Validation de l'identification des Pseudomonas sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques

Céline Tournus

▶ **To cite this version:**

Céline Tournus. Validation de l'identification des Pseudomonas sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01495190

HAL Id: dumas-01495190

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01495190

Submitted on 24 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN

UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2016 N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2016

par

Céline TOURNUS

Né(e) le 18 mai 1989 à LYON 3ème

Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques

Directeur : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Président du jury : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Membres du jury : Monsieur le Docteur Ludovic LEMEE

Madame le Professeur Véronique MERLE

Madame le Docteur Michèle NOUVELLON

Madame le Docteur Stéphanie ROCHON-EDOUARD

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

Professeur Stéphane MARRET

I - **MEDECINE**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques **BENICHOU**	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul **BESSOU**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART** *(surnombre)*	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
Mr François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe **CHASSAGNE**	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
Mr Pierre **CZERNICHOW**	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mme Danièle **DEHESDIN** *(surnombre)*	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric **DI FIORE**	CB	Cancérologie
Mr Fabien **DOGUET**	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire

Mr Jean **DOUCET**	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
Mr Philippe **DUCROTTE**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric **DURAND**	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
Mr Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
Mr Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel **GODIN** *(surnombre)*	HB	Néphrologie
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mr Philippe **GRISE** *(surnombre)*	HCN	Urologie
Mr Dominique **GUERROT**	HCN	Néphrologie
Mr Olivier **GUILLIN**	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie
Mr Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal **JOLY**	HCN	Dermato - Vénéréologie
Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie **LEROI**	HCN	Physiologie
Mr Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves **LITZLER**	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand **MACE**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David **MALTETE**	HCN	Neurologie
Mr Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle **MARIE**	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul **MARIE**	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique **MERLE**	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Jean-François **MUIR**	HB	Pneumologie
Mr Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
Mr Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
Me Gaëtan **PREVOST**	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard **PROUST**	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)*	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace **ROMAN**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato-gastrologie
Mme Céline **SAVOYE–COLLET**	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale **SCHNEIDER**	HCN	Pédiatrie
Mr Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Réanimation Médicale
Mr Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
Mr Christian **THUILLEZ**	HB	Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier **TROST**	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER**	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre **VERA**	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric **VERIN**	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
Mr Jacques **WEBER**	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie
Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS**	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Physiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie **DERREY**	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
Mr Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mme Rachel **MARION-LETELLIER**	UFR	Physiologie
Mr Thomas **MOUREZ**	HCN	Virologie
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Christine **RONDANINO**	UFR	Physiologie de la Reproduction
Mr Mathieu **SALAUN**	HCN	Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique **LANIEZ**	UFR	Anglais
Mr Thierry **WABLE**	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacologie
Mr Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre **GOULLE** (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET**	Physiologie
Mme Christelle **MONTEIL**	Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
Mr Rémi **VARIN** (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy **BELLIEN**	Pharmacologie
Mr Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie
Mme Camille **CHARBONNIER**	Statistiques
Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mme Cécile **CORBIERE**	Biochimie
Mr Eric **DITTMAR**	Biophysique
Mme Nathalie **DOURMAP**	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUC**	Pharmacologie
Mme Dominique **DUTERTE- BOUCHER**	Pharmacologie

Mr Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
Mr François **ESTOUR**	Chimie Organique
Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla **GHARBI**	Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT**	Botanique
Mr Hervé **HUE**	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF**	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie
Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mme Tiphaine **ROGEZ-FLORENT**	Chimie analytique
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ**	Pharmacie officinale
Mr Jean-François **HOUIVET**	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**	Anglais

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Sandrine **DAHYOT**	Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Souleymane **ABDOUL-AZIZE**	Biochimie
Mme Hanane **GASMI**	Galénique
Mme Caroline **LAUGEL**	Chimie organique
Mr Romy **RAZAKANDRAINIBE**	Parasitologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
Mr Roland **CAPRON**	Biophysique
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth **CHOSSON**	Botanique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacodynamie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mr François **ESTOUR**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mr Rémi **VARIN**	Pharmacie clinique
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL**	UFR	Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**	UFR	Médecine Générale
Mr Philippe **NGUYEN THANH**	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET**	UFR	Médecine générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD**	UFR	Médecine générale
Mme Yveline **SEVRIN**	UFR	Médecine générale
Mme Marie Thérèse **THUEUX**	UFR	Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul **MULDER** (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su **RUAN** (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079**)**
Mme Carine **CLEREN** (med)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline **GAILDRAT** (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas **GUEROUT** (med)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric **PASQUET**	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle **TOURNIER** (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle	*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*
CB - Centre Henri Becquerel	*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*
CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation	*SJ – Saint Julien Rouen*

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Martine Pestel-Caron, président du jury et directrice de thèse
Merci de m'avoir témoigné votre confiance en acceptant d'encadrer ce travail.
Vos conseils et orientations m'ont été très précieuses.
Merci pour le soutien dont vous avez fais preuve à mon égard lors de mes stages dans votre service.
Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Ludovic Lemée, membre du jury
Merci pour votre aide immense dans la réalisation de ce travail et votre disponibilité constante. Merci pour votre dynamisme, disponibilité et tout ce que vous m'avez appris au quotidien au laboratoire de microbiologie.
Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Véronique Merle, membre du jury
Je suis honorée de vous compter dans le jury de cette thèse.
Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Michèle Nouvellon, membre du jury
Merci d'apporter vos connaissances à la critique de ce travail, que n'aurai pas pu réaliser sans vous. Votre aide et vos conseils avisés m'ont été précieux. Votre présence parmi les membres de notre jury nous honore.

A Madame le Docteur Stéphanie Rochon-Edouard, membre du jury
Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous porterez à cette thèse.

A toute l'équipe du laboratoire d'hygiène du CHU,
Aux deux Christine, Edwige, Fabienne, Lise, Maude, Patricia, pour m'avoir aidé à réaliser ce travail. Votre collaboration m'a été très précieuse, vos connaissances m'ont enrichies.
Merci pour votre sympathie durant ces quelques mois auprès de vous.

A toute l'équipe du laboratoire de microbiologie du CHU,
J'ai adoré travailler avec vous. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.
Merci à Marie-Andrée, Estelle et Cindy pour m'avoir aidé à réaliser ce travail.
Merci particulier à Lucie pour les bons moments passés ensemble.
Merci particulier à Sandrine pour tes conseils.

A Vincent Cattoir et Michel Auzou pour m'avoir transmis la passion de la Microbiologie

A toute l'équipe du laboratoire du centre Henri Becquerel, j'ai passé un semestre très agréable avec vous

A toute l'équipe du laboratoire du centre hospitalier de Dieppe, j'ai énormément appris à vos côtés. Merci pour votre soutien et compréhension pendant la réalisation de ce travail.

A mes premiers co-internes rouennais, Ana, Benardt, Coombs, Gaga et Valentini : merci pour avoir égayé mes six premiers mois à Rouen, ce semestre était vraiment un plaisir quotidien !

A tous mes co-internes,

Merci pour ces deux ans agréables à vos côtés.

Merci particulier à Charline pour ta bonne humeur et ton intégrité ! Merci à Cédric pour ta mauvaise humeur, ton sens de l'humour et toutes les bonnes soirées qu'on a passé ensemble ! Merci à Anaïs, pour ton écoute et ton soutien quotidien, j'en ai passé du temps dans ton bureau… Merci à Maud, Florian et Jenifer, Aurélien, Julien, …

A ma famille,

A ma sœur Magali, tu es mon modèle, ma sist' préférée, je veux qu'on garde toujours cette proximité et ces moments uniques ! Sois sûre de mon amour et ma bienveillance constante.

A mes parents, vous m'avez transmis de belles valeurs et m'avez permis de mener à bout des études pour faire un travail qui me passionne et me stimule tous les jours, trouvez ici toute ma reconnaissance et mon amour.

Papa, je t'entends déjà dire que c'est parce que tu m'as conduit à la fac en première année que j'en suis arrivé là !

A Ismael, pour ce soutien, immense, dans tout ce que j'entreprends. Parce que ta présence, c'est joli. Je suis prête à prendre soin de toi pour tes prochaines thèses ☺ Amour toujours.

Merci à Pascale, Jean-Pierre, Marion et Guillaume pour leur présence constante.

A ma belle famille, pour les bons moments partagés, une jolie famille qui va s'agrandir…

A André et Yvette pour m'avoir transmis le goût de la réflexion et de la curiosité.

A Paulette, pour tout l'amour que tu m'as donné.

A mes amis,

Amélie et Marine, vous êtes mes deux plus vieilles amies, merci pour votre fidélité ! Je suis fière qu'on en soit arrivées là. Marine, on a de beaux évènements à venir… Amélie, merci pour ta présence dans les moments importants.

Camille et Alexia, c'est toujours un plaisir de vous avoir avec moi après toutes ces années.

Mes ami(e)s du lycée, vous êtes beaux ! J'ai peur de vieillir mais pas si c'est avec vous.

