de la culture devient positif quelque mois plus tard. La PCR est donc capable de détecter *P. aeruginosa* plus précocement que la culture. Cependant, la PCR étant ciblée sur un gène, on ne peut pas savoir si la souche détectée lors de la seconde PCR est génotypiquement identique à la souche mise en évidence quelques mois plus tôt (169) ;
 - dans d'autres cas, le résultat de la culture reste négatif (169). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'inoculum bactérien est trop faible pour se développer sur le milieu de culture (174) ou que la PCR a détecté l'ADN de bactéries mortes (170) ;
- le résultat de la culture est positif et celui de la PCR est négatif. Dans ce cas, on peut suggérer une erreur lors de la PCR ou bien la présence dans l'inoculum d'espèces bactériennes, autres que celle recherchée (170).

La PCR permet d'étudier la transmission d'un même clone de *P. aeruginosa* chez les patients MV, ceci étant impossible avec la culture (169).

8.5 Le dosage des anticorps

L'étude de la sérologie se fait au moyen d'une immuno-électrophorèse. Cette technique permet la mise en évidence des arcs de précipitation au sein d'un gel d'agarose. Les anticorps présents dans le gel sont immobiles (176). Les antigènes correspondent à un lysat de *P. aeruginosa*, à l'élastase et à l'exotoxine A (37). Etant chargés négativement, ils vont migrer sous l'effet du champ électrique imposé au gel d'agarose. Lorsqu'un antigène rencontre un anticorps, un arc de précipitation se forme (Figure 36). Ce dernier prend la forme d'une fusée dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en antigène (176).

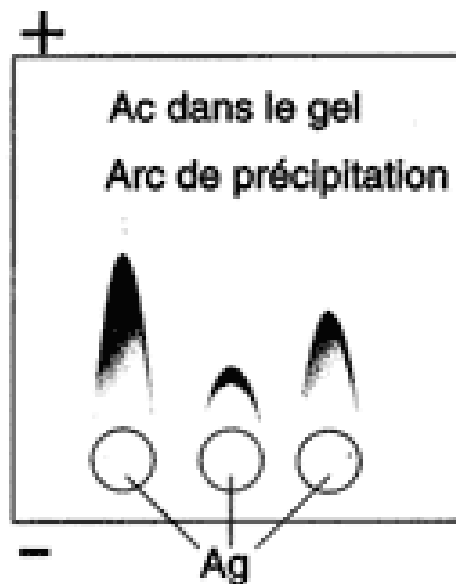


Figure 36 : Détection d'anticorps anti-*Pseudomonas aeruginosa* par immuno-électrophorèse (176)

La recherche d'anticorps anti-pyocyanique permet de pallier le manque de sensibilité de la culture. Le suivi sérologique est susceptible de révéler une production précoce d'anticorps anti-pyocyanique chez les malades, parfois, avant même la mise en évidence de la bactérie par culture (177). Ainsi, on peut mettre en place un protocole thérapeutique précoce.

8.6 L'antibiogramme

8.6.1 Mécanismes de résistance

8.6.1.1 Résistances naturelles

P. aeruginosa présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques qui est liée à différents aspects.

La très faible perméabilité de la membrane externe limite la pénétration des antibiotiques à l'intérieur de la bactérie (178), potentialisant ainsi l'action d'enzymes hydrolytiques ou modificatrices et l'action de systèmes d'efflux (179).

P. aeruginosa produit également une β -lactamase à large spectre appelée AmpC. La synthèse est induite par certaines β -lactamines. Cette enzyme hydrolyse les aminopénicillines (amoxicilline et ampicilline) et les céphalosporines de première et de deuxième génération. D'autres antibiotiques résistent à l'action de cette enzyme, si elle est produite à un niveau basal : la ticarcilline (carboxypénicilline), la pipéracilline (uréidopénicilline), les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfépime) ou encore les carbapénèmes (imipénème, méropénème et doripénème). Toutefois, l'enzyme AmpC est capable de neutraliser le céfotaxime et la ceftriaxone, par un mécanisme encore mal connu. (179).

P. aeruginosa possède une douzaine de systèmes d'efflux actifs appartenant à la famille RND (Resistance Nodulation cell Division). Parmi ces systèmes, seuls deux, appelés Mex (Multiple efflux), sont en réalité responsables de la résistance aux antibiotiques. Il s'agit de pompes : la première, produite de façon permanente, est la pompe MexAB-OprM (association des protéines MexA + MexB + OprM), la seconde, synthétisée en présence d'antibiotique (synthèse inductible), est la pompe MexXY-OprM. Ces systèmes de pompes à efflux fonctionnent grâce à l'énergie de la membrane cytoplasmique en couplant l'efflux des molécules antibiotiques à l'entrée de protons (179).

8.6.1.2 Résistances acquises

8.6.1.2.1 Résistances enzymatiques

La résistance aux β -lactamines

Certains gènes de la bactérie peuvent être touchés par diverses mutations. C'est le cas du gène codant l'enzyme AmpC (céphalosporinase naturelle). On observe alors une surproduction de cette enzyme, entraînant une destruction de la plupart des β -lactamines, à l'exception des carbapénèmes (180).

La résistance aux aminosides

P. aeruginosa peut acquérir des gènes de résistance aux aminosides via des plasmides. Ces gènes produisent des enzymes qui modifient les fonctions $-NH_2$ ou $-OH$, compromettant la fixation de l'aminoside sur le ribosome. Ces enzymes sont produites de façon constitutive. Actuellement, trois classes d'enzymes sont connues : les aminosides-N-amino-acétyl-transférases (AAC), les aminosides-o-nucléotidyl transférases (ANT) et les aminosides-o-phosphotransférases (APH) (179).

Un nouveau mécanisme de résistance a été identifié ces dix dernières années. Il consiste en une modification de l'ARN 16S, structure sur laquelle l'aminoside se fixe pour exercer son action. Cette modification se fait au moyen de méthylases RmtA et RmtD (Resistance methylase transferase) (179).

8.6.1.2.2 Résistances non enzymatiques

Pour pénétrer à l'intérieur de la bactérie, les β -lactamines utilisent des canaux protéiques transmembranaires appelés porines. Les carbapénèmes empruntent une porine spécifique : la porine OprD. Des mutations peuvent entraîner une perte de la porine OprD, augmentant ainsi la résistance vis-à-vis des carbapénèmes. Parmi cette classe d'antibiotiques, le doripénème et le méropénème sont les moins touchés par la mutation, contrairement à l'imipénème (179).

Une surproduction des systèmes d'efflux actifs MexAB-OprM et MexXY-OprM peut être observée chez *P. aeruginosa*. Elle est due à des mutations spontanées au niveau des gènes régulateurs de ces systèmes, ce qui a pour conséquence d'augmenter la résistance à plusieurs

classes d'antibiotiques. Les souches surexprimant la pompe MexAB-OprM sont davantage résistantes aux β -lactamines (notamment la ticarcilline, le céfotaxime et l'aztréonam) que les souches sauvages. La surproduction de la pompe MexXY-OprM entraîne une augmentation de la résistance vis-à-vis des céphalosporines (céfépime et cefpirome), des aminosides (gentamicine et amikacine) et des fluoroquinolones (179).

L'efficacité des fluoroquinolones peut être compromise par l'altération de leurs sites d'action. Les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV. Ces deux enzymes interviennent au niveau de la transcription et de la réplication de l'ADN. Lorsqu'elles sont touchées par des mutations (substitution d'acides aminés), les fluoroquinolones ne peuvent plus atteindre leur site d'action et on observe une augmentation de la résistance à cette classe d'antibiotiques (179).

P. aeruginosa est capable de développer des résistances vis-à-vis de la classe des polymyxines (polymyxine B et colistine). Il s'agit d'antibiotiques bactéricides, qui désorganisent la membrane externe puis la membrane cytoplasmique de la bactérie. Pour résister à ces antibiotiques, *P. aeruginosa* modifie la composition de sa membrane externe nuisant ainsi à leur action. Ces modifications sont le fruit de mutations ou de l'activation de systèmes membranaires complexes (179).

8.6.2 Principe de l'antibiogramme

L'antibiogramme est une technique qui permet de connaître la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique. On détermine alors une concentration minimale inhibitrice (CMI). La valeur de la CMI permet de classer les souches bactériennes en trois catégories : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) (181).

Il existe deux principes :

- L'antibiogramme en milieu solide = méthode par diffusion

C'est la méthode de référence. On dépose, sur la gélose préalablementensemencée, des disques de papier filtre imprégnés d'antibiotique. Après incubation, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition de croissance de la bactérie (Figure 37). Ce paramètre permettra de déterminer la CMI grâce à des courbes de concordances (181).



Figure 37 : Antibiogramme en milieu solide de *Pseudomonas aeruginosa* (182)

Une variante de cette méthode permet une mesure directe de la CMI. Il s'agit de la méthode de l'E-test®. On applique une bandelette sur une gélose ensemencée. La bandelette est graduée en valeurs croissantes de CMI sur le côté face et imprégnée d'un gradient continu de concentrations d'antiotiques sur le côté en contact avec la gélose. La CMI est déterminée, après 18 heures d'incubation, au point d'intersection de la bandelette avec la zone d'inhibition (Figure 38) (181).

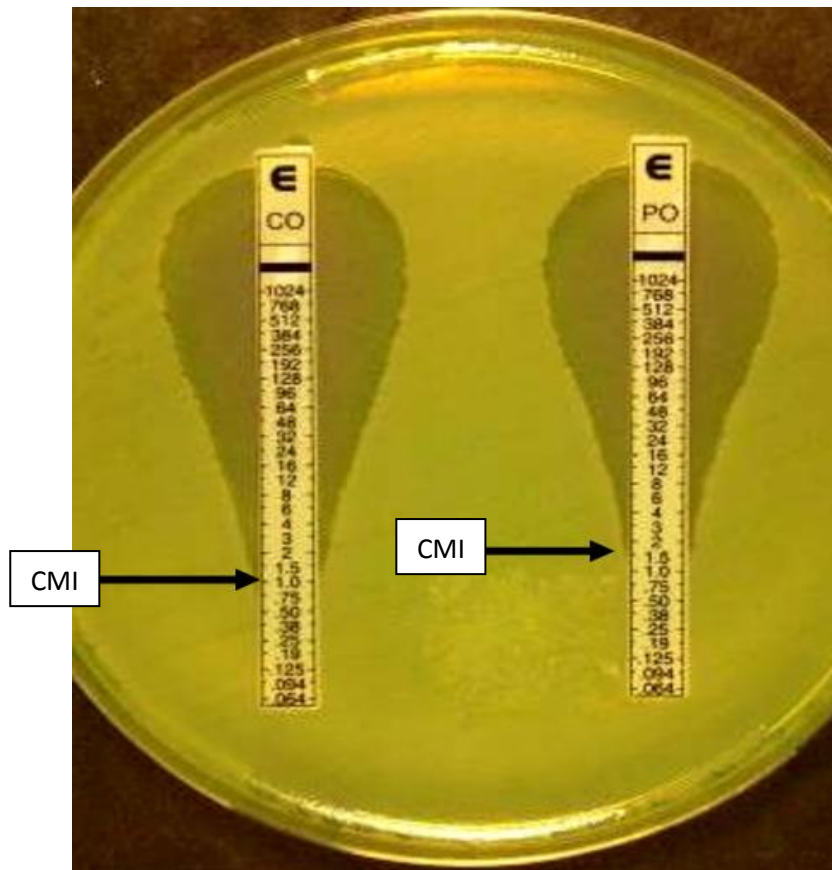


Figure 38 : Méthode de l'E-test® avec *Pseudomonas aeruginosa* (183)

- L'antibiogramme en milieu liquide

Cette technique est automatisée. Elle ne peut pas être utilisée pour les souches mucoïdes, auquel cas on a recours à l'antibiogramme en milieu solide (181).

8.7 Les techniques de génotypage

La détermination des génotypes des souches de *P. aeruginosa* est essentielle pour assurer la traçabilité des souches et suivre ainsi l'épidémiologie (5).

Différentes techniques sont à disposition pour réaliser le génotypage des souches de *P. aeruginosa* :

- l'étude du polymorphisme de restriction de l'ADN génomique (RFLP = restriction fragment length polymorphism) ;
- la technique PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) ;
- la technique RAPD (random-amplified polymorphic DNA) ;
- le ribotypage qui consiste en l'étude des variations des gènes d'ARN ribosomique ;
- l'étude des polymorphismes nucléotidiques par MLST (multilocus sequence typing) ;
- la technique Rep-PCR (repetitive element base PCR) ;
- l'étude de la répétition en tandem d'une séquence nucléotidique (VNTR = variable number of tandem repeat) par MLVA (multiple locus VNTR analysis) (184).

La technique RFLP (restriction fragment length polymorphism)

La RFLP est utilisée pour différencier ou comparer des molécules d'ADN (184). Cette technique comporte plusieurs étapes (figure 39). La première étape consiste en une extraction de l'ADN. Au cours de la deuxième étape, l'ADN est digéré à l'aide d'une enzyme de restriction. On obtient alors des fragments d'ADN de longueurs différentes selon les souches. La taille de ces fragments dépend du nombre de sites de restriction reconnus par l'enzyme utilisée. Il en résulte un polymorphisme de longueur des fragments de restriction. On rend ainsi possible la différenciation entre deux souches. Dans une troisième étape, on va visualiser les différents fragments d'ADN obtenus, en les séparant en fonction de leur taille, grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN, chargé négativement, va migrer de la cathode vers l'anode et les fragments les plus petits se déplacent le plus loin. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon et dénaturé. On réalise alors un Southern Blot. La membrane est incubée dans une solution contenant une sonde préalablement marquée soit par un élément radioactif, soit chimiquement. La sonde s'hybride alors avec les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie. Les endroits, où la sonde s'est fixée, sont révélés en plaçant la membrane au contact d'un film sensible à la radioactivité, ou en provoquant une réaction enzymatique colorée spécifique (185).

Pour *P. aeruginosa*, l'hybridation de l'ADN chromosomique se fait au niveau de gènes producteurs de toxine. Le développement de sondes génétiques spécifiques, basées sur

les facteurs de virulence de la bactérie, permet d'étudier la relation clonale entre les isolats de *P. aeruginosa*. Vasil *et al.* ont développé une sonde du gène codant l'*exoA* pour l'utiliser comme marqueur épidémiologique de *P. aeruginosa*. D'autres modèles d'hybridation relatifs aux sondes de gènes d'élastase et d'alginate D (*algD*) peuvent être utilisées. La sonde du gène *exoA* est cependant la plus employée pour l'étude de l'épidémiologie. Avec cette sonde, la RFLP est la méthode de typage de choix pour les souches isolées de patients MV. La RFLP est une technique reproductible, possédant un haut pouvoir discriminant. Cependant, de par sa complexité technique, seuls quelques laboratoires de recherche peuvent la mettre en œuvre. Elle est largement remplacée par les méthodes PFGE et RAPD-PCR (184).

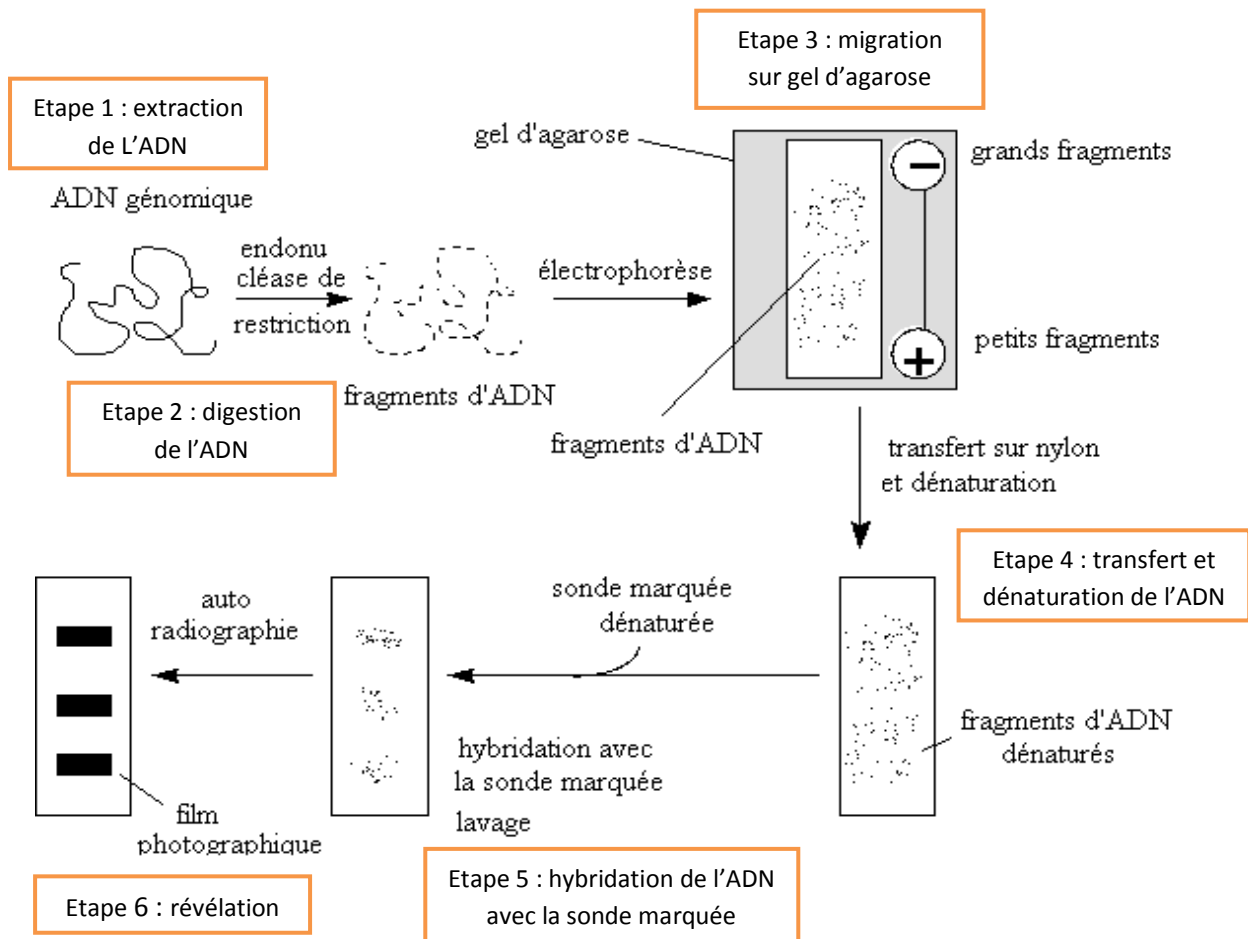


Figure 39 : Etapes de la révélation du RFLP porté par un ADN (186)

La technique PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)

Développée en 1984 par Schwartz et Cantor, cette technique est la méthode de référence pour le typage de l'ADN de *P. aeruginosa*. Il s'agit d'une technique d'électrophorèse en champ pulsé (Figure 40). Elle utilise des enzymes de restriction qui reconnaissent des sites de coupure sur l'ADN bactérien. On obtient alors un nombre restreint de fragments d'ADN de grande taille. L'électrophorèse conventionnelle sur gel d'agarose ne permet pas une migration efficace des molécules d'ADN de plus de 40 à 50 kbp. Ainsi, en changeant la durée et la direction du champ électrique, la PFGE permet de séparer les molécules d'ADN dont la taille dépasse 1000 kbp. On atteint alors le pouvoir discriminant le plus élevé pour le typage des souches de *P. aeruginosa*, par rapport à la plupart des méthodes moléculaires comme la RAPD, le ribotypage et la RFLP avec *exoA*. L'automatisation de la méthode PFGE rend possible la standardisation. Cependant, sa complexité technique et son coût élevé ne permet son utilisation que dans des laboratoires spécialisés (184).