Elsa et les prochaines meilleures soirées de ta vie à venir avec moi, merci pour toutes les fois où tu m'aides à croire en moi. Blanblan, ta bonne humeur permanente, ton entrain, je suis impressionnée par tout ce que tu fais ! Léa merci pour tout ce que tu nous apprends ! Pour tout ce qu'on a vécu toutes les deux, ensemble. Damien : merci d'exister, ta pertinence, ton humour, nos danses, tu serais parfait si t'aimais moins les potins. A Camille, si loin, j'espère qu'on réussira à t'avoir à nouveau, Bryan, Thib, Armand, Chloé, si douce et patiente. Seb, tu nous fais toujours autant rire. Gégé, Bruno, Bono et Rémoute, notre 2ème papa.

A mes gouloums d'amour,

On s'amuse tellement ensemble ! Merci pour tous les moments gouloums et tant d'autres à venir. Léa, tu as mis la barre haute, je suis très fière de toi. Clem, batwoman et notre soutien mutuel de si loin, tu nous manques. Ségo, petite perle de réussite intrépide. Martin, tremblotin, maintenant à ton tour, et un choco-calin pour fêter ça. Claire, j'espère que tu ne nous remplaceras pas avec Loïc et Bénédicte. Jean, merci pour ton sens de l'humour et les moments « craquage ». Baptou, notre guide à tous. Mick, en secret je sais qu'un jour on reformera la Mick-team.

A tous les copains du groupe 2 : pour les bons moments qu'on a passé à la fac et après !

Dom, Thibalt, Emilie et Matt, Chloé et Alex, Isaure et Cédric, Véro, Justine, Clem, Fatou, Flou et Amélie. Hâte de créer une belle antenne groupe 2 parisienne.

A mes caennais de cœur ou d'adoption :

Meggie parce que tu m'as sauvée et j'aime quand on rentre en trottinette alors que c'était pas prévu. Charlotte et Rémi, les yeux dans les bleus avec un verre de mauvais rosé, un cheval à la mer,… vous êtes vraiment un couple original que j'affectionne particulièrement ! Tiphaine a.k.a Doc Daniel, tu vas enfin pouvoir m'appeler Doc Tournus, merci pour ta gentillesse, je te souhaite le meilleur, vraiment. Lilian, tout brillant comme tes pierres ! Basou trop hâte de te retrouver à Paris ! Simon et Blandine, vous êtes généreux comme des goulibeurs et chaleureux comme un bon café, merci. Isabelle, la grande témoin de cette thèse : merci pour ton aide au quotidien pendant ces six mois, ça y'est on y est arrivées !

A vous trois : Jules, Lou et Titia, même si je sais que vous me préférez dans un autre style d'écriture…

PLAN DE THESE

TABLE DES TABLEAUX **17**

TABLE DES FIGURES **20**

LISTE DES ANNEXES **22**

LISTE DES ABBREVIATIONS **23**

INTRODUCTION **25**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **27**

I. Méthodes d'identification bactérienne **27**

1. Méthodes d'identification phénotypique 27

1) Tests d'orientation classiques 27

1.1. Examens microscopiques 27

1.2. Caractères culturaux 28

2) Identification biochimique 28

2.1. Tests d'orientation 28

2.2. Identification manuelle ou semi-automatisée 28

2.3. Identification automatisée 30

3) Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF 31

2. Méthodes d'identification génotypique 38

1) PCR spécifique d'espèce 38

2) Séquençage nucléotidique d'un amplicon 38

2.1. ADNr 16S 40

2.2. Autres gènes 41

II. Les bactéries du genre *Pseudomonas* **42**

1. Classification 42

2. Principales caractéristiques bactériologiques 45

3. Habitat 46

4. Pathogénicité 47

1) Pathogénicité végétale et animale 47

2) Pathogénicité humaine 49

2.1. Facteurs de virulence 50

2.2. Manifestations cliniques 52

5. Méthodes d'identification 55

1) Phénotypiques 55

1.1. Caractères culturaux 55

1.2. Identification biochimique 56

1.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF 59
2) Moléculaires 63
2.1. ADNr16S 63
2.2. *opr*F 64
2.3. rpoD 65
2.4. *rpoB* 65
2.5. *oprI* 66
2.6. *gyrB* 66
2.7. *oprD* 66
3) Comparaison des méthodes d'identification phénotypiques et moléculaires (séquençage de l'ADNr 16S) 66
4) Apport du séquençage d'autres gènes à l'identification bactérienne 68
6. Profil de sensibilité aux antibiotiques 70
7. Profil de sensibilité aux désinfectants 75
III. Le dossier de validation de méthode 75
TRAVAIL PERSONNEL 78
OBJECTIFS DE L'ETUDE 78
MATERIEL ET METHODES 79
I. Validation de méthode de l'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF 79
1. Principe de la méthode 79
2. Souches étudiées 79
3. Maîtrise des risques 80
4. Validation technique : évaluation des performances de la méthode 82
1) Répétabilité 82
2) Fidélité intermédiaire 82
3) Variabilité inter-opérateurs 82
4) Sensibilité et spécificité analytique 82
5) Incertitude de mesures 82
6) Contamination 83
7) Robustesse et stabilité des réactifs 83
8) Comparaison de méthodes 83
II. Caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa* 84
1. Souches étudiées 84
2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF 85
3. Identification moléculaire par séquençage 85

1) Extraction 85
2) Amplification ADNr16S 86
3) Amplification *rpoD* 86
4) Séquençage nucléotidique 87
4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose 88

RESULTATS 90

I. Validation de méthode de l'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF 90

1. Maîtrise des risques 90
2. Validation technique : évaluation des performances de la méthode 90
1) Répétabilité 90
2) Fidélité intermédiaire 91
3) Variabilité inter-opérateurs 92
4) Incertitude de mesures 92
5) Contamination 92
6) Robustesse et stabilité des réactifs 92
7) Comparaison de méthodes 93
7.1. Identification moléculaire par séquençage 93
7.2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF 98
7.3. Etude des concordances 101

II. Caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa* 103

1. Souches étudiées 103
1) Souches environnementales 103
2) Souches cliniques 105
2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose 107

DISCUSSION 112

I. Validation de méthode de l'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF 112

1. Identification moléculaire 112
2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF 116
3. Etude des concordances 118

II. Caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa* 120

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 124

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 143

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Table de lecture de l'API20NE, bioMérieux®

Tableau 2 : Correspondance des scores avec l'automate Bruker®

Tableau 3 : Description des indices de confiance

Tableau 4 : Exemple d'un résultat détaillé d'identification d'un *Pseudomonas* du groupe *putida* présentant les dix MSP proposés

Tableau 5 : Exemple d'un résultat détaillé d'identification d'un *Pseudomonas aeruginosa* présentant les dix MSP proposés

Tableau 6 : Exemples d'indices de références

Tableau 7 : Classification des *Pseudomonaceae* selon Palleroni et Doudoroff

Tableau 8 : Espèces de *Pseudomonas* sp. appartenant aux groupes fluorescent et non fluorescent

Tableau 9 : Principaux pigments non fluorescents produits selon les espèces de *Pseudomonas* sp.

Tableau 10 : Caractéristiques et pouvoir pathogène (autre qu'en clinique humaine) pour les principales espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa*

Tableau 11 : Phytotoxines produites par *P. tolaasii* et les différents pathovars de *P. syringae*

Tableau 12 : Phytopathogénicité selon les différents pathovars de *Pseudomonas syringae*

Tableau 13 : Facteurs de virulence potentiels d'espèce de *Pseudomonas* sp.

Tableau 14 : Implication de différentes espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa* en pathologie humaine

Tableau 15 : Pourcentages d'identification au rang de l'espèce, d'identification au rang du genre et d'échec d'identification selon les méthodes utilisées (séquençage de l'ADNr 16S, API 20NE ou Vitek 2, bioMérieux®) pour 107 isolats de bacilles à gram négatif non fermentant

Tableau 16 : Comparaison des identifications obtenues par séquençage de l'ADNr 16S avec celles obtenues par API 20 NE et Vitek 2, bioMérieux®

Tableau 17 : Espèces de *Pseudomonas* sp. présentes dans la base de données MALDI-TOF Bruker biotyper®

Tableau 18 : Espèces de *Pseudomonas* sp. présentes dans la base de données MALDI-TOF Vitek MS bioMérieux®

Tableau 19 : Comparaison de la méthode d'identification BD Phoenix® et MALDI-TOF MS (Bruker®) pour les *Pseudomonas* sp.

Tableau 20 : Comparaison des méthodes d'identification par spectrométrie de masse Bruker® et Vitek MS, bioMérieux® par rapport à l'identification conventionnelle biochimique ou moléculaire

Tableau 21 : Identification des souches de *Pseudomonas* sp. par API20NE, Vitek2 (bioMérieux®) et MALDI-TOF MS (Bruker®)

Tableau 22 : Comparaison de trois méthodes d'identification : spectrométrie de masse MALDI-TOF, identification biochimique semi-automatisée et identification génomique par séquençage de l'ADNr16S

Tableau 23 : Profil de résistance aux antiobiotiques testés selon les espèces de *Pseudomonas* sp.

Tableau 24 : Carbapénémases isolées chez des espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa*

Tableau 25 : Performances à évaluer lors d'une vérification (portée A) /validation de méthode (portée B)

Tableau 26 : Portée d'accréditation pour l'analyse « identification de germes bactériens »

Tableau 27 : Souches ATCC utilisées pour la validation de méthode de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Tableau 28 : Séquences des amorces pour la PCR 16S1/5

Tableau 29 : Séquences des amorces pour la PCR *rpoD*

Tableau 30 : Diamètres critiques et charge de disques utilisés pour les quatorze molécules testées lors d'antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé, selon les recommandations du CASFM-EUCAST 2016

Tableau 31 : Scores obtenus pour les 10 dépôts des 7 souches ATCC par le même expérimentateur à partir de colonies de 18H sur gélose au sang

Tableau 32 : Scores obtenus pour les 7 souches ATCC par les 5 opérateurs différents dans les conditions standard (culture sur gélose au sang en 18h)

Tableau 33 : Moyenne ou détail des scores (lorsque 1 ou 2 scores sont inférieurs à 2) pour chaque souche ATCC en fonction des milieux et des délais d'incubation testés

Tableau 34 : Concordance et non concordance d'identification au rang de groupe pour les 5 bases de données

Tableau 35 : Pourcentage de concordance d'identification au rang de groupe et d'espèce entre les trois bases de données

Tableau 36 : Pourcentage de concordance d'identification au rang d'espèce entre les trois bases de données

Tableau 37 : Identification de 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage des fragments de l'ADNr 16S et de *rpoD*

Tableau 38 : Comparaison des concordances genre/espèce/groupe entre l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF et l'identification par technique génotypique (séquençage des fragments de l'ADNr 16S et *rpoD*) pour les 85 souches incluses dans l'étude

Tableau 39 : Origine géographique des souches environnementales de *Pseudomonas* sp. incluses dans l'étude

Tableau 40 : Nombre de prélèvements réalisés et de souches de *Pseudomonas* sp. isolées selon les sites hospitaliers

Tableau 41 : Répartition des groupes/espèces de *Pseudomonas* sp. inclus dans l'étude par site d'origine

Tableau 42 : Analyse des phénotypes de résistance de 43 souches de *Pseudomonas* sp.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Colonies pigmentées de *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 2 : Galerie d'identification API20NE, bioMérieux® d'un *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 3 : Schéma simplifié des étapes d'identification par l'automate Vitek 2, bioMérieux®

Figure 4 : Automate de spectrométrie de masse Microflex (Bruker daltonics®)

Figure 5 : Cible réutilisable pour la technique MALDI-TOF

Figure 6 : Spectre de masse MALDI-TOF d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* non productrice de métallo-bêta-lactamase

Figure 7 : Etapes de l'identification bactérienne par MALDI-TOF

Figure 8 : Exemple de résultat d'identification par MALDI TOF (Bruker®) d'un *Pseudomonas* appartenant au groupe *fluorescens*

Figure 9 : Schéma illustrant la technique de séquençage selon Sanger

Figure 10 : Schéma représentant la grande sous-unité (50S) et la petite sous-unité (30S) d'un ribosome bactérien

Figure 11 : Alternance de séquence conservées et variables/hypervariables sur le gène ADNr 16S

Figure 12 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences des gène *hsp65* et ADNr 16S

Figure 13 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène ADNr 16S

Figure 14 : Coloration de Gram d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 15 : Schéma simplifié du support génétique de la résistance aux antibiotiques chez une souche de *P. putida*

Figure 16 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'un fragment du gène *rpoD* pour les 85 souches étudiées et enraciné de séquences-types

Figure 17 : Discordance de l'identification à l'espèce de trois espèces très proches phylogénétiquement *P. oleovorans/P. pseudoalcaligenes/P. mendocina*.

Figure 18 : Identification d'un *P. mendocina* avec score=2,29 (A++)

Figure 19 : Identification d'un *P. mendocina* avec score=2,09 (B++)

Figure 20 : Identification d'un *P. mendocina* avec score=1,98 (B+)

Figure 21 : Bilan de l'identification de 107 souches environnementales de *Pseudomonas* sp. par différentes méthodes phénotypiques et moléculaires

Figure 22 : Groupes d'espèces de *Pseudomonas* sp. représentés dans l'étude

Figure 23 : Antibiogramme obtenu au cours de ce travail pour une espèce multi-sensible
Figure 24 : Pourcentage de souches de *Pseudomonas* sp. résistantes pour chaque molécule testée
Figure 25 : Pourcentage de souches résistantes de *Pseudomonas* sp. pour chaque molécule testée en différenciant les souches cliniques (n=12) des souches environnementales (n=74)
Figure 26 : Pourcentage de souches résistantes de *Pseudomonas* sp. pour chaque molécule testée en différenciant les souches cliniques (n=12) des souches environnementales (n=74)
Figure 27 : Pourcentage de résistance aux molécules antibiotiques selon les groupes d'espèces
Figure 28 : Absence de restauration de la sensibilité à la ceftazidime et au meropénème par diffusion en gélose en présence de 2000 mg/L de cloxacilline

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques et niches écologiques des principales espèces de *Pseudomonas* sp.

Annexe 2 : Classification et lien phylogénétique des *Pseudomonas* sp. établis à partir des séquences du gène ADNr 16S

Annexe 3 : Similarité et distances entre les séquences d'ADNr 16S pour les différentes espèces du genre *Pseudomonas* sp.

Annexe 4 : SH FORM 43 Fiche type de vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Annexe 5 : Identification des 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp. par séquençage des fragments de l'ADNr 16S et de *rpoD*

Annexe 6 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'un fragment du gène ADNr 16S pour les 85 souches étudiées aggrémenté de séquences-types

Annexe 7 : Identification des 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp par technique phénotypique classique et par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Annexe 8 : Logigramme de validation des identifications de *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Rouen

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

API : Appareillage et Procédé d'Identification

ATCC : American Type Culture Collection

BIBI : Bio Informatic Bacterial Identification

BTS : Bacterial Test Standard

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CE : Conforme aux Exigences

CFC : Céphalosporine/ Fucidine/ Cetrimide

CH : Centre Hospitalier

CHSR : Centre Hospitalier de Saint Etienne du Rouvray

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIP : Collection Institut Pasteur

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

DHB : acide 2,5-hydroxybenzoïque

ERIC-PCR : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

ESS : Eau pour Soins Standards

EBM : Eau Bactériologiquement Maîtrisée

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GS : Gélose au Sang

GTA : Guide Technique d'Accréditation

HCCA : Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique

ITS : Internal Transcribed Spacer.

IVD : In Vitro Diagnostic

KPC : *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénèmase

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MBL : Métallo-BétaLactamase

MLSA : MultiLocus Sequence Analysis

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MSP : Main Spectra Profile

OMP : Outer Membrane Protein

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RPM : Rotation Par Minute

SAQ : Système d'Assurance Qualité

SISE : Système d'Information en Santé Environnement

SLS : Sample Loading Solution

SM : Spectrométrie de Masse

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

TOF : Time-of-Flight

TSA : Trypto-caséine Soja Agar

UCP : Unité Centrale de Production

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra-Violet

VIM : Verona Integron-encoded Métallo-béta-lactamase

INTRODUCTION

L'eau est un réservoir important de bactéries qui peuvent être à l'origine de contamination ou des vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques. La maîtrise de la qualité de l'eau est importante dans les établissements de santé. La législation exige via l'arrêté du 14 mars 2007 l'absence de *Pseudomonas aeruginosa* dans 250 mL d'eaux conditionnées. Mais aucune limite n'est fixée pour les autres espèces appartenant au genre *Pseudomonas* [1, 2].

Dans les eaux destinées à la consommation humaine non conditionnées, il n'existe aucun taux limite pour tous les *Pseudomonas* sp. (y compris *P. aeruginosa*). Néanmoins, en milieu hospitalier une limite a été définie [3]. Pour les eaux de soin standard (ESS), le niveau seuil est < 1 Unité Formant Colonie (UFC)/100mL pour *P. aeruginosa* et $\leq 10^2$ UFC/100mL pour les *Pseudomonas* sp. Pour les eaux bactériologiquement maîtrisées (EBM), le niveau seuil est < 1 UFC/mL pour *Pseudomonas aeruginosa* et ≤ 1 UFC/mL pour les *Pseudomonas* sp. D'autre part, dans le suivi de la qualité microbiologique des endoscopes, le seuil acceptable est < 1 UFC de *Pseudomonas* sp./canal [3].