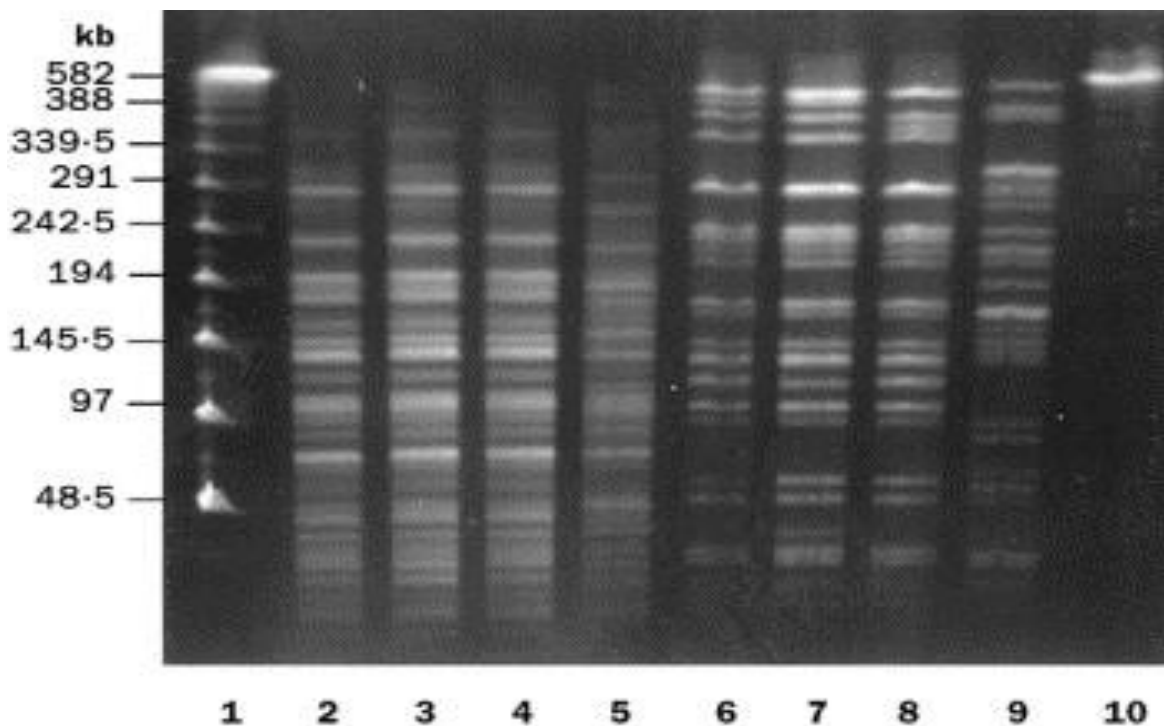


Figure 40 : PFGE réalisée avec les enzymes *SpeI* et *XbaI* pour l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* (187)

La technique RAPD (random-amplified polymorphic DNA)

C'est une technique d'amplification aléatoire du polymorphisme de l'ADN. Il s'agit d'une réaction PCR dans laquelle les segments d'ADN amplifiés sont aléatoires. Les amorces utilisées s'hybrident de façon imprédictible à la séquence spécifique. La connaissance préalable de l'ADN cible n'est pas nécessaire. La réalisation d'une électrophorèse des fragments amplifiés permet d'obtenir un profil particulier, reflet de l'ADN de départ. La RAPD est largement utilisée pour l'analyse génomique des souches de *P. aeruginosa* isolées des patients MV (184).

La technique RAPD est rapide et facile à mettre en œuvre (5) car l'ADN matrice n'a pas besoin d'être hautement purifié, ou d'être de poids moléculaire élevé. De plus, seulement quelques nanogrammes d'ADN suffisent pour l'analyse (184). Toutefois, elle est peu reproductible (5) car plusieurs paramètres peuvent changer les profils RAPD-PCR, comme la qualité de l'ADN et le choix de l'amorce. Il est donc nécessaire de les optimiser étroitement, afin d'améliorer cette reproductibilité (184). La comparaison inter-laboratoires est rendue difficile du fait de résultats sous forme de profils de bandes (5)

Le ribotypage

Les souches de *P. aeruginosa* isolées de patients MV adoptent un phénotype particulier rendant difficile l'identification par les techniques habituelles (culture et caractères biochimiques). Le ribotypage permet de surmonter ce problème. C'est une analyse Southern Blot basée sur l'hybridation des fragments d'ADN avec l'opéron ribosomique codant l'ARNr 16S et 23S. Le ribotypage est plus approprié pour différencier les souches bactériennes ayant plusieurs opérons ribosomiaux. *P. aeruginosa* possédant peu d'opérons, la technique revêt une utilité limitée pour les études épidémiologiques visant cette bactérie. De plus, le ribotypage reste une technique complexe, malgré l'automatisation qui facilite son usage dans le typage des isolats contenant un large spectre bactérien (184). Le ribotypage constitue bien une technique reproductible, mais on ne parvient pas à différencier les souches des ribogroupes majoritaires (5).

La technique MLST (multilocus sequence typing)

Les séquences d'ADN obtenues, pour un même gène, chez les différentes souches sont alignées et comparées afin de repérer des mutations (délétions, insertions) qui les différencieraient. La MLST combine le séquençage de plusieurs gènes (généralement sept) dits « de ménage », afin d'analyser l'évolution d'une espèce sur une longue période de temps. La méthode permet de classer les souches en séquences types (ST) (188).

La MLST est une technique simple nécessitant seulement une amplification des fragments d'ADN par PCR, et leur séquençage, manuellement ou avec un séquenceur automatisé. Les résultats de séquençage ainsi obtenu permettent l'alimentation d'une base de données informatique sur internet (184).

La technique Rep-PCR (repetitive element base PCR)

C'est une méthode basée sur la PCR qui utilise le système DiversiLab®. Elle sert à identifier le génotype des procaryotes. Elle est similaire à la RAPD. Toutefois, elle s'en distingue par le fait que les amorces ciblent des séquences connues de l'ADN. Ces séquences sont conservées et répétitives dans le génome bactérien. Deux groupes d'éléments répétitifs sont utilisés pour la comparaison des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients MV, avec une haute reproductibilité et un haut pouvoir discriminant : ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) et BOX. Cette technique est peu onéreuse, rapide et disponible en format automatisé. Le typage Rep-PCR est une technique potentiellement intéressante qui pourrait s'imposer à l'avenir dans la surveillance épidémiologique, l'identification et le suivi des voies de transmission de *P. aeruginosa* chez les patients MV (184).

La technique MLVA (multiple locus VNTR analysis)

La technique MLVA étudie des structures génomiques formées par la répétition en tandem d'une séquence nucléotidique (VNTR=Variable Number of tandem repeat), appelée microsatellite quand la taille du motif élémentaire est de 1 à 8 nucléotides et minisatellite au-delà. La variation du nombre de répétition d'une souche à l'autre, permet ainsi de les différencier. Les variations de taille des VNTRs sont analysées en mesurant la taille de produits d'amplification PCR obtenus avec des amorces situées de part et d'autre des micro-

ou minisatellites polymorphes. Cette technique est actuellement considérée comme la plus performante. Elle permet l'obtention d'une « empreinte génétique » d'un clone bactérien. La constitution d'une base de données de répétitions en tandem permet la comparaison des résultats obtenus entre laboratoires (5). La MLVA est une méthode simple, relativement rapide, standardisée et discriminante. Elle présente une excellente reproductibilité intra- et inter-laboratoires (189).

D'autres approches plus récentes et plus sophistiquées ont été développées pour l'identification des bactéries (165). Parmi elles, nous pouvons citer l'analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal couplée à la chromatographie liquide haute performance (RISA-HPLC). Cette technique permet la caractérisation des différentes espèces bactériennes présentes dans une communauté. Chaque souche bactérienne est identifiée par un pic (Figure 41). L'émergence d'un nouveau pic est liée à une invasion de bactérie due à une nouvelle souche d'une même espèce ou à une nouvelle espèce. Cette technique permet également d'évaluer l'efficacité des traitements antibiotiques instaurés. En outre, elle est efficace, reproductible et facile à manipuler (190).

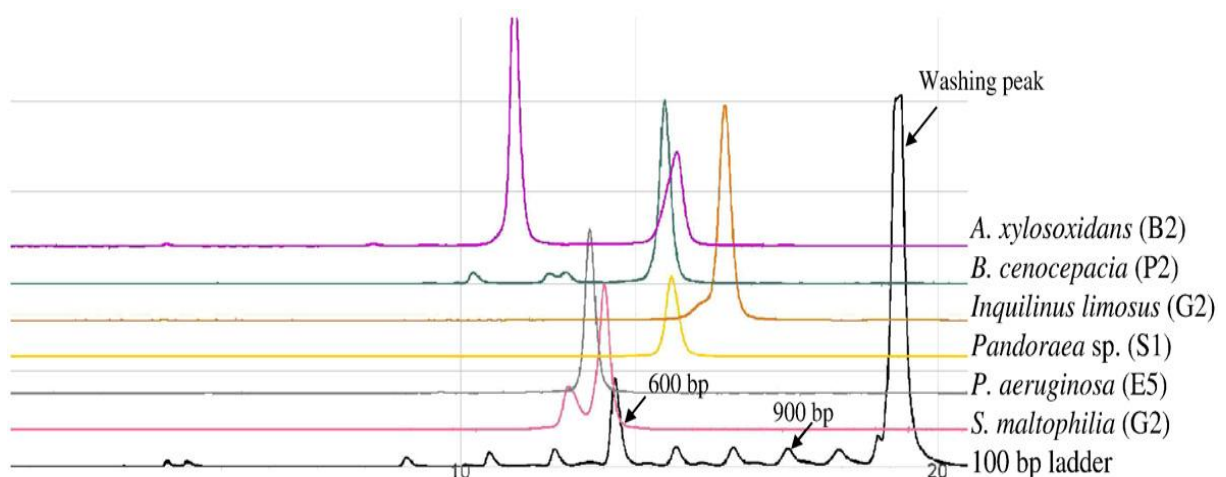


Figure 41 : Profil RISA-HPLC de différentes espèces bactériennes isolées d'un patient atteint de mucoviscidose (190)

Partie III

Physiopathologie de *Pseudomonas* *aeruginosa* dans la mucoviscidose

Au cours de la mucoviscidose, les infections broncho-pulmonaires sont les affections les plus délétères (6). *P. aeruginosa* n'est pas la seule bactérie retrouvée au niveau des poumons de patients MV. Lors des premières années de vie, les infections pulmonaires sont principalement causées par *S. aureus* et *H. influenzae*. La colonisation des poumons par *P. aeruginosa* survient plus tardivement, au moment de l'adolescence (Figure 42) (5, 191). De plus, les flores des patients MV contiennent d'autres bactéries commensales ou dont le rôle pathogène est encore mal défini (*Inquilinus spp*, *Pandoraea*, *Cupriavidus*, *Ralstonia spp*), ainsi que différents microorganismes non bactériens comme les levures, les moisissures ou encore les virus. En outre, avec l'allongement de la durée de vie des patients, de nouvelles espèces bactériennes telles que *Stenotrophomonas maltophilia*, le complexe *Burkholderia cepacia* et *Achromobacter xylosoxidans*, méconnues auparavant semblent émerger (6). Leur mise en évidence est possible grâce à l'amélioration des méthodes d'identification, notamment par biologie moléculaire et protéomique.

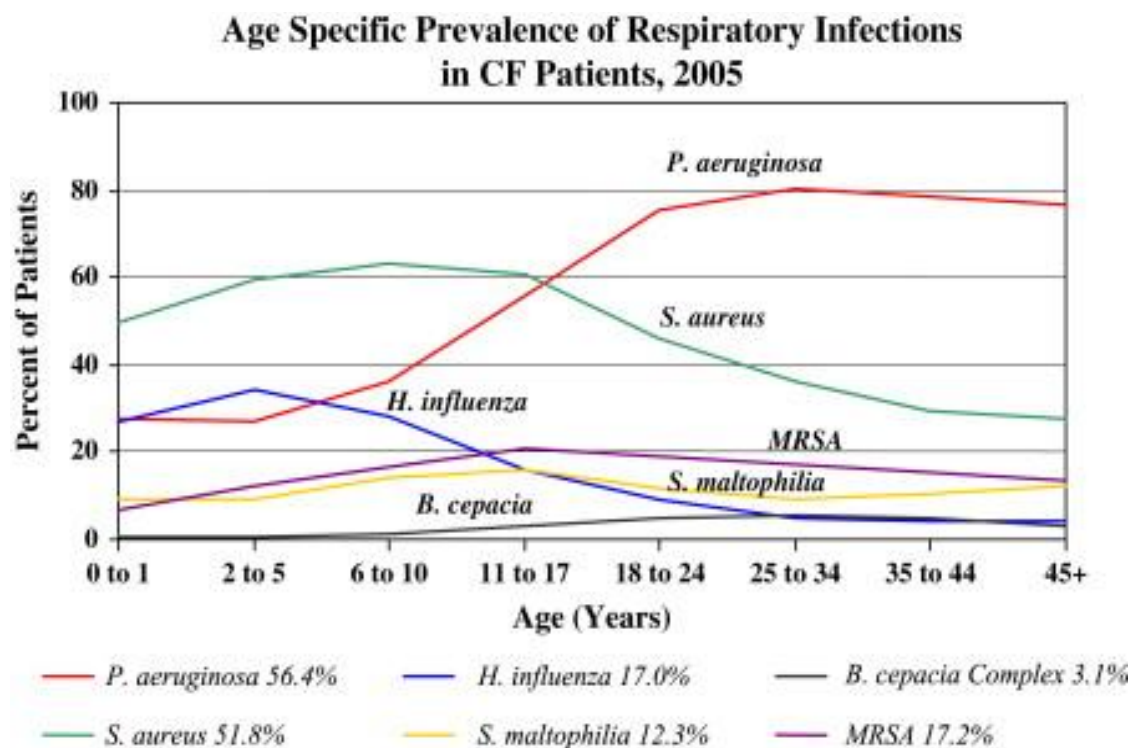


Figure 42 : Evolution des infections bactériennes selon l'âge des patients atteints de mucoviscidose (192)

Malgré cette grande diversité de flore, l'implantation de *P. aeruginosa* au niveau des poumons marque un tournant évolutif majeur de la maladie (6). L'acquisition de *P. aeruginosa* est associée à un déclin progressif de la fonction pulmonaire (193, 194). En effet, on observe une diminution du rapport VEMS/CVF après l'acquisition de la bactérie. (193)

1 Les différentes étapes de la colonisation du tractus respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa*

1.1 La primocolonisation

La primocolonisation correspond au premier isolement de la bactérie dans un prélèvement. Durant cette phase, *P. aeruginosa* est présent dans l'arbre bronchique sans signe direct (manifestations cliniques) ou indirect (anticorps sériques spécifiques) (37). Elle survient le plus souvent entre 8 et 10 ans. Cependant, elle peut apparaître dès les premiers mois de vie. La mise en évidence de la bactérie reste possible au moment du diagnostic de la mucoviscidose (195). Les souches incriminées dans la primocolonisation sont généralement de phénotype non mucoïde et sensibles aux antibiotiques (196).

Il est important d'identifier la primocolonisation car c'est l'étape pendant laquelle on peut espérer une éradication de la bactérie, permettant de retarder ou à défaut de prévenir le passage à l'infection chronique. La mise en place rapide d'une antibiothérapie agressive pendant cette étape est primordiale (197).

On parle d'infection bronchopulmonaire lorsque la primocolonisation est associée à des signes directs ou indirects d'infection (37).

1.2 La colonisation intermittente

La colonisation intermittente est la période pendant laquelle l'isolement de la bactérie est inconstant, les cultures seront tantôt négatives, tantôt positives (Figure 43) (198). Cette étape est caractérisée par l'isolement de plusieurs souches différentes (37).

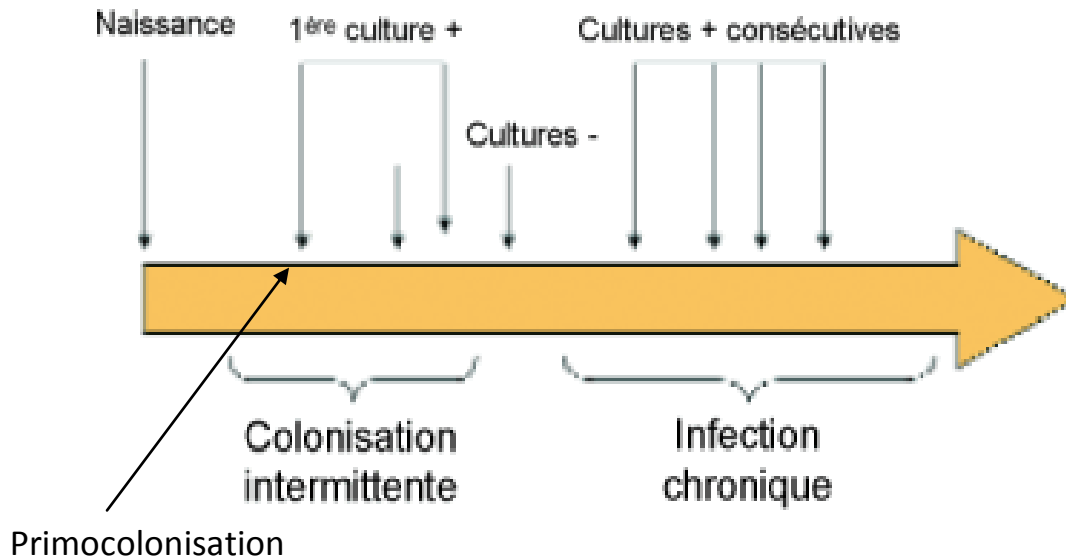


Figure 43 : Evolution naturelle de l'atteinte à *Pseudomonas aeruginosa* (198)

1.3 La colonisation chronique

Quatre-vingts pour cent des patients MV sont infectés de façon chronique par *P. aeruginosa* (130). Cette étape est caractérisée par la présence de la bactérie dans l'arbre bronchique pendant au moins 6 mois, vérifiée par un minimum de 3 cultures positives à au moins 1 mois d'intervalle, sans signes cliniques et avec une sérologie négative, c'est-à-dire pas plus de deux arcs de précipitation (37). La colonisation chronique par *P. aeruginosa* est de mauvais pronostic et est associée à un déclin du statut clinique du patient. Une fois la colonisation chronique établie, il est impossible d'éradiquer la bactérie avec les antibiotiques usuels (130).