Le laboratoire d'hygiène hospitalière est au centre des processus mis en place pour garantir la qualité des eaux hospitalières. Les conditions de culture et d'identification des espèces du genre *Pseudomonas* sont donc particulièrement importantes à maîtriser pour le laboratoire d'hygiène hospitalière. L'identification de colonies de *Pseudomonas* sp. par des techniques innovantes comme la spectrométrie de masse ou le séquençage de gènes permet d'étudier et de comprendre l'épidémiologie environnementale du genre *Pseudomona*s sp. en lien avec le réseau d'eau hospitalier. Le laboratoire est impliqué dans la mise en place de la norme NF EN ISO 15189. Pour ces techniques innovantes de spectrométrie de masse, l'utilisation de protocoles différents de ceux recommandés par le fournisseur impose une validation de méthode en portée B flexible.

De plus, peu de données sont connues quant au profil de résistance des souches de *Pseudomonas* non *aeruginosa*. L'étude des mécanismes et du caractère transférable de la résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas* d'origine hydrique est donc un enjeu important pour l'évaluation des risques en milieu hospitalier.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail a été de réaliser la validation de méthode en portée B flexible de l'identification bactérienne de souches de *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant comme méthode de référence l'identification moléculaire par séquençage de gènes.

Pour cela, nous avons caractérisé une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* sp. dont nous avons étudié dans un deuxième temps la sensibilité aux antibiotiques.

- Une première partie de ce manuscrit est consacrée :
    - à la revue des données bibliographiques en matière d'identification bactérienne et concernant les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* (espèces autres qu'*aeruginosa*).
    - à la constitution d'un dossier de validation de méthode

- La deuxième partie est dédiée à notre travail personnel avec la description de la méthodologie mise en œuvre suivi de la présentation et de la discussion des résultats obtenus.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Méthodes d'identification bactérienne

En bactériologie clinique, l'identification bactérienne est primordiale. On peut en déduire le pouvoir pathogène de la bactérie et évaluer son implication potentielle dans le processus infectieux en cours. La connaissance des résistances naturelles de l'espèce identifiée permet d'orienter rapidement la thérapeutique et de tester la sensibilité aux antibiotiques reconnus comme habituellement actifs sur cette bactérie.

Les méthodes d'identification bactérienne peuvent être classées en deux groupes : les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques.

1. Méthodes d'identification phénotypique

1) Tests d'orientation classiques

Les tests d'orientation classiques sont des tests rapides réalisables à partir d'un produit pathologique ou directement à partir de la colonie bactérienne. Ils servent d'orientation diagnostique et aident à choisir la technique d'identification.

1.1. Examens microscopiques

L'examen microscopique peut se faire soit à l'état frais, soit après une coloration.

L'observation d'un produit pathologique ou d'une culture en milieu liquide entre lame et lamelle permet de réaliser un état frais. Le but est d'apprécier la forme, le mode de groupement et la mobilité bactérienne. Certaines espèces bactériennes sont dites mobiles c'est à dire qu'elles peuvent se déplacer de manière autonome en plus des mouvements Browniens. Il existe différents types de mobilité permettant de les distinguer entre elles.

L'examen microscopique après coloration de Gram repose sur une méthode de coloration au violet de gentiane ou cristal violet puis une décoloration à l'alcool et enfin une contre-coloration à la safranine ou fuchsine. Cette méthode permet de distinguer, en utilisant les propriétés de la paroi bactérienne, les bactéries à Gram positif (couche épaisse de peptidoglycane) des bactéries à Gram négatif (fine couche de peptidoglycane surmontée d'une membrane externe). Elle permet aussi d'apprécier la forme de la bactérie (coques ou bacilles) [4].

1.2. Caractères culturaux

Après une étape de culture en étuve, on observe l'aspect des colonies : taille, couleur et/ou pigmentation, forme, contours, odeur, hémolyse, consistance et/ou adhérence. Ces caractéristiques permettent d'orienter vers un diagnostic d'espèce. Par exemple, l'odeur de seringat et la présence de pigments (pyocyanine, pyoverdine) sont caractéristiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 1).

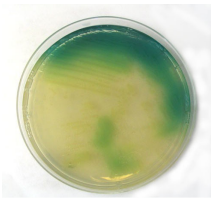


Figure 1 : Colonies pigmentées de Pseudomonas aeruginosa [5]

La détermination du type respiratoire oriente l'identification bactérienne. Il peut être aérobie strict, anaérobie strict, aéro-anaérobie préférentiel, anaérobie-aéro tolérant et micro-aérophile [4].

2) Identification biochimique

2.1. Tests d'orientation

Différentes caractéristiques biochimiques sont explorées telles que la production de catalase, cytochrome oxydase, nitrate réductase, l'étude du métabolisme glucidique, etc [6]. Ces tests d'orientation sont nécessaires avant de réaliser une identification manuelle (galeries API, bioMérieux®) ou automatisée (Vitek2, bioMérieux®, BD Phoenix®, etc.). Ils permettent de distinguer des groupes bactériens entre eux. Par exemple, parmi les bacilles à Gram négatif, la production d'une cytochrome oxydase permet de différencier les entérobactéries de *P. aeruginosa*.

2.2. Identification manuelle ou semi-automatisée

Les industriels ont commercialisé des galeries d'identification telles que les galeries API (bioMérieux®). Ces dernières sont constituées d'alvéoles contenant des substrats déshydratés dans lesquels on distribue une suspension bactérienne de densité standardisée. L'inoculation de la galerie peut-être manuelle ou automatique à l'aide d'un inoculateur. Les réactions produites se traduisent par la détection d'une croissance bactérienne ou bien des virages colorés, spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs (Tableau 1).

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
NO_3	potassium nitrate	0.136	reduction of nitrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min colorless	pink-red
			reduction of nitrates to nitrogen	Zn / 5 min pink	colorless
TRP	L-tryptophane	0.2	indole production (TRyptoPhane)	JAMES / immediate colorless pale green / yellow	pink
GLU	D-glucose	1.92	fermentation (GLUcose)	blue to green	yellow
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	yellow	orange / pink / red
URE	urea	0.76	UREase	yellow	orange / pink / red
ESC	esculin ferric citrate	0.56 0.072	hydrolysis (β-glucosidase) (ESCulin)	yellow	grey / brown / black
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
PNPG	4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-NitroPhenyl-ßD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow
GLU	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	transparent	opaque
ARA	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	transparent	opaque
MNE	D-mannose	1.4	assimilation (ManNosE)	transparent	opaque
MAN	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	transparent	opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	assimilation (N-Acetyl-Glucosamine)	transparent	opaque
MAL	D-maltose	1.4	assimilation (MALtose)	transparent	opaque
GNT	potassium gluconate	1.84	assimilation (potassium GlucoNate)	transparent	opaque
CAP	capric acid	0.78	assimilation (CAPric acid)	transparent	opaque
ADI	adipic acid	1.12	assimilation (ADIpic acid)	transparent	opaque
MLT	malic acid	1.56	assimilation (MaLaTe)	transparent	opaque
CIT	trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)	transparent	opaque
PAC	phenylacetic acid	0.8	assimilation (PhenylACetic acid)	transparent	opaque
OX	(see oxidase test package insert)	-	cytochrome oxidase	(see oxidase test package insert)	

Tableau 1 : Table de lecture de l'API 20NE, bioMérieux® [7]

Les données sont traduites en un profil numérique à onze chiffres. L'interprétation se fait ensuite soit manuellement à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification soit de manière semi-automatisée (instruments ATB expression ou mini API). Les délais d'incubation vont de 4 à 48 heures en moyenne [7]. Le profil est comparé à ceux de la base de données et un pourcentage est accordé à l'identification : plus ce pourcentage est proche de 100%, plus l'identification est fiable, proche du profil type de l'espèce.

Par exemple, la galerie API 20NE (bioMérieux®) a été conçue pour permettre l'identification des bacilles à gram négatifs (BGN) hormis les entérobactéries et BGN non fastidieux. Elle comporte 20 microtubes contenant des milieux et substrats déshydratés tels que les nitrates, l'urée, l'esculine, la gélatine, le L-tryptophane, etc. Elle teste par ailleurs l'assimilation de 12 sucres (Figure 2, Tableau 1).

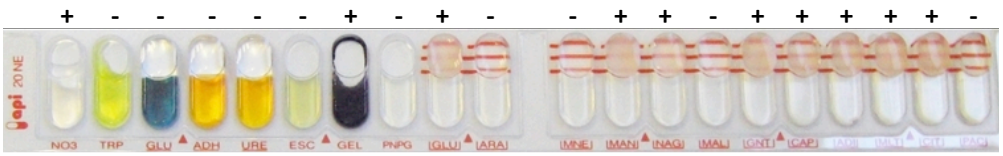


Figure 2 : Galerie d'identification API20NE, bioMérieux® d'un *Pseudomonas aeruginosa* [8]

Il existe aussi la galerie API/ID32GN qui contient 32 cupules de substrats carbonés déshydratés dédiés à l'identification des BGN (entérobactéries ou non).