On parle d'infection bronchopulmonaire chronique lorsque la colonisation chronique s'associe à des signes directs ou indirects d'infection. (37).

2 Epidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose

P. aeruginosa est l'espèce bactérienne la plus fréquemment rencontrée au cours des infections bronchiques chez les patients mucoviscidosiques.

2.1 Données épidémiologiques

2.1.1 Aux Etats-Unis

Une étude américaine de 2008 rapporte, après culture des crachats, que 52,5 % des malades sont porteurs de la bactérie. La prévalence de l'infection varie significativement avec l'âge : elle est de 25 % chez les enfants de moins de 5 ans et de 80 % chez les adultes de 25 à 34 ans. (199). La prévalence globale semble diminuer, mais cette constatation est à confirmer. En effet, une étude réalisée entre 1985 et 2005 ne montre pas de diminution significative de prévalence chez les adultes (200), alors qu'une autre étude américaine de 2009 indique que 60,4 % des patients étaient colonisés en 1995 contre 56,1 % en 2005. Durant les 10 années de l'étude, l'incidence générale n'a pas varié mais elle a augmenté chez les enfants de moins d'un an et les enfants de 2 à 5 ans (201).

Le dernier rapport annuel de la fondation américaine sur la mucoviscidose, publié en 2010, montre quant à lui une diminution de 7,6 % de la prévalence de l'infection à *P. aeruginosa*, entre 2000 et 2010 (202).

2.1.2 En France

En 2011, 42,6 % des patients MV, tous âges confondus, étaient infectés par *P. aeruginosa*. Parmi ces patients, 22,6 % étaient infectés de façon chronique et 8,8 % par des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes. La colonisation multi-résistante se définit par la présence de souches résistantes à tous les antibiotiques, dans au moins deux classes d'antibiotiques. Chez les patients colonisés chroniquement, on observe plus de 50 % des

prélèvements positifs lors des 12 derniers mois (avec au moins quatre prélèvements pendant cette période) et/ou une augmentation significative des anticorps anti-*P. aeruginosa* (10).

Le pourcentage de patients MV infectés par *P. aeruginosa* a diminué de 1,9 % entre 2001 et 2011. Cette diminution semble profiter à l'émergence de nouvelles espèces bactériennes, ainsi qu'à une espèce fongique : *Aspergillus*. Parmi les espèces bactériennes, nous pouvons citer *A. xylooxidans*, *S. maltophilia* et les mycobactéries atypiques. (Figure 44) (10).

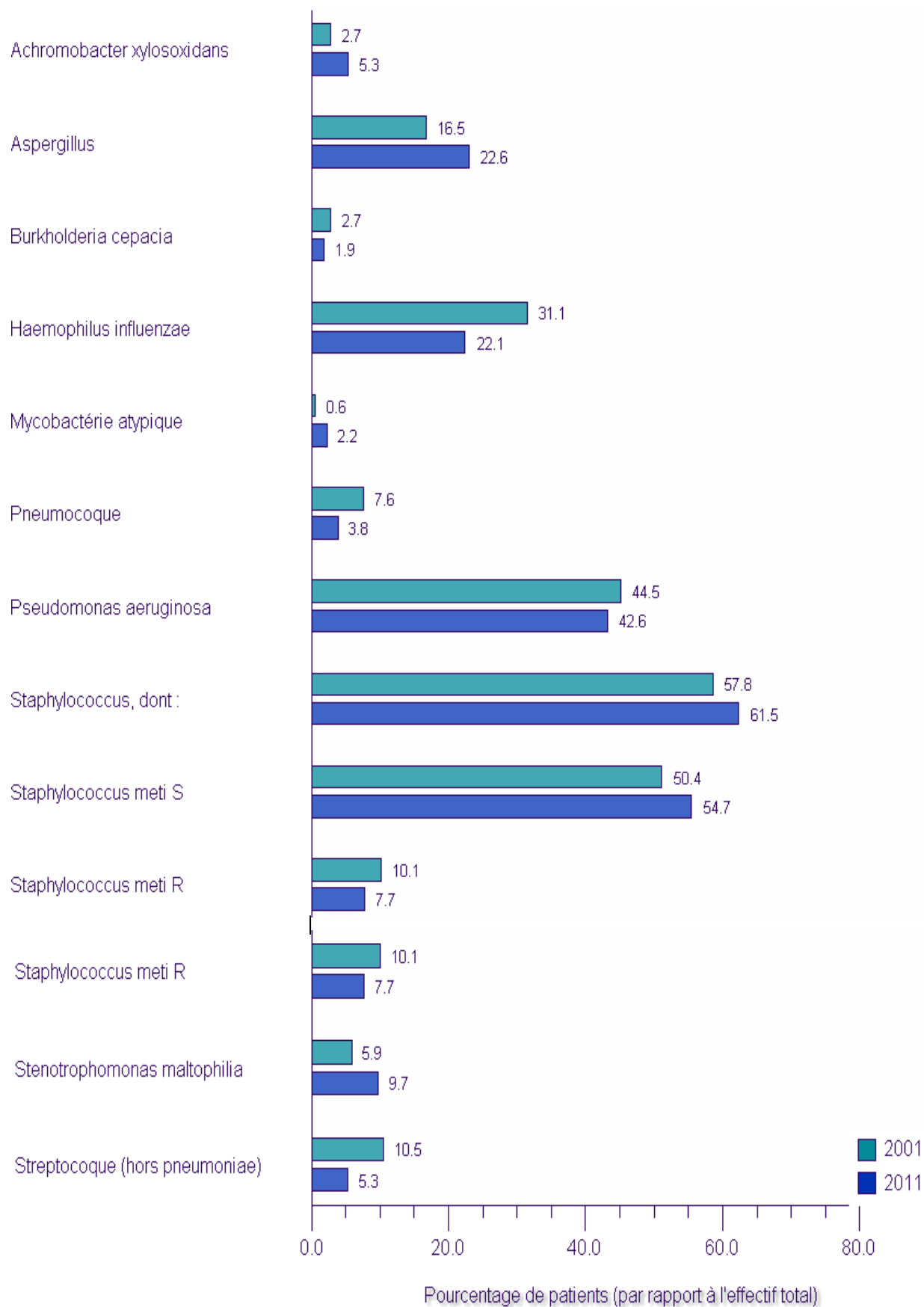


Figure 44 : Répartition des différents germes isolés de patients atteints de mucoviscidose en 2001 et en 2011 (10)

P. aeruginosa est l'agent pathogène le plus préoccupant et pose de nombreux problèmes aux équipes médicales. La médiane de survie des sujets non colonisés par *P. aeruginosa* est de 51 ans, tandis qu'elle diminue considérablement pour les sujets colonisés, puisqu'elle est de 29 ans (6).

2.2 La clonalité

La population de *P. aeruginosa* se caractérise par quelques clones dominants présents aussi bien dans l'environnement que chez les malades (105). Des études menées en Europe montrent que les 16 clones les plus dominants représentent 50 % de la population de *P. aeruginosa* chez les enfants d'une même fratrie. Les clones PA14 et C étant les plus répandus à travers le monde, ainsi qu'au sein des sujets atteints. Parmi les différentes souches de *P. aeruginosa*, certains clones ne sont pas capables de coloniser les poumons de patients MV (203).

P. aeruginosa est très répandu dans l'environnement, ce qui constitue la principale source d'infection. L'atteinte des patients MV par *P. aeruginosa* représente le modèle type d'une bactérie environnementale capable de conquérir, de s'adapter et de persister dans un milieu atypique, ainsi que d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et aux traitements antibiotiques (203).

Le clone de *P. aeruginosa* acquis initialement persiste plusieurs années dans les voies respiratoires et modifie son génome par des mutations, pour s'adapter à ce nouvel environnement. Chez la majorité des patients MV, le clone est retrouvé après 20 ans de colonisation des voies respiratoires. L'infection par deux clones ou plus, quand elle a lieu, s'observe préférentiellement pendant les trois premières années de colonisation. Il est rare de constater le remplacement d'une souche par une autre. Les voies respiratoires hautes et basses sont colonisées par le même clone. Ceci suggère que la bactérie colonise initialement les sinus puis atteint les voies basses, lorsque la barrière oropharyngée est endommagée lors d'une infection aiguë. Les sinus représentent donc le réservoir et la porte d'entrée pour la colonisation des voies respiratoires basses. La plupart des patients portent un seul clone (203).

2.3 Les voies de transmission et la prévention des infections

Les patients peuvent s'infecter lors de contacts avec des sécrétions respiratoires ou avec d'autres patients infectés. Les enfants d'une même fratrie atteints de mucoviscidose sont colonisés par des souches identiques ou étroitement liées. Les infections croisées sont donc fréquente en cas de contact intime et prolongé. Le risque pour un patient, non encore colonisé, d'acquérir *P. aeruginosa* pendant sa prise en charge médicale est de 1 % si les mesures d'hygiène ne sont pas respectées (203). Les patients MV peuvent être colonisés par *P. aeruginosa* après un passage à l'hôpital (130). L'infection de produisant par l'intermédiaire de l'environnement ou au contact de patients déjà infectés. Des études démontrent qu'une colonisation des patients est possible lors de séjours dans des camps d'été regroupant de patients MV (203).

Une transmission nosocomiale de *P. aeruginosa* fut observée à Hanovre en 1980. Le clone TB a causé initialement des infections chez les brûlés, un an plus tard, il s'est étendu au sein de l'unité de soin intensif et encore un an plus tard, une vague d'épidémie a été observé chez les patients MV de l'hôpital. On a mis en évidence dans la ville de Liverpool, la présence d'un clone de *P. aeruginosa* nommé LES (Liverpool epidemic strain). Dans les centres de prise en charge de la mucoviscidose de Liverpool et de Manchester, des infections croisées avec ce clone se sont produites entre des patients en l'absence de tout contact. Ce clone particulier identifié initialement dans la population pédiatrique, infecte à présent les adultes et remplace éventuellement leur souche initiale. Le clone LES est le plus abondant au sein de la population atteinte de mucoviscidose en Angleterre et aux Pays de Galles (203).

La séparation, à la fois dans le temps et dans l'espace, des patients colonisés par *P. aeruginosa*, de ceux qui ne le sont pas encore, permet de réduire la prévalence de la bactérie (203), de prévenir les infections croisées (204) et de contrôler l'expansion d'un même clone (205). Cette séparation doit également se faire en fonction du génotype de *P. aeruginosa* pour réduire l'acquisition d'un même clone (205). Les contacts intimes et prolongés entre les patients colonisés par *P. aeruginosa* doivent être évités pour prévenir l'infection par des souches hautement transmissibles (203). Pour éviter la dissémination d'un clone au sein d'un service de soins, il est indispensable de respecter des règles d'hygiène telles que le lavage des mains (204).

3 Les facteurs liés à l'hôte

La glutathion S-transférase (GST) est une enzyme ubiquitaire multifonctionnelle qui joue un rôle clé dans la détoxification cellulaire. Elle protège les cellules contre le stress oxydatif. Pour cela, elle catalyse la réduction du glutathion (GSH) en le conjuguant aux agents xénobiotiques toxiques et carcinogènes. Le GSH est transporté à travers les canaux CFTR des cellules épithéliales pour atteindre le surfactant pulmonaire, où sa concentration est 50 fois plus élevée que dans le plasma. Le dysfonctionnement des canaux CFTR perturbe l'efflux de GSH et entraîne donc un déficit en GSH au niveau pulmonaire, ce qui compromet son action antioxydante et antibactérienne (206).

L'activité de la GST est plus faible chez les patients ayant un statut clinique affecté et l'infection par *P. aeruginosa* augmente avec la sévérité du tableau clinique. De plus, chez les patients infectés, l'activité de la GST diminue. Il existe, chez l'hôte, différents génotypes de la GST dont les deux principaux ont été identifiés : GSTP1 et GSTM1. Ils sont associés à un risque élevé de maladie pulmonaire sévère. Le génotype GSTP1 est corrélé à une diminution de l'activité de la GST et à une infection précoce par *P. aeruginosa*. Le génotype GSTM1 est associé à une réduction de la capacité de la GST à contrer le stress oxydatif. Le génotype de la GST est par conséquent un marqueur potentiel d'un dysfonctionnement pulmonaire. Il peut être considéré comme un facteur prédictif de l'occurrence des infections et de la sévérité de l'atteinte pulmonaire (206).

4 Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* hypermutables

Les microorganismes causant des infections chroniques, tels que *P. aeruginosa*, ont besoin de s'adapter en permanence à la pression de sélection qu'ils rencontrent (207). On assiste au développement de mutants qui diffèrent génotypiquement et phénotypiquement des souches originelles (Figure 45) (208). La prévalence de ces mutants augmente avec la durée de l'infection chronique du fait de leur sélection au sein des poumons de patients MV (209).

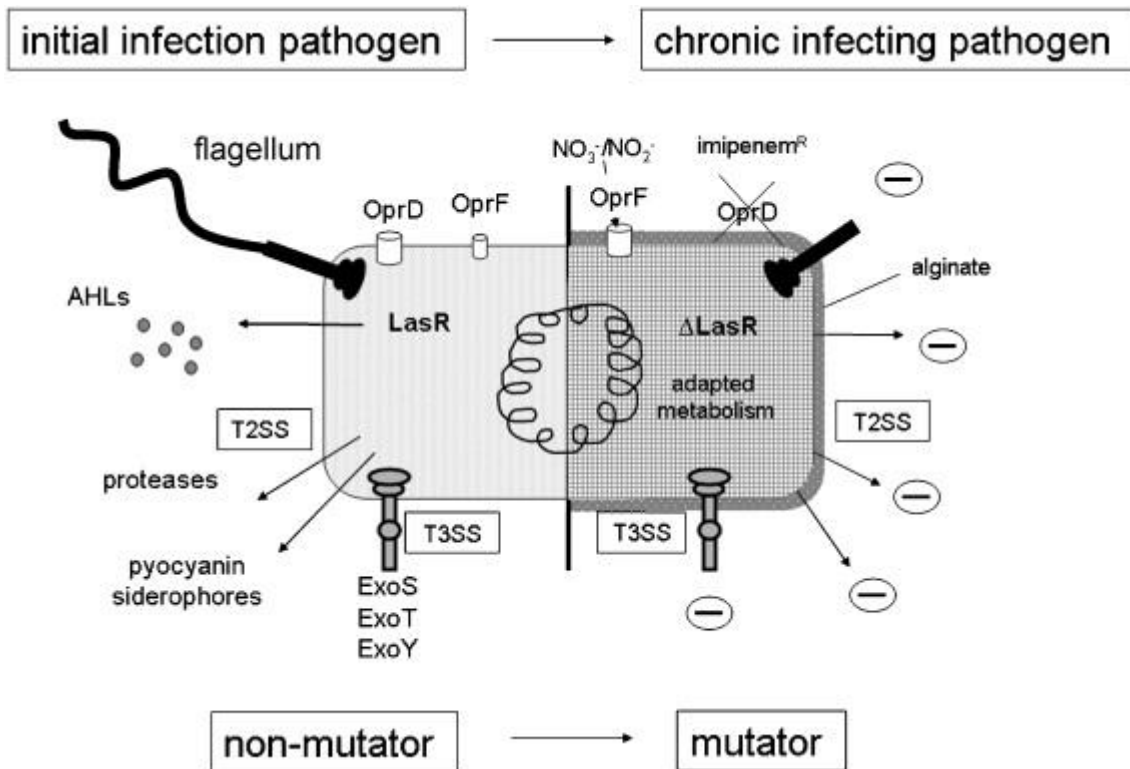


Figure 45 : Cibles potentielles de mutations (210)

4.1 Les mutations spontanées

Les souches de *P. aeruginosa* hypermutables possèdent une adaptation génétique intense (211). Elles ont un taux de mutations spontanées élevé. Ceci est lié à une déficience dans le système de réparation de l'ADN ou dans celui d'évitement des erreurs. Parmi ces systèmes, celui de réparation des mésappariements joue un rôle important. En effet, son altération est la cause la plus fréquente d'hypermutations dans les populations bactériennes. Ce système détecte et répare les erreurs de réplication, dont toutes sortes de mésappariements, de courtes insertions ou délétions. Les gènes clés de ce système sont *mutS*, *mutL*, *mutH* et *uvrD* ou *mutU*. L'inactivation de l'un de ces gènes fait passer le taux de mutation de 100 à 1000. Environ 60 à 90 % des souches isolées de patients MV sont déficientes dans le système de réparation des mésappariements, avec principalement des mutations de *mutS* et de *mutL* et

minoritairement des mutations de *uvrD* (*mutU*). Le passage à un phénotype mutant confère un avantage pour l'adaptation de la bactérie lorsqu'elle se trouve dans un nouvel environnement ou dans des conditions de stress. Les souches hypermutables ont une prévalence élevée et jouent un rôle important lors de l'infection chronique par *P. aeruginosa* chez les patients MV. En revanche, la prévalence des souches est faible dans le cadre des infections aiguës. Chez les patients MV, une étude de Ciofu *et al.* (2005) montre que la proportion de souches hypermutables est nulle lors de la primocolonisation, alors qu'elle est de 65 % après 20 ans de colonisation chronique. *A contrario*, d'autres équipes ont trouvé une prévalence de 5 à 10 % de souches hypermutables isolées lors de la primocolonisation. Cela peut s'expliquer par leur prévalence basale dans l'environnement, à partir duquel les patients s'infectent. Durant l'établissement de l'infection respiratoire chronique, *P. aeruginosa* possède une adaptation génétique intense. Pour apprécier ce mécanisme, l'équipe de Smith a réalisé le séquençage du génome de *P. aeruginosa* sur des échantillons récoltés chez des patients âgés de 6 mois, puis chez des patients âgés de 8 ans. Ceci a permis d'estimer à 68 le nombre de mutations acquises par *P. aeruginosa* durant l'établissement de l'infection chronique. Il s'agit principalement de mutations non-sens entraînant une perte de fonction du gène touché. La prévalence de ces souches est de 30 à 60 % lors d'infection chronique contre moins de 1 % lors d'infection aiguë (212). Une souche non hypermutable acquiert une moyenne de 0,25 mutation par an, contre 3 pour les souches hypermutables (211). Ces souches hypermutables ont un impact sur le statut clinique du patient. Ainsi, les patients MV porteurs de souches hypermutables ont une fonction respiratoire plus faible avec un VEMS et un rapport VEMS/CVF abaissés. La prévalence de souches hypermutables et la détérioration de la fonction pulmonaire augmentent progressivement avec la durée de l'infection respiratoire chronique. Ainsi, il est difficile de savoir si ces souches sont une cause ou une conséquence du déclin de la fonction respiratoire (212).

4.2 Mutation de *lasR*

Une mutation adaptative de *P. aeruginosa* est rencontrée chez les patients MV. Cette mutation a été identifiée en Amérique du nord, en Europe et en Australie. L'âge moyen du patient est de 9,2 ans, lorsque l'on découvre une souche mutée pour *lasR*, alors qu'il est de 11 ans, lors de la mise en évidence de souches mucoïdes (207). Cette mutation consiste en une inactivation du gène *lasR* qui code, comme vu précédemment, un régulateur transcriptionnel LasR. Ce dernier répond aux signaux des AHL du « quorum sensing » pour activer l'expression de facteurs de virulence, tels que l'élastase. Cette mutation entraîne donc une diminution de la virulence de *P. aeruginosa*. LasR régulant également l'expression de gènes impliqués dans les fonctions métaboliques, l'inactivation de *lasR* modifie les sources de carbone utilisées par *P. aeruginosa* pour sa croissance. En effet, les sécrétions bronchiques des patients MV étant riches en acides aminés, *P. aeruginosa* va cataboliser préférentiellement les acides aminés pour obtenir du carbone. Parmi les acides aminés, *P. aeruginosa* utilise essentiellement la phénylalanine qui va ainsi procurer un avantage dans la croissance de la bactérie (213).

De plus, les mutants *lasR* possèdent une forte activité β -lactamase. On observe notamment une diminution de l'activité de la ceftazidime sur ces mutants *lasR* (213). Cette mutation entraîne des changements phénotypiques. Les colonies mutées ont un aspect particulier : elles sont aplaties du fait de l'autolyse et leur surface est irisée avec des reflets métalliques, ce qui permet de les identifier facilement (207).

Les mutants *lasR* sont impliqués dans la progression de l'atteinte respiratoire car ils provoquent une diminution de la CVF. Ils peuvent être utilisés comme un marqueur précoce de mauvais pronostic. De nombreuses souches porteuses de la mutation *lasR* peuvent être retrouvées dans un même échantillon, suggérant une forte pression de sélection chez les patients MV. L'hypothèse d'une émergence des mutants *lasR*, du fait d'une exposition antérieure aux antibiotiques, reste à prouver par des études complémentaires (207).

4.3 La résistance aux antibiotiques

Les souches hypermutables développent des résistances aux antibiotiques. *P. aeruginosa* acquiert des résistances par des mutations sur des gènes cibles. Parmi les mécanismes de résistance, on peut citer la répression ou l'inactivation de la porine OprD, l'hyperproduction d'une céphalosporinase AmpC ou l'augmentation de l'expression de pompes à efflux. Les souches résistantes aux antibiotiques sont plus fréquemment isolées de patients MV du fait de traitements répétés. Une étude de Ferroni *et al.* (2009) a montré que les souches hypermutables acquièrent plus rapidement des mécanismes de résistance aux antibiotiques que les souches non hypermutables. Ainsi, 80 % des souches hypermutables sont résistantes à la ceftazidime contre 30 % pour les souches non hypermutables. De même, le pourcentage de résistance aux fluoroquinolones passe de 5 % pour les souches non hypermutables à 40 % pour les souches hypermutables (212).

La proportion de souches multi-résistantes, c'est-à-dire résistantes aux β -lactamines, aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones, est plus élevée chez les bactéries mutantes que chez les bactéries non mutantes. L'équipe de Oliver *et al.* a montré, *in vitro*, que l'inactivation de *mutS* augmente la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMB (concentration minimal bactéricide) des antibiotiques (214). Les souches hypermutables ne semblent pas développer de résistances à la colistine. Ceci peut être dû au fait que cet antibiotique est utilisé en dernier recours, pour le traitement des infections par des bactéries multi-résistantes. Cependant une étude de Johansen *et al.* (2008) a mis en évidence la diffusion d'une souche résistante à la colistine chez des patients MV, appelant ainsi à la prudence avec l'utilisation de cet antibiotique (212).

4.4 Les variants à petites colonies rugueuses

Un type particulier de colonies a été isolé de patients MV. Il s'agit des variants à petites colonies rugueuses (RSCVs). Elles ont une grande capacité à former un biofilm. Les RSCVs ont un niveau élevé en GMP dicyclique intracellulaire. Ce dernier joue un rôle dans la formation du biofilm car il intervient dans la synthèse d'un exopolysaccharide. Lorsque la concentration en GMP dicyclique augmente, le cluster *psl* est alors surexprimé : les souches

deviennent autoaggrégantes et hyperadhérentes (215). En effet, le cluster *psl*, lorsqu'il est activé, permet la production d'un polysaccharide extracellulaire proche de l'alginate (123). Les RSCVs, tout comme les souches mucoïdes, produisent beaucoup d'exopolysaccharide entraînant ainsi une tolérance aux antibiotiques, une altération du métabolisme et une réduction de l'immunogénicité. Tous ces phénomènes favorisent la persistance de la bactérie au sein de biofilm, dans les poumons des patients MV (Figure 46) (215).

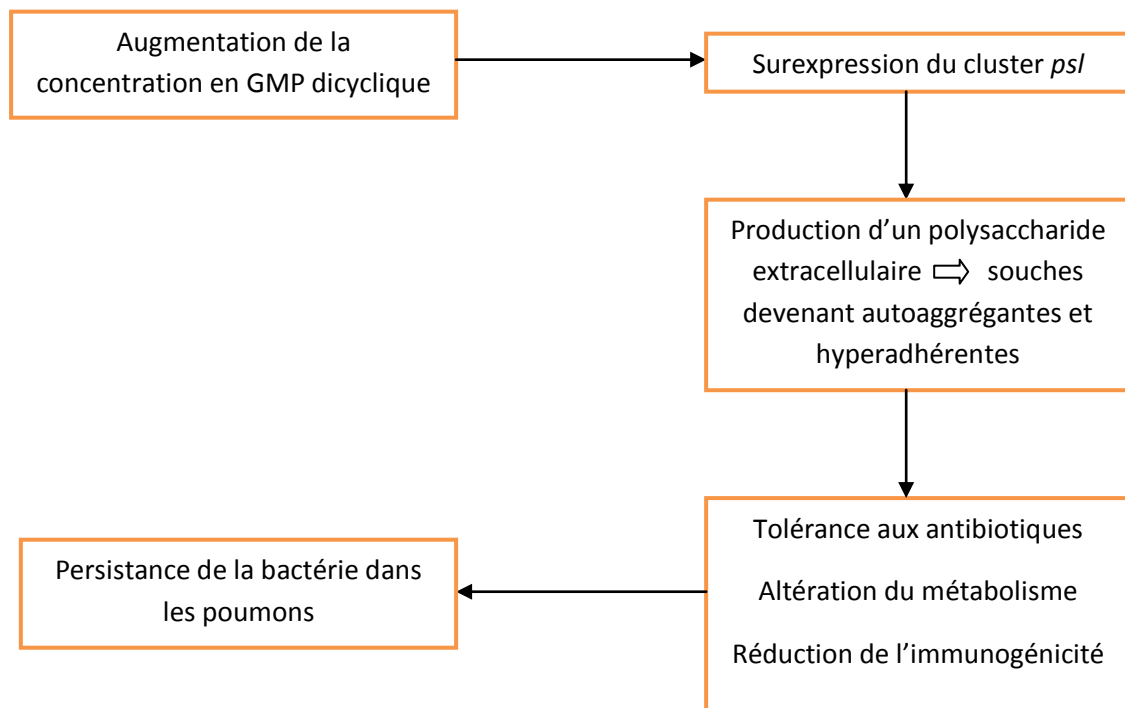


Figure 46 : Etapes de la formation d'un biofilm par les RSCVs

4.5 Modifications du flagelle et des pili

On observe chez les patients infectés chroniquement par *P. aeruginosa*, des souches non piliées et ayant perdu leur flagelle (216). Ceci entraîne respectivement une absence des déplacements « twitching motility » et « swimming motility ». L'apparition de souches non piliées est due à deux mécanismes : *i*) une perturbation de *pilB*, codant une ATPase nécessaire

pour l'extension et la rétraction des pili et *ii*) à un défaut du gène *pilQ*, nécessaire au passage des pili à travers la membrane bactérienne (210). Dans le cas de souches de *P. aeruginosa* dépourvues de flagelle, l'efficacité de la phagocytose par les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles est diminuée. En effet, la perte de l'expression du flagelle, due à l'inactivation du gène *pilA* codant une protéine constitutive du flagelle, permet d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire et à la phagocytose (213).

Le gène *rpoN* est requis pour l'assemblage du flagelle et des pili. Ainsi, une mutation de ce gène entraîne la perte de l'expression de ces deux éléments (210).

4.6 Modifications du lipopolysaccharide (LPS)

Un autre type particulier de colonies rugueuses est isolé de patients MV chroniquement infectés par *P. aeruginosa*. Ce phénotype particulier est dû à une modification du lipide A du LPS. L'analyse des colonies met en évidence des chaînes polysaccharidiques O peu nombreuses, courtes ou même absentes, les souches devenant alors non sérotypables (210).

Ces souches particulières entraînent une activité pro-inflammatoire élevée et une augmentation de la synthèse d'IL-8. Ces réactions sont dues à une reconnaissance différentielle de la structure altérée du LPS par les récepteurs TLR4 (210).

De même, ces colonies particulières possèdent une spécificité au niveau de l'acétylation du LPS. Ainsi, les souches de *P. aeruginosa* présentes dans l'environnement possèdent un LPS penta-acétylé, tandis que les souches isolées de patients MV synthétisent un LPS hexa-acétylé, dû à l'ajout de résidus palmitate et aminoarabinose. Ces souches sont souvent associées à une augmentation de la résistance aux antibiotiques. L'avantage sélectif de ces souches pour provoquer une réponse immunitaire amplifiée reste à préciser (210).

4.7 Adaptation métabolique

Une flexibilité au niveau métabolique permet à *P. aeruginosa* de proliférer dans divers habitats (Figure 47). De nombreuses études ont ainsi démontrées que les modifications métaboliques sont une principale cible d'adaptation pour permettre la persistance de la bactérie au sein des poumons. Ainsi, durant la colonisation et l'infection des poumons de patients MV, *P. aeruginosa* entre en compétition avec les microorganismes commensaux et les cellules de l'hôte pour l'acquisition de substances nutritives. Ces dernières permettant d'assurer la croissance d'une densité élevée de bactéries et la production d'énergie. L'environnement spécifique et diversifié des poumons des patients MV sert de matrice biologique pour déclencher ces adaptations métaboliques. Ainsi, *P. aeruginosa* utilise des composants présents dans les sécrétions pulmonaires tels que les mucines, l'actine, l'ADN, les lipides, les acides aminés, les protéines provenant de la dégradation du surfactant pulmonaire, ou encore les polynucléaires neutrophiles, les cellules épithéliales et les bactéries. Les souches de *P. aeruginosa* isolées de patients MV infectés chroniquement sont souvent auxotrophes pour divers acides aminés. L'auxotrophie se définissant par l'incapacité d'un organisme vivant à synthétiser un composé organique nécessaire à son développement. Les souches auxotrophes pour la méthionine sont les plus fréquentes. *P. aeruginosa* se sert alors des composants contenus dans les sécrétions pulmonaires, préalablement cités, pour obtenir les acides aminés utiles à sa croissance (210). La survenue d'une exacerbation des symptômes chroniques est associée à une augmentation de la population des souches auxotrophes (216).

L'étude des sécrétions bronchiques des patients MV a permis de conclure que *P. aeruginosa* catabolise préférentiellement la L-alanine, la L-arginine et le L-glutamate, au lieu de l'acide lactique et du glucose, pour obtenir une source de carbone. Les acides aminés représentent donc une importante source de carbone pour *P. aeruginosa* et ont une influence sur la virulence de la bactérie (210).

Un autre phénotype particulier de *P. aeruginosa* a été mis en évidence. Il s'agit de souches ayant une production augmentée du *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). Cette surproduction de PQS, qui est médiée par des substances nutritives telles que des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane, est responsable de l'autolyse de *P. aeruginosa* (210).

On a mis en évidence, chez les patients MV, des mutants ayant une dérégulation de l'expression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). L'activité de cette enzyme est ainsi augmentée permettant une production optimale d'alginate protégeant ainsi la bactérie (210).

La caractérisation de souches ayant une augmentation de la production d'isocitrate lyase (ICL) est possible sur les prélèvements bronchiques de patients MV. Cette enzyme, codée par le gène *aceA*, permet l'utilisation du shunt des glyoxylate comme seule source de carbone pour la synthèse des acides gras et de l'acétate. L'isocitrate lyase intervient également dans la synthèse optimale d'alginate (210).

P. aeruginosa a besoin de s'adapter aux conditions d'anaérobiose lorsque la bactérie est enfouie dans le mucus au sein des poumons. Ainsi, le couple NO_3^-/NO_2^- représente une alternative d'accepteurs d'électrons pour *P. aeruginosa*. La bactérie peut également utiliser l'arginine pour sa fermentation. Cependant, le rendement énergétique des nitrates et de l'arginine est beaucoup plus faible que celui obtenu avec l'oxygène. La protéine membranaire OprF joue un rôle important pour la croissance en milieu anaérobie et pour la viabilité de *P. aeruginosa*. En effet, la protéine OprF se comporte comme une perméase et permet ainsi le passage de NO_3^-/NO_2^- . Cette protéine OprF est indispensable pour assurer la croissance en anaérobiose des bactéries du biofilm. On a mis en évidence, chez les patients MV, des mutants surexprimant cette protéine. La recherche d'anticorps dirigés contre la protéine OprF permet d'affirmer la présence de ces souches particulières chez les patients MV infectés chroniquement. Le métabolisme anaérobie de *P. aeruginosa* est donc hautement régulé par le catabolisme de l'arginine et la réduction des nitrates. Ces mécanismes sont eux-mêmes régulés par des gènes codant une protéine à cuivre bleue (l'azurine), une cytochrome c peroxydase et des enzymes intervenant dans la voie de l'arginine-deiminase. Les gènes codant ces protéines sont surexprimés à un stade avancé de l'infection et constituent un biomarqueur de l'adaptation de *P. aeruginosa* aux conditions d'anaérobiose au sein du biofilm (210).

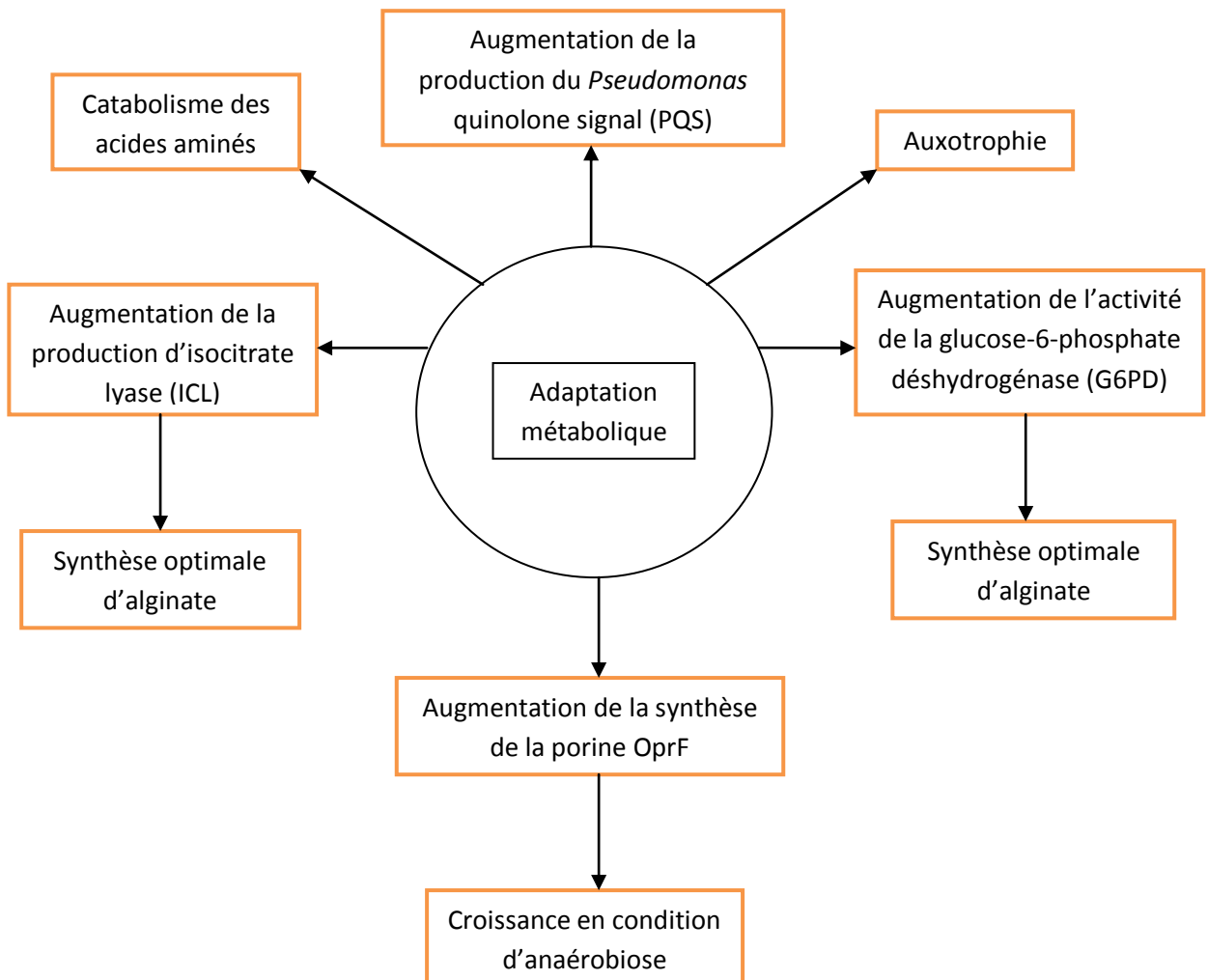


Figure 47 : Différents mécanismes de l'adaptation métabolique chez *P. aeruginosa*

5 La co-infection *Pseudomonas aeruginosa*-*Staphylococcus aureus*

Les microorganismes présents au niveau des poumons des patients MV forment une communauté microbienne complexe (217). Il existe des interactions entre les bactéries, notamment entre *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Plus de 90 % des souches de *S. aureus* isolées lors d'infections humaines produisent un pigment doré. Ce dernier appelé staphyloxanthine, est un des nombreux facteurs de virulence produit par *S. aureus*. Cette substance permet à la bactérie de se protéger, de résister et de survivre en conditions de stress. En plus de son activité antioxydante, la

staphyloxanthine affecte la composition chimique et l'activité fonctionnelle de la membrane cellulaire de *S. aureus*. Ainsi, en réduisant la fluidité de la membrane, elle permet de stabiliser sa structure. Cette modification membranaire augmente la résistance aux peptides antimicrobiens produits par l'hôte pour éradiquer la bactérie. Cependant, il a été mis en évidence un variant phénotypique blanc de *S. aureus* ne produisant aucun pigment. De nombreux autres mécanismes interviennent dont la catalase (enzyme anti-oxydante) qui permet une meilleure survie de la bactérie durant les infections. Pour mieux comprendre les mécanismes de persistance et de survie de *S. aureus* durant les infections, il est nécessaire de connaître les interactions entre cette bactérie et celles présentes en même temps lors de l'infection. Les poumons des patients MV sont très souvent co-infectés par deux espèces bactériennes. *S. aureus* et *P. aeruginosa*. On a été démontré que l'interaction entre *P. aeruginosa* et d'autres bactéries Gram positif, dont *S. aureus*, peuvent augmenter la virulence de *P. aeruginosa*. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour préciser le type d'interaction entre ces deux bactéries et l'importance de cette interaction dans la sévérité et l'issue de l'infection (218).