2.3. Identification automatisée

Des systèmes automatisés (Vitek2 bioMérieux®, BD Phoenix®, etc.) permettent, à partir d'une suspension bactérienne de densité standardisée, d'automatiser l'inoculation, l'incubation, la lecture et l'interprétation des tests. Il existe différentes cartes selon la famille de germes à identifier. Chaque carte de test est une carte en plastique remplie de milieux spécifiques déshydratés contenus dans un maximum de 64 puits individuels. Les résultats obtenus entre 3 et 18 heures sont ensuite comparés à la base de données informatisée et l'identification est rendue avec un score de fiabilité exprimé en pourcentage [9] (Figure 3).

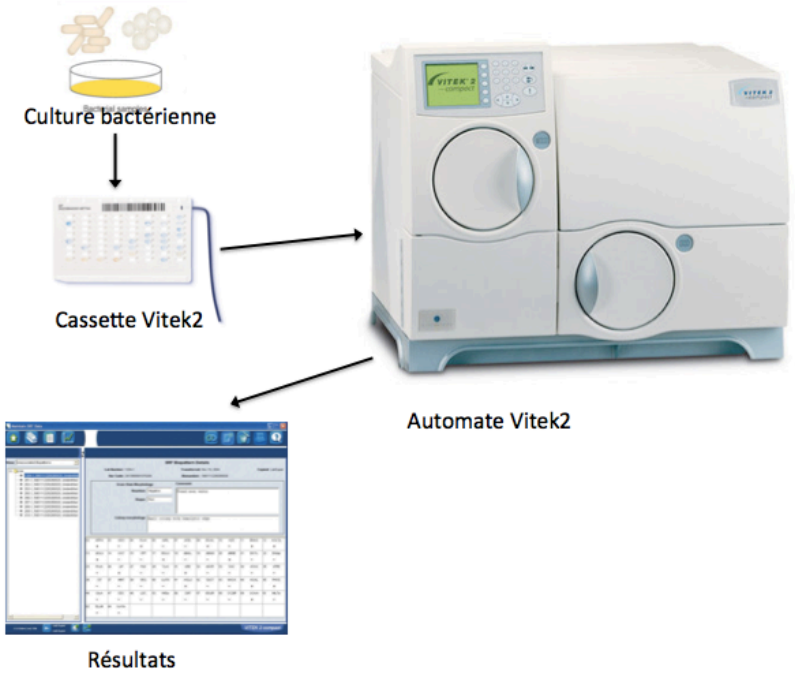


Figure 3 : Schéma simplifié des étapes d'identification par l'automate Vitek 2, bioMérieux®

3) Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les méthodes de spectrométrie de masse reposent sur la détermination du rapport masse sur charge de molécules qui permet de les identifier et de les quantifier. Depuis la seconde moitié du XXème siècle, elles ont un large champ d'applications en pharmacologie, biochimie, toxicologie, etc. [10]

Depuis 2009, des développements de cette méthode ont permis son utilisation dans le domaine de la bactériologie.

La spectrométrie de masse par technique MALDI-TOF (Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization - time of flight ou temps de vol) associant une source MALDI avec un analyseur TOF est devenue un outil majeur d'identification bactérienne dans les laboratoires de microbiologie. Actuellement, trois systèmes utilisant cette technique sont commercialisés en France par les firmes Andromas®, Bruker daltonics® (Figure 4) et bioMérieux®. Cette technique permet l'analyse des protéines bactériennes, en majorité des protéines ribosomiques [11].

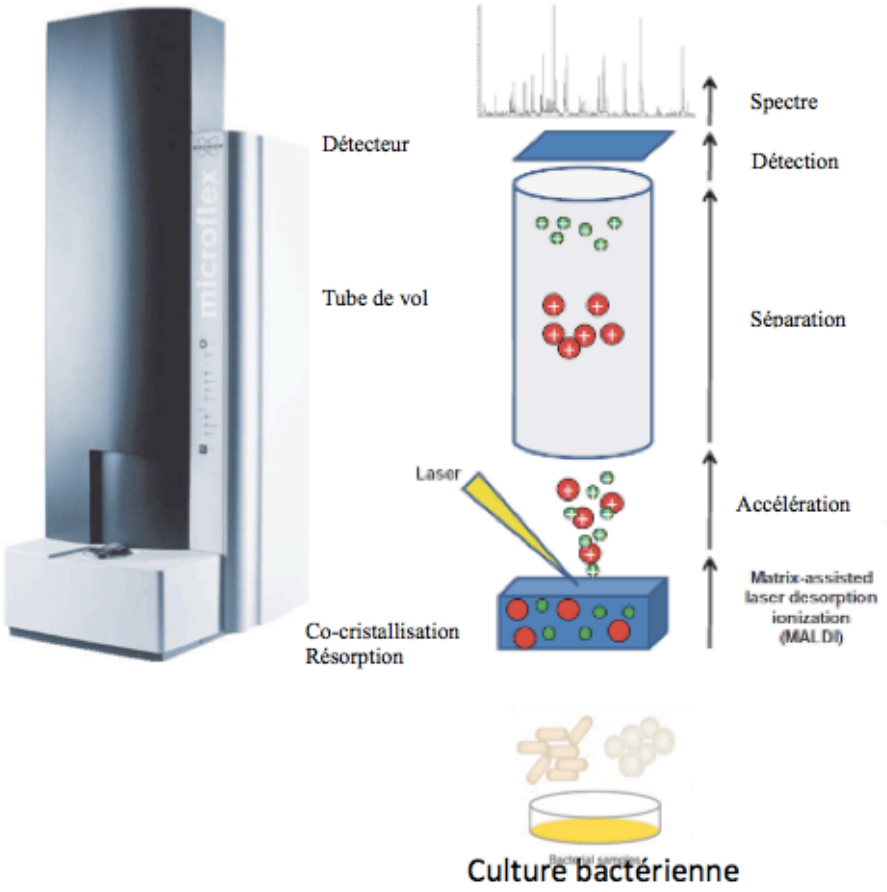


Figure 4 : Automate de spectrométrie de masse Microflex (Bruker daltonics®)

Le principe repose sur la séparation des molécules ionisées selon leur rapport masse sur charge (m/z) dans un champ électromagnétique (Figure 4).

Cette méthode comporte quatre étapes :

- une étape d'ionisation de l'échantillon avec une matrice
- une accélération des ions formés dans un tube de vol (champ électromagnétique)
- une détection des ions et transformation du signal en un spectre de masse
- une comparaison du spectre à ceux présents dans la base de données.

En pratique, la colonie bactérienne est déposée sur une plaque métallique appelée cible (Figure 5). Une matrice liquide est ajoutée et le mélange va co-cristalliser sous l'effet du séchage. La matrice est une solution organique chargée en cristaux qui peut varier selon la nature de l'échantillon à analyser. Les plus couramment utilisées en microbiologie sont les matrices HCCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) recommandée pour l'automate Bruker® ou DHB (acide 2,5-hydroxybenzoïque). Il est très important d'attendre le délai correct de séchage de la matrice car le solvant organique contenu dans la matrice extrait les protéines ribosomiques présentes dans l'échantillon [12]. La cible est ainsi le support du mélange matrice-échantillon ; elle peut être réutilisable (en inox) ou jetable.

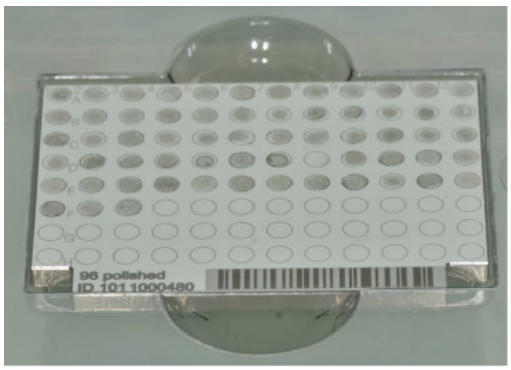


Figure 5 : Cible réutilisable pour la technique MALDI-TOF [9]

La cible est placée dans l'automate puis exposée au rayon laser UV permettant ainsi la désorption (vaporisation) et l'ionisation de l'échantillon. Les photons sont émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. C'est la matrice qui permet la réussite de l'ionisation en favorisant le passage en phase gazeuse et le transfert d'ions entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon. Ensuite, les ions sont accélérés électrostatiquement et entrent dans le tube de vol à une certaine vitesse. L'analyseur de masse sépare les ions selon leur rapport masse/charge (m/z). Le temps de

vol est inversement proportionnel à la masse. Ensuite, le signal est traité et retranscrit sous forme d'un ensemble de pics appelé spectre représentant l'intensité du signal en fonction du rapport m/z (Figure 6).