Lors de la co-infection, *P. aeruginosa* est capable d'induire chez les variants phénotypiques blancs de *S. aureus*, la production du pigment doré. Cela est possible grâce au « quorum sensing » dont les molécules modulent l'expression des gènes de *S. aureus*. La staphyloxanthine, de part ses effets stabilisateurs de membrane, augmente la survie de *S. aureus* face à la polymixine B, antibiotique dont la cible d'action est la membrane bactérienne. La production de staphyloxanthine induite par *P. aeruginosa*, lors de la co-infection, permet une augmentation de la résistance de ces variants phénotypiques blancs de *S. aureus* à cet antibiotique (218).

La catalase est un important facteur de virulence qui protège *S. aureus* contre le peroxyde d'hydrogène. Lors de la co-infection, la synthèse de la catalase par les variants phénotypiques blancs de *S. aureus* est augmentée par la présence de *P. aeruginosa*. L'expression de la catalase peut être coordonnée avec celle de la staphyloxanthine pour permettre une protection maximale contre le peroxyde d'hydrogène. Cette régulation de l'expression des gènes peut être considérée comme une réponse adaptative de *S. aureus* en présence de *P. aeruginosa*. En effet, lors de la co-infection, on observe chez *S. aureus* un métabolisme ralenti, une formation de biofilm favorisée et une résistance accrue aux radicaux libres oxygénés (218).

P. aeruginosa est donc capable d'induire des changements transcriptionnels chez le variant phénotypique blanc de *S. aureus* qui contribuent à augmenter sa virulence et sa survie.

Les flores des patients MV doivent être étudiées dans leur globalité et non à l'échelle de quelques bactéries. De plus, une connaissance plus approfondie des différentes espèces présentes au sein des communautés permettra d'analyser la structure et l'évolution des flores pulmonaires (217). Il est important de prendre en compte le caractère polymicrobien des infections pour adapter la prise en charge thérapeutique et la prévention (218).

Partie IV

Le traitement de
Pseudomonas
aeruginosa chez
les patients atteints
de mucoviscidose

1 Stratégie antibiotique

Les antibiotiques utilisés pour traiter *P. aeruginosa* peuvent être administrés par trois voies différentes : la voie orale, la voie IV et la voie inhalée. On les emploie seuls ou en association.

La stratégie antibiotique dépend de nombreux critères : du stade de l'infection, de l'état clinique du patient et des données bactériologiques (37).

1.1 Traitement de la primocolonisation

Le traitement de la primocolonisation doit être intensif et débuté le plus rapidement possible pour empêcher le passage à l'infection chronique. En l'absence de traitement antibiotique, environ 20 % des patients MV deviennent colonisés « chronique » directement après la première culture positive (219).

La plupart des équipes françaises utilisent le même protocole consistant en une association de deux antibiotiques bactéricides (β -lactamine + aminoside), par voie IV pendant 14 à 21 jours. Cette cure IV d'antibiotiques peut être suivie ou non d'aérosols de colistine pendant 3 à 6 mois. Les β -lactamines sont administrées soit en 3 à 4 injections quotidiennes, soit en perfusion continue. L'utilisation de la ceftazidime en perfusion continue est préférée en raison de bons résultats cliniques et de sa bonne tolérance veineuse. Parmi les aminosides, la tobramycine en dose unique journalière est l'antibiotique le plus utilisé en raison de sa moindre toxicité. Ce premier traitement par voie IV est réalisé à l'hôpital, notamment chez les enfants de moins de 6 ans. Des contrôles rapprochés, à l'aide d'un ECBC réalisé chaque mois, permettent d'apprécier l'efficacité de la cure IV. En cas d'isolement de *P. aeruginosa*, une nouvelle cure IV est effectuée (37).

Les équipes danoises utilisent un protocole en trois étapes, pouvant représenter une alternative :

- Etape 1 : association pendant 21 jours de ciprofloxacine par voie orale (30 mg/kg/j en 2 prises) et d'aérosols de colistine (1 million d'unités 2 fois par jour) ;
- Etape 2 : si *P. aeruginosa* est isolé plus d'une fois en 6 mois, on associe pendant 21 jours, la ciprofloxacine par voie orale à la même dose à des aérosols de colistine (2 millions d'unités 3 fois par jour) ;
- Etape 3 : si *P. aeruginosa* est isolé pour la 3^{ème} fois dans les 6 mois, on associe pendant 3 mois, la ciprofloxacine par voie orale à la même dose à des aérosols de colistine (2 millions d'unités 3 fois par jour) (37).

1.2 Traitement de l'infection chronique

Au stade de l'infection chronique, l'éradication de *P. aeruginosa* n'est plus possible. L'objectif du traitement est alors de diminuer l'inoculum bactérien, d'espacer les exacerbations et de ralentir la dégradation fonctionnelle respiratoire. Le choix parmi les molécules antibiotiques est fonction du dernier antibiogramme et des réponses thérapeutiques antérieures (37).

- Traitement des exacerbations

Le traitement se fait préférentiellement par voie IV. Il est indispensable de mettre en place une bithérapie pour limiter l'émergence de souches résistantes. Ainsi, on associe une β -lactamine à la tobramycine pendant au moins 14 jours (37).

Si l'on est face à des souches multirésistantes, une trithérapie est mise en place en associant à la bithérapie précédente la ciprofloxacine par voie orale, à la posologie de 30 mg/kg/j en 2 prises. L'utilisation de la colistine par voie IV représente également une alternative (37).

- Traitement systématique de l'infection chronique

Le traitement systématique consiste en une cure d'antibiotiques par voie IV tous les 3 mois. Un traitement d'entretien par antibiotiques inhalés est une alternative efficace. Celui-ci comporte l'utilisation de la tobramycine par cure de 28 jours avec un nébuliseur approprié, suivie de 28 jours sans traitement. Ce traitement peut être utilisé dès l'âge de 6 ans à la posologie de 300 mg, 2 fois par jour. L'AMM valide la durée de traitement à 96 semaines (37).

Il est important de surveiller tout signe mineur d'aggravation de l'état respiratoire pour mettre en place une cure IV d'antibiotiques. Les cures systématiques par voie IV tous les 3 mois, restent indispensables chez les patients observant mal leurs traitements inhalés ou chez ceux mieux stabilisés par les cures IV. Les traitements à domicile sont possibles. Ainsi, le développement de diffuseurs portables et de « sets » de perfusion prêts à l'emploi permet une pratique ambulatoire des traitements (37).

L'administration par voie IV des médicaments peut avoir lieu soit à l'hôpital, soit au domicile du patient. Cette dernière possibilité est devenue très répandue au début des années 1980, dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients. Une étude de Termoz *et al.* (2008) indique que les antibiotiques sont plus efficaces en termes d'amélioration des paramètres de la fonction respiratoire, lorsque le traitement est mené en milieu hospitalier comparativement à un traitement à domicile. Ainsi, on observe une amélioration du VEMS, alors que la CVF reste au même niveau. Ceci peut s'expliquer par le fait que le VEMS est un critère plus sensible que la CVF. De plus, la dégradation à long terme de la fonction respiratoire est plus lente chez les patients ayant reçu plus de 60 % de leur traitement antibiotique à l'hôpital. Le statut nutritionnel du patient est également amélioré de façon significative (220).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. A l'hôpital, les patients reçoivent une prise en charge respiratoire optimale et la confection des repas est adaptée à leurs besoins et supervisée par une diététicienne. Tout en étant disponibles au domicile, ces services ne sont pas d'une qualité et d'une fréquence équivalentes à ceux de l'hôpital (220).

2 Perspectives d'avenir

L'utilisation d'antibiotiques reste le pilier du traitement de l'infection à *P. aeruginosa*. Cependant, un usage inadéquat peut amener au développement de souches bactériennes résistantes à un nombre croissant d'antibiotiques. De nouvelles pistes sont à explorer pour garantir un succès thérapeutique (221).

2.1 Développement de nouveaux antibiotiques

La mise au point de nouvelles molécules antibiotiques contre *P. aeruginosa* est indispensable. (222). En effet, la prévalence de la résistance aux antibiotiques ne cesse d'augmenter. Elle s'observe plus particulièrement pour la classe des aminoglycosides, notamment pour l'amikacine et la tobramycine. Ceci s'explique par une exposition toujours plus importante de *P. aeruginosa* à ces molécules antibiotiques. Pour limiter le développement de ce pouvoir de résistance, les cliniciens suggèrent une utilisation parcimonieuse de la tobramycine par voie inhalée, avec une alternance mensuelle de son emploi. Ce phénomène de résistance pose problème, plus particulièrement chez les enfants et les jeunes adultes, car les options thérapeutiques sont limitées pour les patients peu âgés, et ainsi leur espérance de vie est diminuée. Si de nouvelles molécules sont développées, un usage raisonné et une surveillance de l'utilisation sont indispensables pour garantir une efficacité à long terme (223). Cependant, le nombre de molécules en développement reste limité et ne concerne que des molécules de classes pharmacologiques déjà existantes. Il s'agit du ceftobiprole pour la classe des β -lactamines et de la sitafloxacinine pour la classe des fluoroquinolones (196).

Une innovation thérapeutique pourrait voir le jour avec la mise au point d'inhibiteurs de pompes à efflux, mais des problèmes de toxicité mal connus pourraient compromettre leur développement (196).

Des changements majeurs au niveau du mode d'administration des antibiotiques sont apparus. (222). Il s'agit de la solution pour inhalation d'aztréonam lysine (CAYSTON®), de la poudre de tobramycine pour inhalation (TOBI®) et de deux autres molécules encore à l'étude : la poudre sèche de colistine (224) et la lévofloxacine par voie inhalée (225).

- L'aztréonam lysine (CAYSTON®)

L'aztréonam est un antibiotique de la famille des monobactames possédant une activité contre les bactéries Gram négatif, y compris *P. aeruginosa*. Cet antibiotique est déjà utilisé par voie IV. Il contient alors de l'arginine risquant d'entraîner une inflammation des voies respiratoires chez les patients mucoviscidosiques, après une utilisation prolongée. Pour ne pas exacerber le phénomène inflammatoire propre à la maladie, une autre formulation galénique était nécessaire (226). Le CAYSTON® a été formulé spécifiquement pour un usage par inhalation afin d'assurer une meilleure tolérance pulmonaire (Figure 48). Ce mode d'administration améliore la fonction pulmonaire et diminue la densité de *P. aeruginosa* dans les crachats (227). Pour éviter l'apparition de résistances, l'aztréonam pourrait être utilisé en alternance avec d'autres antibiotiques inhalés et/ou en combinaison avec des thérapies non antibiotiques (226).



Figure 48 : La spécialité CAYSTON®

- La poudre de tobramycine pour inhalation (TOBI®)

Il s'agit d'une poudre sèche développée en alternative à la tobramycine nébulisée. Cette forme possède plusieurs avantages : un temps d'administration inférieur à trois minutes, la possibilité de conserver la poudre à une température ambiante ou encore l'absence de nettoyage ou de désinfection de l'appareil après utilisation. La poudre sèche de tobramycine

(TOBI®) permet un meilleur dépôt de l'antibiotique au niveau des poumons, par rapport à la tobramycine nébulisée (Figure 49). De plus, cette forme galénique autorise l'administration d'une dose plus faible d'antibiotique. Les effets indésirables les plus fréquents sont une augmentation de la toux et une dysgueusie (227).



Figure 49 : La spécialité TOBI®

- La poudre sèche de colistine

La colistine appartient à la famille des polymyxines. Ces derniers sont des polypeptides cationiques qui, en se liant au LPS de bactéries Gram négatif, augmentent la perméabilité membranaire, ce qui entraîne la mort bactérienne (228). Cet antibiotique est actif contre *P. aeruginosa* et peu de résistances ont été mises en évidence actuellement. La colistine nébulisée est utilisée depuis 1980 pour traiter les infections intermittentes et chroniques à *P. aeruginosa* chez les patients mucoviscidosiques. Afin d'améliorer l'efficacité de cet antibiotique et de rendre son administration moins chronophage, une poudre sèche de colistine a été mise au point. Cette forme permet l'utilisation d'une dose plus faible que celle de la colistine nébulisée, réduisant ainsi les effets indésirables. La forme galénique est généralement bien tolérée avec seulement l'apparition d'une légère toux. Cependant, comparativement à la forme nébulisée, la poudre sèche de colistine a des

inconvenients, notamment au niveau de sa pharmacocinétique : une faible biodisponibilité, une concentration maximale faible et une durée allongée pour atteindre cette concentration. Une optimisation de la taille des particules et du flux inspiratoire permettrait d'améliorer le dépôt pulmonaire (227).

- La lévofloxacine par voie inhalée

La lévofloxacine est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones. Cet antibiotique est très efficace contre *P. aeruginosa*. Il est également actif contre d'autres bactéries retrouvées au sein de poumons de patients MV, telles que *B. cepacia* complex, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM) et *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). L'activité bactéricide de la lévofloxacine est rapide et optimale, limitant ainsi le développement de résistance. La forme inhalée a une meilleure biodisponibilité, comparativement à la voie orale ou intraveineuse. Le biofilm de *P. aeruginosa* ne compromet pas l'activité de la lévofloxacine (225).

2.2 Innovations galéniques

Les liposomes constituent un vaste sujet de recherche. Ce sont des vésicules biodégradables formés à partir de phospholipides ayant une taille de l'ordre du nanomètre ou du micromètre. Ces vésicules lipidiques sont des systèmes de délivrance d'antibiotiques. Ces derniers sont ainsi encapsulés et protégés des agressions et de l'inactivation par des agents polyanioniques tels que les glycoprotéines, l'ADN, les filaments d'actines et les endotoxines bactériennes. Les liposomes permettent d'augmenter l'activité et la biodisponibilité des antibiotiques tout en diminuant leur toxicité (228).

Les liposomes peuvent être administrés par voie inhalée pour garantir la meilleure biodisponibilité au niveau des poumons et ainsi abaisser les doses d'antibiotiques. Les effets secondaires systémiques sont diminués et la survenue de résistances est limitée (229).

Trois molécules sont actuellement à l'étude. Il s'agit de la tobramycine et de l'amikacine pour la famille des aminoglycosides et de la polymyxine B pour la famille des polymyxines (228).

De plus, les liposomes ont la capacité de pénétrer à l'intérieur du biofilm de *P. aeruginosa* pour y libérer l'antibiotique (229).

Lors de l'administration parentérale, les principaux effets indésirables des aminosides sont l'ototoxicité et la néphrotoxicité. Ceci est dû à leur nature hydrophile qui empêche leur absorption. L'utilisation de liposomes permettrait de diminuer ces effets indésirables (228).

2.3 Inhibition du « quorum sensing »

Contrairement aux antibiotiques, les inhibiteurs du « quorum sensing » n'agissent pas directement sur la croissance bactérienne mais ils réduisent la virulence de *P. aeruginosa*. C'est le système immunitaire qui prend ensuite le relais pour éliminer les bactéries rendues moins virulentes. Ces inhibiteurs ne sont donc pas bactéricides par eux-mêmes. Le risque de développement de résistances est donc diminué (147).

Cinq cibles potentielles peuvent être explorées pour inhiber le « quorum sensing » :

- dégradation ou inhibition de la synthèse d'AHL ;
- inhibition de la formation des complexes LasR ou Rhlr avec les AHL ;
- inhibition des régulateurs positifs du « quorum sensing » ;
- inhibition de l'expression de lasR-lasI ou de rhlR-rhlI ;
- inhibition du « quorum sensing » par les macrolides (147).

2.3.1 Dégradation ou inhibition de la synthèse d'AHL

Les AHL sont des molécules instables. Lorsque le pH augmente, elles deviennent inactives. Cette inactivation des AHL est due à l'ouverture du cycle : c'est la lactonolyse. *Bacillus sp* est l'une des nombreuses espèces bactériennes à posséder des lactonases, enzymes qui clivent le cycle des AHL. Ces lactonases sont codées par les gènes *aiiA* qui ont été introduits puis exprimés via un plasmide dans une souche de *P. aeruginosa*. Ainsi, la synthèse des C4-HSL et des 3-oxo-C12-HSL a été réduite, ce qui a entraîné un arrêt de la transcription

des gènes de virulence (147). La synthèse de certains facteurs de virulence est également réduite tels que la pyocyanine, l'élastase et les rhamnolipides (140). Cependant, cette voie de recherche comporte des inconvénients. Le premier concerne le caractère réversible de la lactonolyse. Les AHL, inactivées par ouverture de leur cycle, pourraient redevenir actives par fermeture spontanée du cycle. Le second inconvénient est relatif à la taille trop importante des enzymes, compromettant leur transport au sein du site infectieux et limitant leur utilisation par voie systémique. Les applications médicales sont alors limitées dans le cadre de la mucoviscidose. Néanmoins, cette inactivation des AHL pourrait avoir un intérêt en cas d'infections cutanées à *P. aeruginosa* chez les sujets brûlés en utilisation locale (147).

Les AHL peuvent également être inactivées par des anticorps anti-C3-oxo-C12-HSL. Ils se lient aux AHL extracellulaires qui ne peuvent plus diffuser de bactéries à bactéries, les empêchant par conséquent d'exercer leur activité immuno-modulatrice (147), notamment l'activation du transcrite de *lasB* et la production d'IL-8 par les cellules épithéliales (140).

Il est également possible d'inhiber la synthèse des AHL en modifiant la nature des précurseurs indispensables à cette synthèse. Ainsi, les mutations dans les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, précurseurs des AHL, entraîne une synthèse importante d'acides gras à courtes chaînes. L'enzyme LasI est alors saturée d'acyl à courtes chaînes et la synthèse de 3-oxo-C12-HSL est diminuée. Ceci permet d'atténuer la virulence de *P. aeruginosa* (147).

Pour synthétiser les AHL, une molécule de S-adénosyl méthionine est nécessaire en tant que donneur d'acide aminé. Des analogues de cette substance tels que la S-adénosylhomocystéine, la S-adénosylcystéine et la sinéfungine peuvent bloquer la synthèse des AHL chez *P. aeruginosa*. Néanmoins, ces analogues ne sont pas assez spécifiques (140).

2.3.2 Inhibition de la formation des complexes LasR ou RhlR avec les AHL

La liaison des protéines LasR et RhlR avec les AHL correspondantes engendre la transcription de plusieurs gènes par interaction avec l'ADN (147). Dans cette voie de recherche, c'est la liaison de l'AHL au niveau de son récepteur protéique qui est visée par un blocage. Pour réaliser celui-ci, on peut employer soit des inhibiteurs compétitifs possédant une structure similaire à celle de l'AHL, soit des inhibiteurs non compétitifs qui auraient une structure différente de l'AHL et qui se lieraient à des sites différents sur le récepteur protéique

(140). L'utilisation d'antagonistes, dérivés des furanones, permet d'inhiber la liaison LasR-AHL (147). Ces furanones ont été découverts chez une algue originaire d'Australie : *Delisea pulchra* (Figure 50). En effet, les chercheurs ont observé que cette algue n'était pas infestée de bactéries contrairement à d'autres évoluant dans le même environnement. Les furanones ont une structure très proche des AHL et se comportent alors comme des antagonistes, prévenant ainsi la contamination de l'algue (113).



Figure 50 : L'algue *Delisea pulchra* (113)

2.3.3 Inhibition des régulateurs positifs du « quorum sensing »

La transcription de *lasR* et de *rhIR* est contrôlée par des régulateurs positifs : des gènes comme *gacA* et *vfr* (140). Provoquer une délétion sur ces gènes affecterait la transcription de *lasR* et de *rhIR* et permettrait de diminuer la synthèse des protéines LasR et RhlR et ainsi réduire la production des facteurs de virulence sous la dépendance du « quorum sensing » (147).

2.3.4 Inhibition de l'expression de lasR-lasI ou de rhlR-rhII

Cette voie de recherche utilise des oligonucléotides antisens pouvant s'hybrider aux ARNm des gènes *lasR*, *lasI*, *rhlR* ou *rhlI*. Ceux-ci inhiberaient ainsi l'expression du « quorum sensing » (147).

2.3.5 Inhibition du « quorum sensing » par les macrolides

L'administration d'azythromycine sur une culture de *P. aeruginosa* interfère avec le « quorum sensing ». Ainsi la transcription de *lasI* est réduite de 80 % et celle de *rhlI* de 50 %. On observe également une réduction de la synthèse de 3-oxo-C12-HSL et de C4-HSL ainsi que de la quantité d'élastase et de rhamnolipide. Le mécanisme d'action est encore mal connu mais il semblerait que l'azythromycine agisse en inhibant la synthèse des molécules auto-inductrices. (230).

2.4 La vaccination contre *Pseudomonas aeruginosa*

Un vaccin composé de polysaccharide O du LPS conjugué à l'exotoxine A a été développé. Ce vaccin permet de réduire l'incidence des infections chroniques à *P. aeruginosa* ainsi que l'émergence de souches mucoïdes. L'immunogénicité du vaccin se traduit par une production d'anticorps opsonisants que sont les IgG anti-LPS et anti-exotoxine A. Néanmoins, ce vaccin nécessite des injections de rappel à 12-18 mois d'intervalle pour maintenir un taux d'anticorps suffisant en vue d'assurer une protection contre les infections à *P. aeruginosa*. Des réactions locales, notamment une douleur, une rougeur et un œdème au site d'injection, ont été rapportées. Des réactions systémiques sont également à prendre en compte telles qu'une sensation de malaise et des maux de tête. Le vaccin est encore en phase de recherche préclinique (231).

Un autre type de vaccin est également en cours d'étude. Il s'agit d'un vaccin formulé à partir du flagelle de *P. aeruginosa*. Des résultats prometteurs en terme de prévention de la colonisation des patients mucoviscidosiques par *P. aeruginosa* ont été obtenus avec un vaccin

bivalent à base de flagelle de type a et b. Le vaccin est bien toléré et entraîne une bonne réponse immunogène, avec une production élevée et durable d'IgG antflagelle (232). Le vaccin diminue le risque d'infection par *P. aeruginosa* permettant ainsi d'allonger la durée de vie des malades. Le mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé. Il semblerait que le vaccin agisse en inhibant l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte, en réduisant les réactions inflammatoires, en bloquant la mobilité de la bactérie, en induisant la phagocytose ou en entraînant la mort de la bactérie par opsonisation (233).

L'utilisation d'anticorps IgY anti-*Pseudomonas* semble être une piste de recherche intéressante pour prévenir des infections. Ces anticorps anti-*Pseudomonas* sont obtenus à partir de poules pondeuses que l'on immunise avec des souches de *P. aeruginosa*. Les anticorps sont transportés dans le jaune d'œuf, puis ils sont alors récoltés et purifiés (234).

P. aeruginosa infecte le système pulmonaire profond via l'oropharynx. Un traitement par IgY, par voie orale, permettrait de prévenir la colonisation par la bactérie de l'oropharynx et donc sa migration au niveau des voies respiratoires basses et l'infection des poumons. Les IgY se lient à la flagelline, protéine constituant le flagelle, qui joue le rôle d'antigène. Ils empêchent ainsi *P. aeruginosa* d'adhérer aux cellules épithéliales (234). La flagelline étant responsable d'une inflammation, sa liaison avec IgY permet de réduire cette réaction inflammatoire (235).

Le traitement est facile à prendre. Les patients pratiquent un gargarisme de 2 minutes avec la solution avant de l'avalier. Cela prend seulement quelques minutes par jour, peut se faire à domicile et n'entrave ni la scolarité ni la vie professionnelle. Cette thérapie ne comporte pas d'effets indésirables et ne provoque pas de réactions inflammatoires. De plus aucun risque de développement de résistance n'est à craindre (234).

Cette immunothérapie par voie orale a un fort potentiel pour prévenir la colonisation par *P. aeruginosa* et pour retarder la survenue des infections chroniques. Le nombre d'infections étant diminué, l'utilisation des antibiotiques est réduite, minimisant ainsi le risque de survenue de résistances et d'effets indésirables (234). Les IgY peuvent être une alternative aux antibiotiques ou utilisés en complément de ceux-ci (235).

Depuis 2003, ce traitement prophylactique contre *P. aeruginosa* est utilisé en Suède chez des patients colonisés de façon intermittente et il est remboursé par le gouvernement suédois (234).

2.5 La phagothérapie

2.5.1 Définition et rappels historiques

La phagothérapie est une forme de traitement dont le principe est basé sur les bactériophages. Les bactériophages sont des virus dont la cible est la bactérie. Leur structure est similaire aux virus s'attaquant aux cellules eucaryotes. Ils sont constitués d'une capsidie protéique qui enveloppe le matériel génétique (ARN ou ADN simple ou double brin). Les bactériophages furent découverts en 1917 par Herelle de l'Institut Pasteur (236). Cette méthode thérapeutique fut, dès cette époque, proposée comme possible traitement contre les infections bactériennes humaines (237). Après une courte période de développement, l'avènement des antibiotiques va mettre un terme à cette voie de recherche en Europe de l'Ouest. Cependant, la recherche est restée active en Europe de l'Est (surtout en Russie et en Géorgie) où les bactériophages étaient et sont toujours utilisés pour traiter les patients (238) dans diverses infections comme les otites, les infections cutanées sévères et les infections pulmonaires dont celles à *P. aeruginosa*. L'accroissement de la multirésistance aux antibiotiques rend nécessaire l'apparition d'alternatives thérapeutiques (237). Dans ce contexte, différents traitements antibactériens sont aujourd'hui étudiés et il existe notamment un certain intérêt pour la phagothérapie depuis une dizaine d'années. Les technologies ont, maintenant beaucoup évolué, tout comme nos connaissances concernant la biologie des bactériophages et de leurs relations vis-à-vis des bactéries. Il est désormais possible de contrôler de manière fiable la production de solutions de bactériophages ayant une efficacité optimale contre des souches bactériennes ciblées (239).

2.5.2 Les principaux avantages et inconvénients de la phagothérapie

En comparaison de l'antibiothérapie, l'utilisation de la phagothérapie procure différents avantages qui sont inhérents à la nature des bactériophages. Cependant, comme toute méthode thérapeutique, elle présente des inconvénients que l'on peut contourner (240).

2.5.2.1 Les principaux avantages

2.5.2.1.1 Activité sur le biofilm

Certains bactériophages ont montré une capacité à se développer et à diffuser au sein même du biofilm (241). Ils possèdent une activité polysaccharide dépolymérase au niveau de leur plateau de fixation. Ainsi, on a mis en évidence que le bactériophage F116 de *P. aeruginosa* était capable de diffuser au travers de l'alginate, et de diminuer à la fois la viscosité du biofilm de plus de 40 % et le nombre de bactéries renfermées au sein de ce biofilm formé depuis 20 jours (242). Ces résultats ont également été confirmés pour d'autres souches de bactériophages, Φ NH-4 et Φ MR299-2 et ils ont montré une diminution de 50 à 99 % de la charge bactérienne dans le biofilm (243).

2.5.2.1.2 L'omniprésence des bactériophages

Il est largement considéré, par la communauté scientifique, qu'il existe autant de bactériophages spécifiques qu'il existe d'espèces bactériennes. Leur isolement et leur sélection est rapide et peu onéreuse. On peut donc, en théorie, produire un traitement spécifique pour toutes les infections bactériennes. Cependant, le mode d'administration de cet éventuel traitement doit être adapté à chaque infection (240).

2.5.2.2 Les principaux inconvénients

2.5.2.2.1 Le mode de préparation des bactériophages

La production de bactériophages nécessite l'utilisation de cultures de bactéries vivantes qui peuvent produire une grande quantité de toxines et/ou de protéines immunogènes, lors de la lyse. Ces produits doivent être éliminés des préparations afin d'éviter une stimulation excessive du système immunitaire et un choc potentiellement mortel pour le patient. Toutefois, différentes technologies permettent l'élimination efficace de ces molécules (239) soit par purification, soit par filtration (243).

2.5.2.2.2 La reconnaissance par le système immunitaire

Toutes les protéines des bactériophages sont des substances immunogènes en puissance qui peuvent provoquer une réponse immunitaire spécifique, notamment la production d'anticorps. Une étude réalisée, chez le lapin, a rapporté que le titre d'anticorps neutralisants était plus faible lors d'une seule injection ou lors d'une série d'injections rapprochées dans le temps que lors de multiples injections espacées de plusieurs semaines. D'autre part, les anticorps induits lors d'injections rapprochées seraient de type IgM, dont l'activité neutralisante serait faible et facilement réversible, alors que les injections espacées produiraient des anticorps de type IgG. La voie d'administration a également un fort impact sur la production d'anticorps neutralisants, la voie orale semblant être la moins immunogène. Par ailleurs, probablement en raison de l'omniprésence des bactériophages dans l'environnement, la présence d'anticorps anti-phages préexistants au traitement est observée chez certains patients. En outre, cette réponse dépend des bactériophages et il semblerait que la majorité de ces anticorps soient dirigés contre les protéines de la queue. Les bactériophages présentant une structure plus simple provoqueraient ainsi une réponse moins intense et seraient donc d'un plus grand intérêt thérapeutique. Il est probable que cette réponse humorale soit en partie à l'origine d'une élimination rapide des bactériophages de l'organisme et puisse impacter l'efficacité du traitement. Cependant, une étude conduite chez 30 patients en Pologne fait état d'une faible corrélation entre la production d'anticorps et l'issue du traitement (244).

2.5.3 Les bactériophages de *Pseudomonas aeruginosa* et leurs applications dans la mucoviscidose

2.5.3.1 Les bactériophages de *Pseudomonas aeruginosa*

Actuellement, on dénombre 64 bactériophages de *P. aeruginosa* dont les génomes sont entièrement séquencés. Ces bactériophages sont recensés dans le Genbank (banque de séquences d'ADN). Le nombre de bactériophages de *P. aeruginosa* contenus dans la base de données ne cesse d'augmenter. Ce phénomène s'explique par le caractère ubiquitaire de *P. aeruginosa* permettant ainsi un développement de nouveaux variants de bactériophages (245).

2.5.3.2 Utilisation dans le cadre des infections pulmonaires de la mucoviscidose

La plupart des études avec les bactériophages de *P. aeruginosa* sont réalisées sur des infections cutanées, notamment les brûlures. Il existe peu d'études expérimentales portant sur les infections pulmonaires. Les différents modèles utilisés consistent en une infection intranasale de *P. aeruginosa* suivie d'une administration de bactériophages par voie intranasale ou intraveineuse (246).

Les premières études réalisées en Union Soviétique en 1995, ont rapporté une efficacité des bactériophages dans le traitement de patients MV atteints d'infections à *P. aeruginosa* (247). Une étude a été conduite sur 8 patients MV en Géorgie. Les patients ont reçu des bactériophages sous forme inhalée, à plusieurs reprises pendant 6 à 10 jours, avec maintien du traitement antibiotique conventionnel, des fluidifiants du mucus et des vitamines. Les résultats rapportés montrent une diminution considérable de la charge bactérienne dans les expectorations des patients, une amélioration de l'état général et pour l'ensemble des patients un allongement de la période entre deux exacerbations (248). D'autre part, une étude de cas, réalisée en Géorgie, rapporte les mêmes conclusions pour un patient MV atteint d'infection chronique à *P. aeruginosa* (249). Ces études sont pleines d'espoir et il semble que les bactériophages soient capables de réduire les infections à *P. aeruginosa*. Cependant, les échantillons de patients étudiés étant très faibles, il est difficile de conclure de façon certaine quant à l'efficacité réelle et l'innocuité des bactériophages, notamment sur le long terme.

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mlle BONNEL Claire

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques dans la population caucasienne. Elle touche environ 6000 personnes en France et 70 000 dans le monde et se transmet sur un mode autosomique récessif. Cette maladie est liée à une mutation du gène *cftr* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Ce gène code une protéine CFTR exprimée au niveau de nombreuses cellules épithéliales de l'organisme (pulmonaires, intestinales, biliaires, glandes sudoripares et glandes du tractus génital). Cette protéine CFTR joue le rôle de canal ionique spécifique des ions chlorures permettant de réguler le volume et la viscosité des sécrétions. Son dysfonctionnement, suite à une mutation du gène *cftr*, entraîne une altération du fonctionnement de nombreux organes : poumons, foie, pancréas, intestin grêle, peau et organes génitaux. Cependant, les manifestations broncho-pulmonaires demeurent au premier plan de la maladie, ainsi l'atteinte respiratoire est celle qui est la plus grave, en particulier à la suite d'infections. Tous les types d'agents infectieux peuvent être mis en évidence au sein des poumons de patients atteints de mucoviscidose : bactériens, viraux (les virus *influenzae*, *parainfluenzae* et le virus respiratoire syncytial,...) et fongiques (*Aspergillus fumigatus*,...). Au niveau bactérien, trois espèces infectent préférentiellement les patients mucoviscidosiques : *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'infection par *P. aeruginosa* est la plus problématique dans ce contexte.

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste, ubiquitaire affectionnant particulièrement les milieux humides. Elle produit de nombreux facteurs de virulence pour coloniser les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Le « quorum sensing », système de communication entre les bactéries, leur permet d'adapter leur comportement et la sécrétion de facteurs de virulence. Le caractère chronique de l'infection oblige *P. aeruginosa* à évoluer en fonction de la pression de sélection. De nombreux changements phénotypiques sont observés. Ainsi, le passage à un phénotype mucoïde capable de produire de l'alginate, permet la formation d'un biofilm. Cette structure particulière permet la protection de la bactérie face aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antibiotiques. Des souches ayant

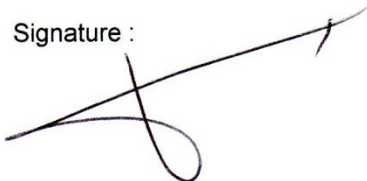
modifié leur lipopolysaccharide ou dépourvues de flagelle et de pili peuvent également être mises en évidence. La survenue de mutations spontanées permet une variation du génotype.

La prise en charge thérapeutique de l'infection à *P. aeruginosa* repose sur l'antibiothérapie. L'administration des antibiotiques par l'intermédiaire d'aérosols permet d'augmenter l'efficacité et la rapidité d'action tout en permettant de limiter les effets secondaires systémiques. Cette bactérie est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et ce phénomène s'amplifie constamment. L'absence de développement de nouveaux antibiotiques oblige le clinicien à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les innovations, nous pouvons citer la modification de la galénique des antibiotiques, le développement de liposomes, la mise au point d'inhibiteurs du « quorum sensing » ou l'utilisation de la phagothérapie. Ces pistes sont porteuses de grands espoirs mais *P. aeruginosa* ne sera-t-il pas capable dans un futur plus ou moins proche de déjouer ces nouvelles thérapies ?

La mucoviscidose reste à l'heure actuelle une maladie incurable. *P. aeruginosa* est l'un des facteurs bactériens les plus redoutés. Cependant, la mise en place du diagnostic néonatal en 2002, le suivi régulier des patients au sein des CRCM (Centre de Ressources et de Compétence de la Mucoviscidose), les progrès de la prise en charge et les avancées scientifiques et thérapeutiques ont permis d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients.

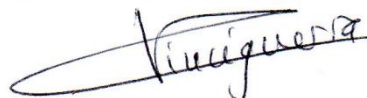
Le Président de la thèse,
Nom : FRENEY Jean

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 10 DEC. 2013
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Association Grégory Lemarchal. <http://www.association-gregorylemarchal.org/>, consulté le 5 septembre 2013.
- (2) Wikipedia. Mucoviscidose. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Mucoviscidose>, consulté le 5 septembre 2013.
- (3) Vaincre la mucoviscidose. <http://www.vaincrelamuco.org/>, consulté le 5 septembre 2013.
- (4) Registre français de la mucoviscidose. Bilans des données 2005 de l'Observatoire National de la Mucoviscidose. <http://www.vaincrelamuco.org/>, consulté le 5 septembre 2013.
- (5) Pourcel C, Vu Thien H, Vergnaud G. Epidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients mucoviscidosiques. *Revue francophone des laboratoires*. 2011; 2011 (435): 41-8.
- (6) Lenoir G, Vrielynck S, Clairicia M, Afsa Fezaa D, Sorin M, Sermet-Gaudelus I. Infection bactérienne et mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*. 2007; 2007 (397): 49-57.
- (7) Ameli. Points de repère n°7 – Prise en charge de la mucoviscidose en affection de longue durée. <http://www.ameli.fr/>, consulté le 24 avril 2012.
- (8) Brouard J, Lecoq I, Vérine C, Laurans M, Duhamel JF. Mucoviscidose : dépistage et prise en charge. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. 2000; 13 (8): 458-65.
- (9) Girodon-Boulandet E, Costa C. Génétique de la mucoviscidose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2005; 8 (3): 126-34.
- (10) Registre français de la mucoviscidose. Bilan des données 2011. <http://www.vaincrelamuco.org/>, consulté le 26 avril 2012.
- (11) Rosenfeld M, Davis R, FitzSimmons S, Pepe M, Ramsey B. Gender Gap in cystic fibrosis mortality. *Am J Epidemiol*. 1997; 145 (9): 794-803.
- (12) Costes B, Girodon-Boulandet E, Pagesty P, Fanen P, Goosens M. La génétique. In: Navarro J, Bellon G. *La mucoviscidose 2^{ème} édition*. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.15-32.
- (13) Corvol H, Flamant C, Vallet C, Clement A, Brouard J. Les gènes modificateurs dans la mucoviscidose. *Archives de pédiatrie*. 2006; 13 (1): 57-63.
- (14) CNRS. Du gène *cftr* à la protéine CFTR. <http://www.cnrs.fr/insb/communication/glossaire/cftrillustr.htm>, consulté le 7 mai 2012.
- (15) Lewis MJ, Lewis III EH, Amos JA, Tsongalis GJ. Cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol*. 2003; 120 (Suppl 1): S3-S13.