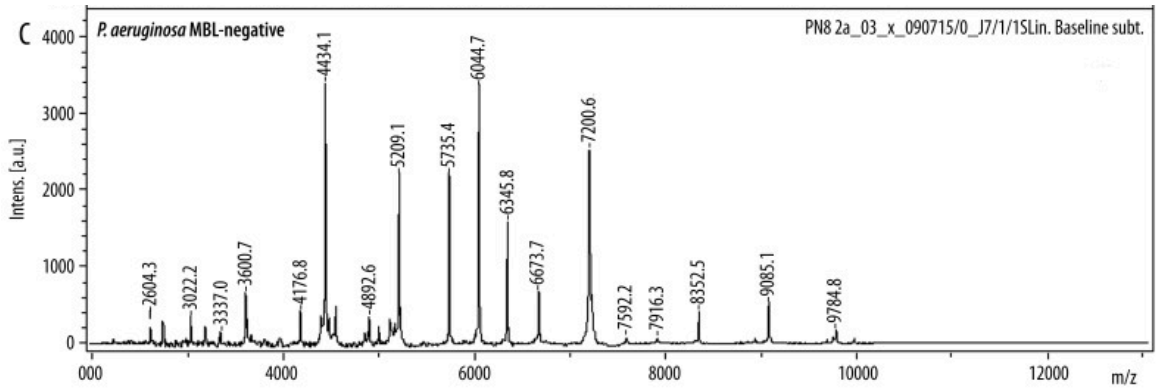


Figure 6 : Spectre de masse MALDI-TOF d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* non productrice de métallo-bêta-lactamase [13]

L'extraction protéique est une étape supplémentaire envisageable lorsque l'identification par transfert direct a échoué. L'extraction simple consiste à ajouter de l'acide formique sur l'échantillon avant de déposer la matrice (Figure 7). Une extraction plus complète utilisant des lavages avec de l'eau, de l'éthanol, de l'acide formique et de l'acétonitrile permet d'améliorer le rendement d'extraction. L'acide formique sert à la lyse de la paroi cellulaire pour les micro-organismes ayant une paroi cellulaire très rigide. L'acétonitrile favorise la mise en suspension des protéines bactériennes en permettant une meilleure solubilisation [14].

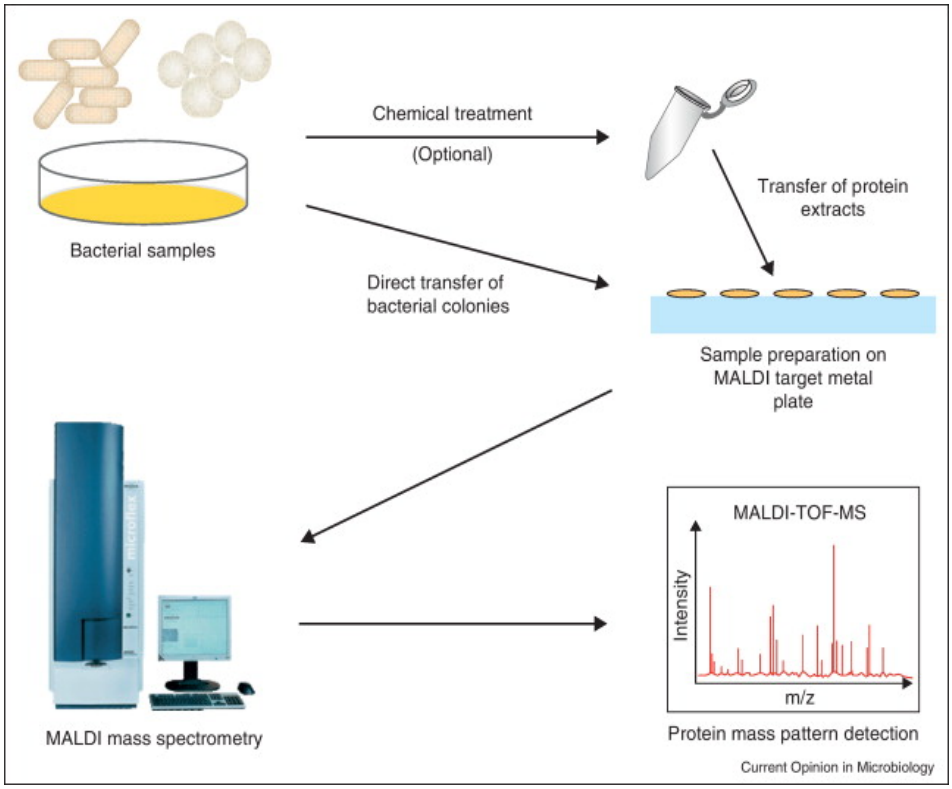


Figure 7 : Etapes de l'identification bactérienne par MALDI-TOF [16]

Il y a deux façons d'utiliser les spectres pour permettre l'identification bactérienne : la comparaison des spectres à une base de données contenant de nombreux spectres ou la comparaison des pics spécifiques d'espèces (ayant une intensité relative élevée) à une base de donnée protéique contenant des pics spécifiques [15].

Le principe d'identification repose sur le fait que l'empreinte spectrale varie d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre. Parmi les composés détectés par le spectromètre certains sont spécifiques du genre, de l'espèce, voire même de la sous-espèce. Les résultats sont reproductibles si la bactérie est cultivée dans les conditions standard [17].

L'expression des résultats est différente selon les systèmes :

Avec l'automate Vitek MS (bioMérieux®), les résultats sont exprimés en fonction d'un degré de confiance et d'un score exprimé en pourcentage. Une identification est considérée comme acceptable si l'identification proposée comporte un indice de confiance entre 60 et 99%. Si l'indice de confiance est <60%, cela signifie qu'il s'agit d'une faible probabilité d'identification [9].

Avec l'automate Bruker biotyper®, le résultat est exprimé via un score logarithmique allant de 0,000 à 3,000. Il s'agit d'un score de corrélation entre le spectre

obtenu avec la bactérie inconnue et le spectre de référence le plus proche identifié dans la base de donnée qui correspond à une probabilité d'identification. En fonction de ce dernier, une représentation par code couleur (vert, jaune ou rouge) et une valeur allant de (-) à (+++) est proposée (Tableau 2) [18].

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.00 - 3.00	Identification avec une haute confiance	(+++)	vert
1.70 - 1.99	Identification avec une faible confiance	(+)	jaune
0.00 - 1.69	Aucune identification possible	(-)	rouge

Tableau 2 : Correspondance des scores avec l'automate Bruker® [19, 20]

Un indice de confiance (ou de cohérence) est attribué à un résultat d'identification (Tableau 3) et peut-être consulté secondairement au score d'identification :

- A : haute cohérence
- B : faible cohérence
- C : aucune cohérence

Catégorie	Description
(A)	**Haute cohérence :** Le meilleur résultat correspond à une identification avec une haute confiance. Le deuxième meilleur résultat est (1) une identification avec une haute confiance, dans laquelle l'espèce est identique au meilleur résultat, (2) une identification avec une faible confiance, dans laquelle le genre est identique au meilleur résultat, ou (3) une absence d'identification.
(B)	**Faible cohérence :** Les exigences pour un indice de cohérence élevé ne sont pas atteintes. Le meilleur résultat correspond à une identification avec une confiance haute ou faible. Le deuxième meilleur résultat est (1) une identification avec une confiance haute ou faible, dans laquelle le genre est identique au meilleur résultat ou (2) une absence d'identification.
(C)	**Pas de cohérence :** Les exigences pour un indice de cohérence élevé ou faible ne sont pas atteintes.

Tableau 3 : Description des indices de confiance

Le logiciel de Bruker® permet de visualiser les dix meilleures probabilités d'identification ou Main Spectra Profile (MSP) (Tableaux 4 et 5). Ce sont les deux meilleurs résultats qui permettent de déterminer les indices de confiance c'est à dire les deux premiers spectres proposés lors du rendu des résultats. Si les deux premiers MSP présentent un score >2, le résultat est classé en indice de confiance A (haute cohérence).