- (16) Carabin. La mucoviscidose. <http://www.carabin.fr/>, consulté le 15 mai 2012.
- (17) Bienvenu T. La mucoviscidose : les relations entre le génotype et le phénotype. Archives de pédiatrie. 2003; 10 (Suppl 2): S318-24.
- (18) Feldman GL, Monaghan KG. The risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically and racially divers north american population. Prenat Diagn. 1999; (19): 604-9.
- (19) Ferec C. Epidémiologie génétique de la mucoviscidose en France. Pathologie Biologie. 2001; 49 (5): 418-9.
- (20) Fanen P, Hasnain A. Mucoviscidose et gène CFTR. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. <http://www.atlasgeneticsoncology.org/>, consulté le 30 mai 2012.
- (21) Encyclopédie Orphanet. Grand public. La mucoviscidose. <http://www.orpha.net/>, consulté le 3 juin 2012.
- (22) Edelman A, Fritsch J. Différents aspects de régulation du transport ionique transépithélial dans le contexte de la mucoviscidose. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005; 8 (3): 135-49.
- (23) Wikipedia. Gène et protéine CFTR. http://fr.wikipedia.org/wiki/Gène_et_protéine_CFTR, consulté le 4 juin 2012.
- (24) Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as chloride channel. Physiol Rev. 1999; 79 (Suppl 1): S145-66.
- (25) Chinet T, Blouquit S. Génétique et biologie cellulaire de la mucoviscidose. La revue du praticien. 2003; 53 (2): 130-4.
- (26) Stern M, Picard C, Grenet D. La mucoviscidose de l'adulte. La presse médicale. 2002; 31 (6): 263-70.
- (27) Hubert D. Mucoviscidose. EMC – Médecine. 2005; 2 (1): 34-41.
- (28) Reix P, Döring G, Bellon G. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire. In: Navarro J, Bellon G. La mucoviscidose 2^{ème} édition. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.73-102.
- (29) Chinet T. Physiopathologie de la sécrétion hydro-électrolytique épithéliale. In: Navarro J, Bellon G. La mucoviscidose 2^{ème} édition. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.33-47.
- (30) Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. Bactéries pathogènes dans la mucoviscidose. Archives de pédiatrie. 2003; 10 (Suppl 2): S342-6.
- (31) Bingen E. Données bactériologiques. In: Navarro J, Bellon G. La mucoviscidose 2^{ème} édition. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.49-72.

- (32) Laurans M, Arion A, Fines-Guyon M, Regeasse A, Brouard J, Leclercq R *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* et mucoviscidose : « de la primocolonisation à l'infection chronique ». Archives de pédiatrie. 2006; 13 (Suppl 1): S22-9.
- (33) Delacourt C. Inflammation et mucoviscidose. Archives de pédiatrie. 2003; 10 (Suppl 2): S338-41.
- (34) Reix P, Bellon G. Les manifestations respiratoires dans la mucoviscidose et leur prise en charge. In: Navarro J, Bellon G. La mucoviscidose 2^{ème} édition. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.165-216.
- (35) Pin I, Brémont F, Clément A, Sardet A. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire au cours de la mucoviscidose chez l'enfant. Archives de pédiatrie. 2001; 8 (Suppl 5): S856-83.
- (36) Deye N. Syndrome de détresse respiratoire aigu (de l'adulte). http://ajmu.org/fr/images/Downloads/cours_respi/sdra_n_deye.pdf, consulté le 26 septembre 2013.
- (37) ANAES. Conférence de consensus. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Pneumologie et infectiologie. Paris; 2002.
- (38) Le Bourgeois M, Vrielynck S. Infection bronchopulmonaire dans la mucoviscidose. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005; 8 (3): 175-81.
- (39) Société Française de Microbiologie. REMIC. Diagnostic microbiologique des sécrétions broncho-pulmonaires chez un patient mucoviscidosique. Société française de microbiologie; 2010. p.99-103.
- (40) Blau H, Linnane B, Carzino R, Tannenbaum EL, Skoric B, Robinson PJ *et al.* Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage in young, non-expectorating cystic fibrosis children. J Cyst Fibros. 2013.
- (41) Marguet C, Couderc L. Prise en charge respiratoire de la mucoviscidose (en dehors de l'antibiothérapie et de l'insuffisance respiratoire chronique). Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005; 8 (3): 166-72.
- (42) Delaunay JP. Kinésithérapie respiratoire chez l'enfant atteint de mucoviscidose. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005; 8 (3): 182-90.
- (43) Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis · 1 : Epidemiology and pathogenesis. Thorax. 2007; 62 (4): 360-7.
- (44) Munck A, Navarro J, Lenaertz C. Physiopathologie de l'appareil digestif. In: Navarro J, Bellon G. La mucoviscidose 2^{ème} édition. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.103-20.
- (45) Munck A. Manifestations digestives au cours de la mucoviscidose. Archives de pédiatrie. 2003; 10 (Suppl 2): S333-7.

- (46) Munck A. Atteinte digestive de la mucoviscidose chez l'enfant. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2005; 8 (3): 197-203.
- (47) Robert JJ. Diabète de la mucoviscidose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2005; 8 (3): 217-24.
- (48) Vantghem MC, Moussaïd-Guennoun R, Perimenis P, Marcelli-Tourvieille S, Perez T, Wallaert B. Le diabète de la mucoviscidose chez l'adulte. *Annales d'endocrinologie*. 2005; 66 (4): 347-54.
- (49) Hubert D, Mosnier-Pudar H, Cormier C, Feigelson J. Atteintes autres que respiratoires et digestives au cours de la mucoviscidose. In: Navarro J, Bellon G. *La mucoviscidose 2^{ème} édition*. Montpellier: Espaces 34; 2001. p.143-62.
- (50) Dray X, Hubert D, Munck A, Moreau J, Marteau P. Manifestations digestives de la mucoviscidose de l'adulte. *Gastroentérologie clinique et biologique*. 2005; 29 (12): 1279-85.
- (51) Lacaille F. Atteinte hépatique dans la mucoviscidose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2005; 8 (3): 204-11.
- (52) Lacaille F. Manifestations hépatiques de la mucoviscidose. *Hépto-Gastro*. 2003; 10 (1): 55-9.
- (53) Marianowski R, Martins Carvalho C. Mucoviscidose et sphère ORL. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2005; 8 (3): 212-6.
- (54) Botton E, Saraux A, Laselve H, Jousse S, Le Goff P. Les manifestations rhumatologiques de la mucoviscidose. *Revue du rhumatisme*. 2003; 70 (9): 703-12.
- (55) Desideri-Vaillant C, Creff J, Le marechal C, Moalic V, Ferec C. Implication du gène *CFTR* dans la stérilité masculine associée à une absence de canaux déférents. *Immuno-analyse & biologie spécialisée*. 2004; 19 (6): 343-50.
- (56) Haute Autorité de Santé. Etat des lieux en santé publique. Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement. 2009.
- (57) Hubert D, Fajac I, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Ellaffi M, Dall'Ava-Santucci J *et al*. Diagnosis of cystic fibrosis in adults with diffuse bronchiectasis. *J Cyst Fibros*. 2004; 3 (1): 15-22.
- (58) Roussey M, Deneuille E, Dabadie A. Circonstances diagnostiques et dépistage néonatal de la mucoviscidose. *La revue du praticien*. 2003; 53 (2): 135-40.
- (59) Munck A, Sahler C, Briard M, Vidailhet M, Farriaux JP. Mucoviscidose : organisation du dépistage néonatal français, premiers résultats enregistrés. *Archives de pédiatrie*. 2005; 12 (6): 646-9.

- (60) Gaillard O. La trypsine (TIR). *Immuno-analyse & biologie spécialisée*. 2003; 18 (5): 254-5.
- (61) Dorche C, Cheillan D, Porst-Chevalier F. Les paramètres biologiques du dépistage systématique néonatal de la mucoviscidose : état des lieux après deux ans de fonctionnement en France. *Immuno-analyse & biologie spécialisée*. 2004; 19 (6): 351-6.
- (62) Marchand M, Jarreau C, Chauffert M, Garcia I, Asselin D, Thouvenot JP *et al.* Le test de la sueur. *Ann Biol Clin*. 1998; 56 (2): 215-21.
- (63) Levailant JM, Talmant C. Dépistage anténatal de la mucoviscidose. [http://pro.gyneweb.fr /sources/congres/jta/01/ped/levailant1.htm](http://pro.gyneweb.fr/sources/congres/jta/01/ped/levailant1.htm), consulté le 26 octobre 2012.
- (64) Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé. Avis n°83 : Le dépistage prénatal généralisé de la mucoviscidose. 2003.
- (65) Ray P, Viville S. Le diagnostic génétique pré-implantatoire en France. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2001; 4 (3): 204-7.
- (66) Reyhler G, Opdekamp C. Kinésithérapie et mucoviscidose. In: Reyhler G, Roeseler J, Delguste P. *Kinésithérapie respiratoire*. Elsevier masson; 2007. p.157-66.
- (67) Delaunay JP. Kinésithérapie respiratoire et mucoviscidose. *Vaincre la mucoviscidose*. <http://vaincrelamuco.org/>, consulté le 12 décembre 2012.
- (68) Vecellio None L, Lemarié E, Diot P. Aérosolthérapie. *EMC-Médecine*. 2005; 2 (1): 56-65.
- (69) Chantrel G, Cinquin S, Carteau H. Fonctionnement des appareils de nébulisation. In: Bautzenberg B, Diot P. *L'aérosolthérapie par nébulisation 2^{ème} édition*. Margaux Orange; 2006. p.43-57.
- (70) *Vaincre la mucoviscidose*. <http://www.vaincrelamuco.org/>, consulté le 20 décembre 2012.
- (71) PARI. eFlow®rapid : maniement et hygiène, information pour le patient. <http://www.pari-pharma.com/>, consulté le 21 décembre 2012.
- (72) Haute Autorité de Santé. Commission de la transparence. Avis : PULMOZYME 2500 U/2,5 ml, solution pour inhalation par nébuliseur. 2011.
- (73) Le Roux P, Le Luyer B. Traitements inhalés bronchodilatateurs et fluidifiants dans la mucoviscidose. *Archives de pédiatrie*. 2003; 10 (2): S358-63.
- (74) Derelle J. Inflammation des voies respiratoires dans la mucoviscidose. *La revue du praticien*. 2003; 53 (2): 141-4.
- (75) Dubus JC. Délivrance des traitements inhalés en pédiatrie. *Archives de pédiatrie*. 2003; 10 (12): 1083-8.

- (76) Lejosne C et coll. Education à l'aérosolthérapie du patient atteint de mucoviscidose. Kinésithérapie scientifique. 2005; (452): 5-11.
- (77) Ravilly S, Dubus JC. Nébulisation dans la mucoviscidose. In: Bautzenberg B, Diot P. L'aérosolthérapie par nébulisation 2^{ème} édition. Margaux Orange; 2006. p.91-101.
- (78) Sermet-Gaudelus I, Hulin A, Ferroni A, Silly C, Gaillard JL, Berche P *et al.* L'antibiothérapie dans la mucoviscidose : particularités pharmacologiques des antibiotiques. Archives de pédiatrie. 2000; 7 (5): 519-28.
- (79) Sardet A. Traitement anti-infectieux en dehors du *Pseudomonas aeruginosa*. Archives de pédiatrie. 2003; 10 (Suppl 2): S347-51.
- (80) Haute Autorité de Santé. Guide – Affection de longue durée. Mucoviscidose : protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. 2006.
- (81) Turck D, Michaud L, Wizla-Derambure N. Atteintes digestives dans la mucoviscidose et prise en charge nutritionnelle. La revue du praticien. 2003; 53 (2): 151-7.
- (82) ANAES. Conférence de consensus. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Observance, nutrition, gastro-entérologie et métabolisme. 2002.
- (83) Turck D. La mucoviscidose. Post'U (2013). <http://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf-2013/mucoviscidose.pdf>, consulté le 22 décembre 2012.
- (84) Duhamel JF, Laurans M, Brouard J, Lenoir G. La prise en charge nutritionnelle de la mucoviscidose. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005; 8 (3): 191-6.
- (85) Vaincre la mucoviscidose. Vitamines et acides gras essentiels dans la mucoviscidose. http://www.vaincrelamuco.org/ewb_pages/v/vitamines.php, consulté le 23 décembre 2012.
- (86) Munck A, Navarro J. Prise en charge nutritionnelle de la mucoviscidose à l'âge pédiatrique. Archives de pédiatrie. 2000; 7 (4): 396-401.
- (87) Jeanbaptiste AC, Matossian A. La maladie et la vie quotidienne, au fil du temps. http://www.muco-ucl.be/PDF/22_au_fil_du_temps.pdf, consulté le 11 décembre 2013.
- (88) Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Pseudomonas Burkholderia*. Bactériologie clinique. 3^{ème} édition. Ellipses; 2000. p.294-311.
- (89) Carpentier JP, Morillon M, Petrognani R, Cavallo JD. Infections à bacille pyocyanique - EM|Premium.. Encycl Méd Chir. 2003; (8-025-B-50): 23.
- (90) Husson MO, Harf-Monteil C, Monteil H. *Pseudomonas-Burkholderia-Ralstonia-Pandoraea*. In: Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Paris: ESKA; 2007. p. 1121-48.
- (91) Avril JL, Fauchère JL. Bactériologie générale et médicale. Ellipses; 2002. p.259-61.

- (92) Euzéby P. Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. <http://www.bacteriologie.net/>, consulté le 6 février 2013.
- (93) Current biology. <http://currentsinbiology.tumblr.com/post/58950774552/interruption-of-quorum-sensing-in-pseudomonas>, consulté le 8 février 2013.
- (94) Biokar diagnostics. Gélose lactosée de DRIGALSKI. <http://lycee-valin.fr/bgb/ftech/D5K.pdf>, consulté le 9 octobre 2013.
- (95) BD. Mode d'emploi – Milieux en boîtes de pétri prêts à l'emploi. BD Drigalski Lactose Agar. <http://www.bd.com/ressource.aspx?IDX=8860>, consulté le 9 octobre 2013.
- (96) Espace collaboratif en biotechnologies – Informations et ressources numériques en biochimie génie biologique. Colonies *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Drigalski. http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr/biospip/spip.php?article251&id_document=815#documents_portfolio, consulté le 9 février 2013.
- (97) Biokar diagnostics. Gélose au cétrimide (base). <http://lycee-valin.fr/bgb/ftech/C1K.pdf>, consulté le 9 octobre 2013.
- (98) Biokar diagnostics. Gélose CN pour *Pseudomonas*. [http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/AB12D3D68AD67102C125753D0033FA3C/\\$file/CN%20pour%20Pseudomonas%20-%20gélose%20%20BK165,%20BM070%](http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/AB12D3D68AD67102C125753D0033FA3C/$file/CN%20pour%20Pseudomonas%20-%20gélose%20%20BK165,%20BM070%20), consulté le 9 octobre 2013.
- (99) Production de pigments hydrosolubles par certaines espèces du genre *Pseudomonas*. http://biotechnologie.ac-montpellier.fr/IMG/pdf/Fiche_Pseudomonas_pigments.pdf, consulté le 2 décembre 2013.
- (100) Poole K. McKay GA. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci.* 2003; 8: 661-86
- (101) Sigma-aldrich. Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0046?lang=fr®ion=FR>, consulté le 2 décembre 2013.
- (102) Barakat R. Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Th Doctorat, La Rochelle; 2012.
- (103) O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287 (1): 94-103.

- (104) Davis MR Jr, Muszynski A, Lollett IV, Pritchett CL, Carlson RW, Goldberg JB. Identification of the mutation responsible for the temperature-sensitive lipopolysaccharide O-antigen defect in the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate 2192. *J Bacteriol.* 2013; 195 (7): 1504-14.
- (105) Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G *et al.* Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS.* 2007; 104 (19): 8101-6.
- (106) MicrobeWiki. *Pseudomonas aeruginosa*. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa, consulté le 4 décembre 2013.
- (107) Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* 2006; 36 (2): 78-91.
- (108) Hahn P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene.* 1997; 192 (1): 99-108.
- (109) Clausen M, Jakovljevic V, Sogaard-Andersen L, Maier B. High-force generation is a conserved property of type IV pilus systems. *J Bacteriol.* 2009; 191 (14): 4633-8.
- (110) Köhler T, Kocjancic Curty L, Barja F, van Delden C, Pechère JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol.* 2000; 182 (21): 5990-6.
- (111) Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res.* 2003; 338 (23): 2431-47.
- (112) Microbeonline – Online medical microbiology guide. Lipopolysaccharide (LPS) of Gram negative bacteria, characteristics and functions. <http://microbeonline.com/lipopolysaccharide-lps-of-gram-negative-bacteria-characteristics-and-functions/>, consulté le 10 octobre 2013.
- (113) Filloux A, Vallet I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences.* 2003; 19 (1): 77-83.
- (114) Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, EL Haloui NE, Attarassi B. Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne d'Infectiologie.* 2009; 2: 7-14.
- (115) Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007; 71 (3): 413-51.
- (116) Université Laval. Collections mémoires et thèses électroniques. <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/22856/ch01.html>, consulté le 12 octobre 2013.
- (117) Folders J, Tommassen J, van Loon LC, Bitter W. Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2000; 182 (5): 1257-63.

- (118) Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JA *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol.* 2012; 188 (1): 386-93.
- (119) Heimer SR, Evans DJ, Stern ME, Barbieri JT, Yahr T, Fleiszig SM. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes the type III secreted toxin ExoS to avoid acidified compartments within epithelial cells. *PLOS one.* 2013; 8 (9): 1-13.
- (120) Huber P, Bouillot S, Elsen S, Attrée I. Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. *Cell Mol Life Sci.* 2013.
- (121) Mustafi S, Rivero N, Olson JC, Stahl PD, Barbieri MA. Regulation of Rab5 function during phagocytosis of live *Pseudomonas aeruginosa* in macrophages. *Infect Immun.* 2013; 81 (7): 2426-36.
- (122) Whitney JC, Hay ID, Li C, Eckford PD, Robinson H, Amaya F *et al.* Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 (32): 13083-8.
- (123) Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol.* 2011; 2 (167): 1-16.
- (124) Riley LM, Weadge JT, Baker P, Robinson H, Codée JD, Tipton PA *et al.* Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX : role of AlgX in alginate acetylation. *J Biol Chem.* 2013; 288 (31): 22299-314.
- (125) Hay ID, Rehman ZU, Rehm BH. Membrane topology of outer membrane protein AlgE, which is required for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76 (6): 1806-12.
- (126) Damron FH, Goldberg JB. Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2012; 84 (4): 595-607.
- (127) Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2009; 44 (6): 547-58.
- (128) Troxler RB, Hoover WC, Britton LJ, Gerwin AM, Rowe SM. Clearance of initial mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2012; 47 (11): 1113-22.
- (129) Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.* 2013.
- (130) Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21 (4): 595-9.

- (131) Sansonetti P. Vie bactérienne communautaire, l'union fait la force : les biofilms. Leçon #4 du Collège de France. 2010.
- (132) Soong G, Muir A, Gomez MI, Waks J, Reddy B, Planet P *et al.* Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *J Clin Invest.* 2006; 116 (8): 2297-2305.
- (133) Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A *et al.* Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol.* 2004; 53 (1): 73-81.
- (134) Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilm in chronic infections. *Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica.* 2013; 121 (Suppl 136): 1-51.
- (135) Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol.* 2009; 73 (6): 1072-85.
- (136) Oinuma K, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone binding to and stability of the orphan *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor QscR. *J Bacteriol.* 2011; 193 (2): 421-8.
- (137) Darch SE, West SA, Winzer K, Diggle SP. Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial population. *PNAS.* 2012; 109 (21): 8259-63.
- (138) Ilangovan A, Fletcher M, Rampioni G, Pustelny C, Rumbaugh K, Heeb S *et al.* Structural basis for native agonist and synthetic inhibitor recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator PqsR (MvfR). *PLOS Pathogens.* 2013; 9 (7): 1-17.
- (139) Christensen LD, van Gennip M, Jakobsen TH, Alhede M, Hougen HP, Hoiby N *et al.* Synergistic antibacterial efficacy of early combination treatment with tobramycin and quorum-sensing inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* in an intraperitoneal foreign-body infection mouse model. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (5): 1198-206.
- (140) Le Berre R, Faure K, Nguyen S, Pierre M, Ader F, Guery B. Quorum sensing : une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Infect.* 2006; 36 (7): 349-57.
- (141) Guan LL, Onuki H, Kamino K. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66 (7): 2797-803.
- (142) Papaioannou E, Utari PD, Quax WJ. Choosing an appropriate infection model to study quorum sensing inhibition in *Pseudomonas* infections. *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (9): 19309-40.

- (143) Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rajaonson S, Diallo B, Mol A, El Jaziri M *et al.* Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76 (1): 243-53.
- (144) Bjarnsholt T, Jensen PO, Jakobsen TH, Phipps R, Nielsen AK, Rybtke MT *et al.* Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLOS one.* 2010; 5 (4): 1-10.
- (145) O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack MF, Bassler BL. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *PNAS.* 2013; 1-6.
- (146) Wilder CN, Diggle SP, Schuster M. Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the *las*, *rhl* and *pqs* quorum-sensing systems. *ISME J.* 2011; 5 (8): 1332-43.
- (147) Ruimy R, Andremont A. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation.* 2004; 13 (3): 176-84.
- (148) Ma L, Liu X, Liang H, Che Y, Chen C, Dai H *et al.* Effects of 14- α -lipoyl andrographolide on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (12): 6088-94.
- (149) Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax JW. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76 (1): 46-65.
- (150) Williams P, Camara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12 (2): 182-91.
- (151) Glucksam-Galnoy Y, Sananes R, Silberstein N, Krirf P, Kravchenko VV, Meijler MM *et al.* The bacterial quorum-sensing signal molecule N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone reciprocally modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in activated macrophages. *J Immunol.* 2013; 191 (1): 337-44.
- (152) Winstanley C, Fothergill JL. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 290 (1): 1-9.
- (153) Bacalso M, Xu T, Yeung K, Zheng D. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 required *lasI* and was stimulated by the *Pseudomonas* quinolone signal although salicylic acid inhibition is independent of the *pqs* pathway. *Journal of experimental microbiology and immunology.* 2011; 15: 84-9.
- (154) Bentzmann S, Plésiat P. *Pseudomonas aeruginosa* : une virulence complexe. *Revue francophone des laboratoires.* 2011; 2011 (435): 73-81.

- (155) Bacterio-web. *Pseudomonas aeruginosa* (coloration de Gram, culture). <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=158>, consulté le 10 mars 2013.
- (156) Wikipedia. Recherche de l'oxydase. http://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_de_l'oxydase, consulté le 13 octobre 2013.
- (157) Martin C. Bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies. In: Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier Masson; 2007. p.330-343.
- (158) Philippon A, Lalande V. *Burkholderia pseudomallei* fiche bactériologique. <http://www.microbes-edu.org/professionnel/pseudomallei.html>, consulté le 11 mars 2013.
- (159) Carbonnelle E, Nassif X. Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie : quels changements pour les cliniciens ? Réanimation. 2012; 21 (3): 351-61.
- (160) Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2008; 46 (10): 3361-7.
- (161) Courcol R. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? Revue francophone des laboratoires. 2009; 2009 (416): 61-4.
- (162) Faculty of Science – General Instruments. MALDI-TOF. <http://www.ru.nl/science/gi/facilities/other-devices/maldi-tof/>, consulté le 16 octobre 2013.
- (163) Doud M, Zeng E, Schnepel L, Narasimhan G, Mathee K. Approaches to analyse dynamic microbial communities such as those seen in cystic fibrosis lung. Hum Genomics. 2009; 3 (3): 246-56.
- (164) Fernandez-Olmos A, Garcia-Castillo M, Morosini MA, Lamas A, Maiz L, Canton R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2012; 11 (1): 59-62.
- (165) Bittar F, Rolain JM. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2010; 16 (7): 809-20.
- (166) Bittar F, Cassagne C, Bosdure E, Stremier N, Dubus JC, Sarles J *et al.* Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. Emerg Infect Dis. 2010; 16 (8): 1231-6.
- (167) ENS de Lyon. La PCR. <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>, consulté le 20 octobre 2013.

- (168) Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, Van Daele S, De Baets F, De Vos D *et al.* Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 1-7.
- (169) Deschaght P, Van daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibros.* 2011; 10 (5): 293-7.
- (170) Deschaght P, Schelstraete P, Lopes dos Santos Santiago G, Van Simaey L, Haerynck F, Van Daele S *et al.* Comparison of culture and qPCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in not chronically infected cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 1-6.
- (171) Logan C, Habington A, Lennon G, Cronin F, O'Sullivan N. Evaluation of the efficacy of real-time polymerase chain reaction for the routine early detection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum and throat swab specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68 (4): 358-65.
- (172) Le Gall F, Le Berre R, Rosec S, Hardy J, Gouriou S, Boisramé-Gastrin S. Proposal of a quantitative PCR-based protocol for an optimal *Pseudomonas aeruginosa* detection in patients with cystic fibrosis. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 1-9.
- (173) McCulloch E, Lucas C, Ramage G, Williams C. Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. *J Cyst Fibros.* 2011; 10 (1): 21-4.
- (174) Billard-Pomares T, Herwegh S, Wizla-Derambure N, Turck D, Courcol R, Husson MO. Application of quantitative PCR to the diagnosis and monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in 5-18-year-old cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol.* 2011; 60 (2): 157-61.
- (175) Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell SC, Wainwright CE, Nissen MD. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63 (2): 127-31.
- (176) Lefranc MP. IMGT.
<http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/methods/methods.html>, consulté le 20 mars 2013.
- (177) Plésiat P. Quels critères microbiologiques pour définir une colonisation ou une infection à *Pseudomonas aeruginosa* ? *Revue des maladies respiratoires.* 2003; 20 (2): 84-9.
- (178) Pagès JM, Monlezun L, Broutin I, Davin-Regli A. Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue francophone des laboratoires.* 2011; 41 (435): 63-72.
- (179) Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo JD, Jeannot K. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue francophone des laboratoires.* 2011; 2011 (435): 49-62.

- (180) Barbier F, Wolff M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. Vers l'impasse thérapeutique ? Med Sci. 2010; 26 (11): 960-8.
- (181) Weber M. L'antibiogramme en pratique courante. In: Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique. Paris: ESKA; 2007. P.609-34.
- (182) Galeries photos/images/schémas du réseau STI-Biotechnologies. *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr/zimages/spip.php?article169>, consulté le 14 décembre 2013.
- (183) Docstoc. Inoculum effect on Etest colistin and polymixin B with *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.docstoc.com/docs/124476370/Inoculum-effect-on-Etest-Colistin-and-Polymyxin-B-with-P>, consulté le 14 décembre 2013.
- (184) Hafiane A, Ravaoarinoro M. Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. Médecine et maladies infectieuses. 2008; 38 (5): 238-47.
- (185) Université de Rouen. RFLP. <http://www.univ-rouen.fr/ABISS/L1/WEB/empreinte/RFLP>, consulté le 2 novembre 2013.
- (186) Université Pierre et Marie Curie. RFLP. http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/rflp.html, consulté le 2 novembre 2013.
- (187) Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN *et al*. Spread of a multiresistant of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. Lancet. 2001; 358 (9281): 557-8.
- (188) Bidet P, Bingen E. Apports des marqueurs moléculaires dans l'analyse des mécanismes d'acquisition et dans le suivi des infections nosocomiales. Médecine thérapeutique/Pédiatrie. 2012; 15: 46-61.
- (189) Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis. 2005; 26 (13): 2567-82.
- (190) Nazaret S, Assade F, Brothier E, Freydière AM, Bellon G, Cournoyer B. RISA-HPLC analysis of lung bacterial colonizers of cystic fibrosis children. J Microbiol Methods. 2009; 76 (1): 58-69.
- (191) Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA *et al*. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. PLoS One. 2010; 5 (6): 1-10.
- (192) Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis : a review of epidemiology and pathobiology. Clin Chest Med. 2007; 28 (2): 279-88.

- (193) Kosorok MR, Zeng L, West SEH, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A *et al.* Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol.* 2001; 32 (4): 277-87.
- (194) Kozłowska WJ, Bush A, Wade A, Aurora P, Carr SB, Castle RA *et al.* Lung function from infancy to the preschool years after clinical diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178 (1): 42-9.
- (195) Vaincre la mucoviscidose. Le traitement des colonisations ou des infections. http://www.vaincrelamuco.org/ewb_pages/a/antibiotiques.php, consulté le 24 avril 2013.
- (196) Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques.* 2007; 9 (3): 189-98.
- (197) David V. Comment traiter la primocolonisation par *Pseudomonas aeruginosa* chez le patient atteint de mucoviscidose ? *Revue des maladies respiratoires.* 2003; 20 (2): 113-7.
- (198) Kernén Y, Sauty A, Roulet M. Détection et prise en charge précoce de la primo-infection à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients avec mucoviscidose. *Revue médicale suisse.* <http://revue.medhyg.ch/article.php3?sid=30073>, consulté le 30 avril 2013.
- (199) Li Puma J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23 (2): 299-323.
- (200) Millar FA, Simmonds NJ, Hodson ME. Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. *J Cyst Fibros.* 2009; 8 (6): 386-91.
- (201) Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest.* 2009; 136 (6): 1554-60.
- (202) Cystic Fibrosis Foundation. Patient registry – Annual data report 2010. <http://www.cff.org/UploadedFiles/LivingWithCF/CareCenterNetwork/PatientRegistry/2010-Patient-Registry-Report.pdf>, consulté le 26 octobre 2013.
- (203) Cramer N, Wiehlmann L, Tümmler B. Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300 (8): 526-33.
- (204) Döring G. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300 (8): 573-7.
- (205) Armstrong DS, Nixon GM, Carzino R, Bigham A, Carlin JB, Robins-Browne RM *et al.* Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166 (7): 983-7.
- (206) Feuillet-Fieux MN, Nguyen-Khoa T, Lorient MA, Kelly M, de Villartay P, Sermet I *et al.* Glutathione S-transferases related to *P. aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis children : preliminary study. *Clin Biochem.* 2009; 42 (1-2): 57-63.

- (207) Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW *et al.* *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros.* 2009; 8 (1): 66-70.
- (208) Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clone with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180 (2): 138-45.
- (209) Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Hoiby N. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *muca* and/or *lasR* mutants. *Microbiology.* 2010; 156 (4): 1108-19.
- (210) Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300 (8): 557-62.
- (211) Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL *et al.* Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol.* 2008; 190 (24): 7910-7.
- (212) Oliver A. Mutators in cystic fibrosis chronic lung infection: prevalence, mechanisms, and consequences for antimicrobial therapy. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300 (8): 563-72.
- (213) D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E, Smith EE *et al.* Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol.* 2007; 64 (2): 512-33.
- (214) Ferroni A, Guillemot D, Moumile K, Bernede C, Le Bourgeois M, Waernessyckle S *et al.* Effect of mutator *P. aeruginosa* on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2009; 44 (8): 820-5.
- (215) Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, De Long S, Hinz A *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol.* 2009; 191 (11): 3492-503.
- (216) Rodriguez-Rojas A, Oliver A, Blazquez J. Intrinsic and environmental mutagenesis drive diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections. *J Infect Dis.* 2012; 205 (1): 121-7.
- (217) Pagès L. Description des communautés bactériennes pulmonaires associées à la présence de *Pseudomonas aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose. Th D Pharm, Lyon 1; 2012.
- (218) Antonic V, Stojadinovic A, Zhang B, Izadjoo MJ, Alavi M. *Pseudomonas aeruginosa* induces pigment production and enhances virulence in a white phenotypic variant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist.* 2013; 6: 175-86.

- (219) Schelstraete P, Haerynck F, Van daele S, Deseyne S, De Baets F. Eradication therapy for *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by *P. aeruginosa*. *J Cyst Fibros*. 2013; 12 (1): 1-8.
- (220) Termoz A, Touzet S, Bourdy S, Decullier E, Bouveret L, Colin C *et al*. Effectiveness of home treatment for patients with cystic fibrosis: the intravenous administration of antibiotics to treat respiratory infections. *Pediatr Pulmonol*. 2008; 43 (9): 908-15.
- (221) Campodonico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med*. 2008; 14 (3): 120-33.
- (222) Durieu I, Nove Josserand R. La mucoviscidose en 2008. *La revue de médecine interne*. 2008; 29 (11): 901-7.
- (223) Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol*. 2010; 45 (4): 363-70.
- (224) Sermet-Gaudelus I, Le Bourgeois M, Edelman A, Lenoir G. Nouvelles thérapies dans la mucoviscidose en 2009. *Arch Pediatr*. 2009; 16 (6): 578-80.
- (225) King P, Lomovskaya O, Griffith DC, Burns JL, Dudley MN. In vitro pharmacodynamics of levofloxacin and other aerosolized antibiotics under multiple conditions relevant to chronic pulmonary infection in cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54 (1): 143-8.
- (226) Retsch-Bogart GZ, Quittner AL, Gibson RL, Oermann CM, McCoy KS, Montgomery AB *et al*. Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway *Pseudomonas* in cystic fibrosis. *Chest*. 2009; 135 (5): 1223-32.
- (227) Zemanick ET, Harris JK, Conway S, Konstan MW, Marshall B, Quittner AL *et al*. Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: opportunities and challenges to therapy. *J Cyst Fibros*. 2010; 9 (1): 1-16.
- (228) Alipour M, Suntres ZE, Halwani M, Azghani AO, Omri A. Activity and interactions of liposomal antibiotics in presence of polyanions and sputum of patients with cystic fibrosis. *PLOS one*. 2009; 4 (5): 1-9.
- (229) Meers P, Neville M, Malinin V, Scotto AW, Sardaryan G, Kurumunda R *et al*. Biofilm penetration, triggered release and *in vivo* activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61 (4): 859-68.
- (230) Tateda K, Comte R, Pechere JC, Köhler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45 (6): 1930-3.

- (231) Matson KL, Bratberg JP. Novel conjugate vaccine for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Drug development research*. 2007; 68 (8): 512-21.
- (232) Döring G, Meisner C, Stern M. A double-blind randomized placebo-controlled phase II study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagelle vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (26): 11020-5.
- (233) Campodonico VL, Llosa NJ, Grout M, Döring G, Maira-Litran T, Pier GB. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infection and immunity*. 2010; 78 (2): 746-55.
- (234) Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejaker PE, Kollberg H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2008; 43 (9): 892-9.
- (235) Nilsson E, Amini A, Wretling B, Larsson A. *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 856 (1-2): 75-80.
- (236) Essoh C, Blouin Y, Loukou G, Cablanmian A, Lathro S, Kutter E *et al*. The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients to bacteriophages. *PloS One*. 2013; 8 (4): 1-12.
- (237) Morello E, Sausseureau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, Debarbieux L. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS One*. 2011; 6 (2): 1-9.
- (238) Gorski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Lobočka M, Fortuna W *et al*. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009; 10 (8): 766-74.
- (239) Gill JJ, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010; 11 (1): 2-14.
- (240) Sulakvelidze A, Kutter E. Bacteriophage therapy in humans. In: Kutter E, Sulakvelidze A. *Bacteriophage: biology and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p.381-436.
- (241) Brüssow H. *Pseudomonas* biofilms, cystic fibrosis, and phage: a silver lining ? *mBio*. 2012; 3 (2): 1-3.
- (242) Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67 (6): 2746-53.
- (243) Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, Guinane CM, Martin JG, Shanahan F *et al*. Bacteriophages Φ MR299-2 and Φ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *mBio*. 2012; 3 (2): 1-10.

- (244) Gorski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Dabrowska K, Wierzbicki P, Ohams M *et al.* Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 2012; 83: 41-71.
- (245) Sepulveda-Robles O, Kameyama L, Guarneros G. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78 (12): 4510-5.
- (246) Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O *et al.* Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis.* 2010; 201 (7): 1096-104.
- (247) Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2001; 45 (3): 649-59.
- (248) Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2010; 28 (12): 591-5.
- (249) Kvachadze L, Balarjishvili N, Meskhi T, Tevdoradze E, Skhirtladze N, Pataridze T *et al.* Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens. *Microbial biotechnology.* 2011; 4 (5): 643-50.



SERMENT DE GALIEN

« 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 méprisée de mes confrères si j'y manque. »

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

BONNEL Claire

***Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2014, 178 p.

RESUME

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne. Chaque année, environ 200 nouveau-nés en sont touchés. Cette pathologie concerne une multitude d'organes : poumons, foie, pancréas, intestin grêle, peau, organes génitaux,... Une prise en charge pluridisciplinaire est donc indispensable. Les centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM) regroupent différentes spécialités médicales (médecins, kinésithérapeutes, pharmaciens, diététiciens, infirmières, psychologues) et permettent une prise en charge précoce.

Une mauvaise clairance mucociliaire engendre la survenue d'infections bactériennes, responsables d'une dégradation de la fonction pulmonaire et d'environ 90 % des décès chez les patients atteints de mucoviscidose. Parmi les espèces bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* sont plutôt retrouvés lors de l'enfance alors que *Pseudomonas aeruginosa* colonise préférentiellement les poumons à partir de l'adolescence.

L'infection à *Pseudomonas aeruginosa* est la plus problématique dans un contexte de mucoviscidose. En effet, l'infection devient chronique et cette bactérie met en place de nombreux mécanismes pour s'adapter à ce nouvel environnement et échapper à la fois aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antibiotiques.

La prise en charge thérapeutique repose sur l'antibiothérapie. *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant à de nombreuses molécules et ce phénomène s'amplifie constamment. Il est donc indispensable d'orienter les recherches sur d'autres cibles thérapeutiques. La mise au point d'inhibiteurs du « quorum sensing », le recours aux bactériophages ou à la vaccination font partie des nouvelles stratégies thérapeutiques qui apparaissent prometteuses.

MOTS CLES

Mucoviscidose
Pseudomonas aeruginosa
Infections pulmonaires
Antibiothérapie

JURY

M. FRENEY Jean, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne, Maître de Conférences des Universités -
Praticien Attachée
Mme FREYDIERE Anne-Marie, Biologiste, Docteur en Pharmacie
Mlle PAGES Laurence, Docteur en Pharmacie
M. REIX Philippe, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

Mercredi 22 janvier 2014

ADRESSE DE L'AUTEUR

957, route de Tarévioux – 42800 GENILAC