Classement (Qualité)	Profil de référence	Score Valeur	Identifiant NCBI
1 (+)	Pseudomonas putida B401 UFL	1.99	303
2 (+)	Pseudomonas putida ATCC 49128 THL	1.95	303
3 (+)	Pseudomonas putida B342T UFL	1.72	303
4 (-)	Pseudomonas putida DSM 3226 DSM	1.68	303
5 (-)	Pseudomonas putida B409 UFL	1.64	303
6 (-)	Pseudomonas putida Mu15117_1 CHB	1.64	303
7 (-)	Pseudomonas brassicacearum DSM 13227T HAM	1.63	86264
8 (-)	Pseudomonas putida DSM 50198 DSM	1.61	303
9 (-)	Pseudomonas plecoglossicida DSM 15088T HAM	1.59	70775
10 (-)	Pseudomonas putida DSM 6125 DSM	1.56	303

Tableau 4 : Exemple d'un résultat détaillé d'identification d'un *Pseudomonas* du groupe *putida* présentant les dix MSP proposés

Classement (Qualité)	Profil de référence	Score Valeur	Identifiant NCBI
1 (+++)	Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 DSM	2.38	287
2 (+++)	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 THL	2.25	287
3 (+++)	Pseudomonas aeruginosa DSM 1128 DSM	2.23	287
4 (+++)	Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T_QC DSM	2.22	287
5 (+++)	Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB	2.20	287
6 (+++)	Pseudomonas aeruginosa LMG 8029 LMG	2.18	287
7 (+++)	Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T HAM	2.04	287
8 (+)	Pseudomonas aeruginosa A07_08_Pudu FLR	1.98	287
9 (+)	Pseudomonas aeruginosa 19955_1 CHB	1.81	287
10 (+)	Pseudomonas jinjuensis LMG 21316T HAM	1.79	198616

Tableau 5 : Exemple d'un résultat détaillé d'identification d'un *Pseudomonas aeruginosa* présentant les dix MSP proposés

La société Bruker® insiste sur le rôle de la validation biologique par un microbiologiste formé aux critères de validation de l'identification énoncés et sur l'intérêt de prendre connaissance des dix MSP. Notamment, ce rôle est primordial dans les cas d'espèces connues comme appartenant à un complexe ou un groupe et difficiles à différencier entre elles par spectrométrie de masse (ex : *Enterobacter cloacae* complexe). Aussi, les spectres proposés peuvent faire évoquer un mélange de plusieurs spectres différents. Par exemple, lorsqu'un score est supérieur à 1,7 et inférieur à 2 avec un indice de confiance C. Une identification erronée peut par ailleurs survenir dans le cas d'un micro-organisme non répertorié mais étroitement apparenté à un micro-organisme présent dans la bibliothèque de référence.

Le critère de répétabilité est très important pour la cohérence à l'espèce mais il doit être interprété en fonction du nombre de spectres présents dans la base de données.

Des indices de référence sont donnés pour fournir des informations complémentaires (Tableau 6).

Pseudomonas plecoglossicida DSM 15088T HAM	appartient au groupe Pseudomonas putida
Pseudomonas putida ATCC 49128 THL	appartient au groupe Pseudomonas putida

Tableau 6 : Exemples d'indices de référence

Ils peuvent alerter le microbiologiste sur une difficulté d'identification connue du système (Figure 8). Par exemple, lorsqu'une espèce est difficile à différencier au sein d'un groupe du genre *Pseudomonas*, l'indice de confiance attribué est un B et l'indice de référence stipule que cette espèce appartient à un groupe.

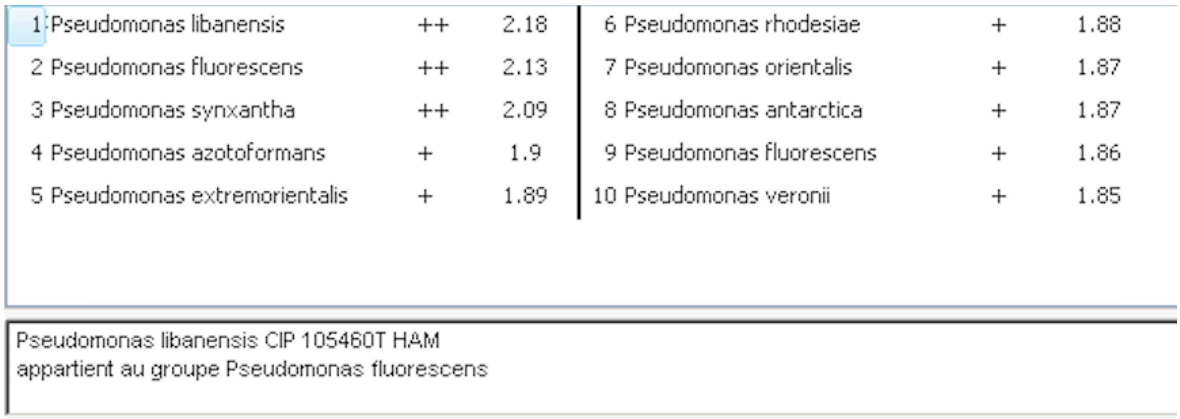


Figure 8 : Exemple de résultat d'identification par MALDI TOF (Bruker®) d'un *Pseudomonas* appartenant au groupe *fluorescens*

Les bases de données varient selon les fournisseurs :

Pour l'automate Bruker daltonics, il existe plusieurs bases de données :

- la base de donnée classique marquée CE (conforme aux exigences) contenant 5989 spectres en Juillet 2015
- la base de donnée des champignons filamenteux
- la base de donnée des mycobactéries
- la base de donnée des germes considérés comme agents de bioterrorisme

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est en train de supplanter les autres méthodes phénotypiques d'identification bactérienne du fait de sa simplicité d'utilisation (une fois la technique du dépôt maîtrisée), de sa rapidité, de son faible coût une fois le matériel acquis et de sa robustesse [9, 10].

2. Méthodes d'identification génotypique

Les différentes espèces bactériennes peuvent aussi être identifiées sur le plan génomique. La détermination du GC% et le taux d'hybridation ADN/ADN sont des méthodes historiques qui ne sont pas utilisées en routine au laboratoire. Plusieurs techniques ont été développées, notamment la PCR spécifique d'espèce et le séquençage.

1) PCR spécifique d'espèce

Il est possible d'utiliser l'amplification de fragments de gènes spécifiques d'espèces c'est à dire de gènes retrouvés seulement chez l'espèce bactérienne recherchée (gène *ply* codant pour la pneumolysine du pneumocoque, gène *femB* codant pour une aminoacyltransférase spécifique du peptidoglycane de *Staphylococcus aureus*, etc.). Elle est plutôt réalisée à partir d'un produit pathologique (liquide céphalo-rachidien, hémolculture, liquide de ponction, etc.) et implique d'avoir une orientation diagnostique [6].

2) Séquençage nucléotidique d'un amplicon

Le séquençage nucléotidique consiste à déterminer la composition nucléotidique d'une molécule d'ADN d'intérêt après amplification. La séquence ainsi obtenue d'un gène d'intérêt est ensuite comparée avec des séquences connues et stockées en banques de données afin d'identifier la bactérie au rang d'espèce.

Le contenu de la réaction de séquence se compose :

- d'une ADN polymérase
- de l'amorce du gène à séquencer
- des désoxyribonucléotides (dNTP)
- des didésoxyribonucléotides (ddNTP)

Tout d'abord, le brin d'ADN d'intérêt double brin est dénaturé afin d'obtenir un ADN simple brin. L'amorce spécifique se fixe sur le brin d'ADN. L'ADN polymérase peut initier l'élongation et permettre l'incorporation de nucléotides libres dans le milieu réactionnel par la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'-OH du nucléotide intégré dans la chaîne et le 5'-phosphate du nucléotide suivant. Les désoxyribonucléotides (dNTP) sont incorporés dans le nouveau brin synthétisé et l'élongation peut continuer. A l'inverse, lorsqu'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) est intégré, l'élongation cesse. Cela est dû au fait que le ddNTP est dépourvu d'extrémité 2'-OH et 3'-OH au niveau du ribose empêchant la liaison phosphodiester avec un prochain dNTP. Les dNTP et les ddNTP sont en compétition dans le milieu réactionnel. Lors de la réaction de polymérisation, il va donc y avoir formation de brins complémentaires de longueurs différentes terminés par un ddNTP. Les différents fragments vont être séparés par migration capillaire dans un automate appelé séquenceur. Les derniers nucléotides de ces différents fragments, marqués par des fluorochromes vont être détectés par l'analyse spectrophotométrique en fin de migration. Les différents fluorochromes seront différenciés par une analyse spectrale, ce qui permet d'identifier la base correspondante et de restituer la séquence du brin d'ADN initial (Figure 9).

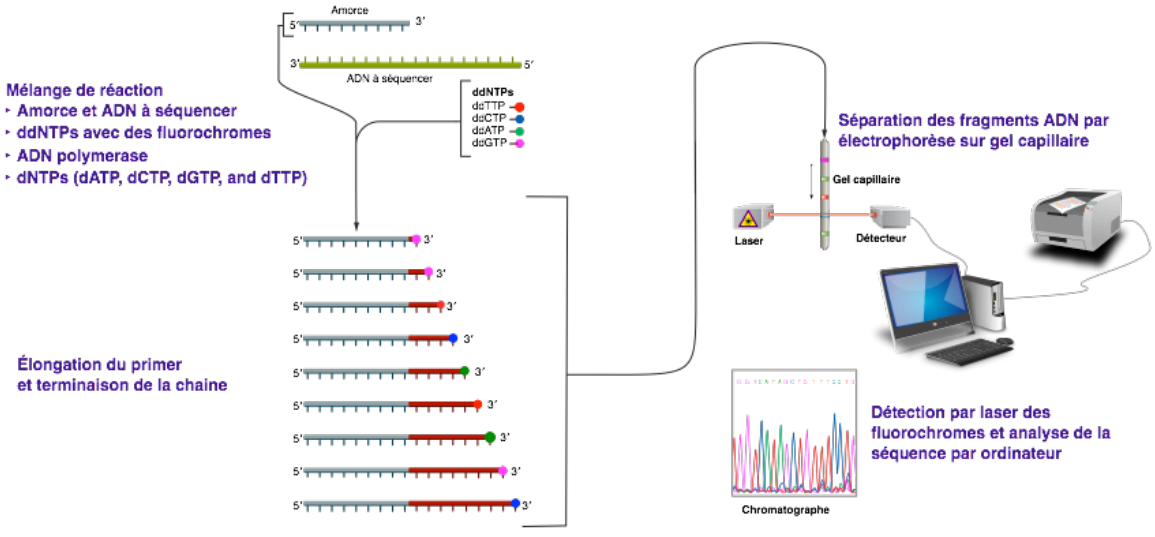


Figure 9 : Schéma illustrant la technique de séquençage selon Sanger [21]

Plusieurs gènes peuvent se révéler des cibles pertinentes pour l'identification bactérienne. Il va s'agir généralement de gènes conservés chez l'ensemble des bactéries ou chez un groupe bactérien comportant des portions variables spécifiques d'espèces.

2.1. ADNr 16S

Le ribosome bactérien est composé d'une grande et d'une petite sous-unité. La grande sous-unité est constituée d'ARN 23S, d'ARN 5S et de protéines. La petite sous-unité est constituée d'ARN 16S et de protéines (Figure 10).

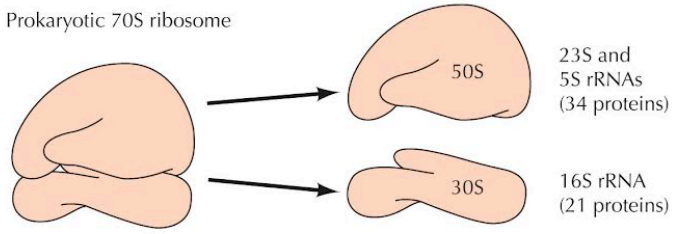


Figure 10 : Schéma représentant la grande sous-unité (50S) et la petite sous-unité (30S) d'un ribosome bactérien [22]

L'ARN 16S est connu pour avoir une évolution plus lente que le reste du génome. La séquence d'ADN codant pour l'ARN 16S est constituée de domaines hautement conservés (subissant très peu de mutations) entourant des domaines variables (Figure 11).

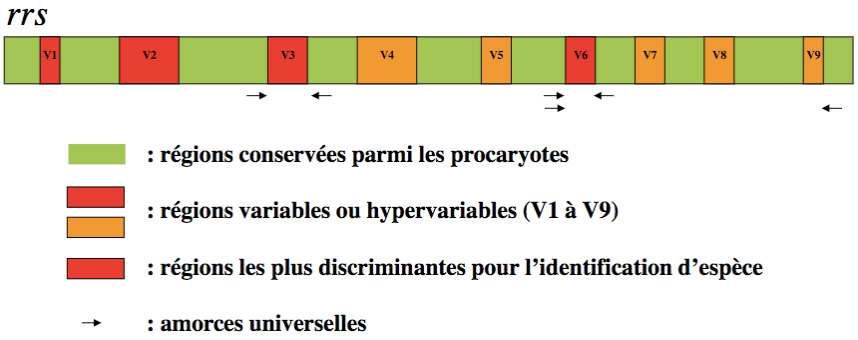


Figure 11 : Alternance de séquence conservées et variables/hypervariables sur le gène ADNr 16S, d'après Chakravorty *et al*. [23]

Ce sont ces domaines assez conservés qui sont la cible d'amorces pour l'amplification de l'ADNr 16S. De nombreuses espèces ont une séquence ADNr 16S spécifique mais il existe des cas où les bactéries d'espèces différentes ont des séquences d'ADNr 16S très proches [24].

La présence de plusieurs copies de gènes organisés en opérons peut être problématique car elle peut conduire à une hétérogénéité de séquences entre les copies. D'autres gènes peuvent alors être plus discriminants pour l'identification bactérienne.

2.2. Autres gènes

Il s'agit le plus souvent de gènes de ménage ou gènes domestiques, impliqués dans le maintien de l'information génétique au niveau de la transcription, traduction, processus de conformation ou réparation de l'ADN, processus énergétiques, gestion du stress, etc.

L'étude de Kim *et al*. [25], montre l'intérêt de séquencer le gène qui code la protéine du choc thermique Hsp65 pour l'identification des mycobactéries non tuberculeuses. En effet, la culture de ces espèces est longue et fastidieuse. Aussi, il est difficile de différencier certaines espèces (*avium*/*intracellulare*), le séquençage de l'ADNr 16S a ses limites (2 copies de l'opéron sont présentes dans le génome). Le gène *hsp65* est présent en une seule copie et est hautement conservé [25]. Il montre un plus haut niveau de divergence, permettant de décrire un plus grand nombre de clusters et de distinguer certaines espèces proches (Figure 12). Le gène *hsp65* est donc un bon outil d'analyse phylogénétique et d'identification d'espèces au sein du genre *Mycobacterium* [25].

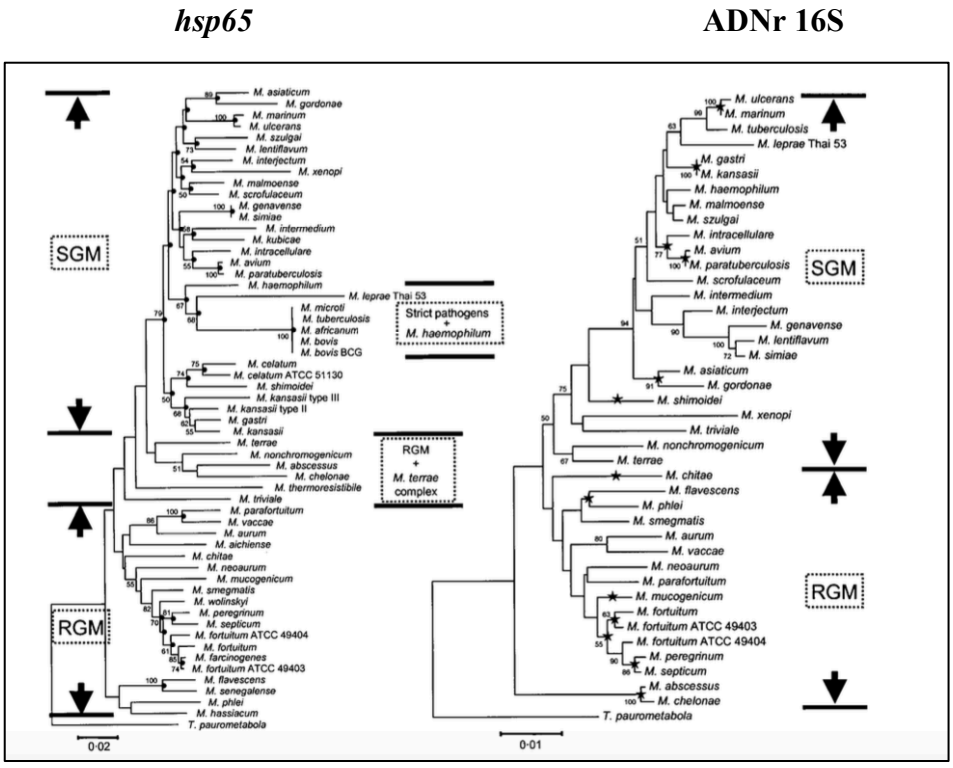


Figure 12 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences des gènes *hsp65* et ADNr 16S [25]

RGM = mycobactéries à croissance rapide / SGM = mycobactéries à croissance lente

II. Les bactéries du genre *Pseudomonas*

1. Classification

Le genre *Pseudomonas stricto sensu* appartient au phylum des Protéobactéries, à la classe des Gammaprotéobactéries, l'ordre des Pseudomonadales, et la famille des *Pseudomonadaceae*. D'autres genres sont inclus dans cette famille comme les genres *Azomonas*, *Azotobacter*, *Chryseomonas, Flavimonas, Rhizobacter* [26, 27]. Le genre *Pseudomonas* est décrit par Migula en 1894 et inclut de nombreux bacilles à Gram négatif non fermentant, aérobie strict à flagellation polaire [28]. En 1895, Migula y inclut *Pseudomonas pyocyanea,* espèce type du genre. Cette espèce est maintenant appelée *Pseudomonas aeruginosa* et connue pour son pouvoir pathogène opportuniste, impliquée notamment dans des pneumopathies acquises sous ventilation ou surinfections de plaies. Aujourd'hui le genre *Pseudomonas* inclut de nombreuses espèces d'intérêt environnemental, économique, agroalimentaire, et médical (Annexe 1) [29].

En 1984, Palleroni subdivise le genre *Pseudomonas* en 5 groupes (I à V) sur la base de l'hybridation ADN-ARN. Puis, entre 1984 et 2000, les espèces des groupes II à V sont transferées dans d'autres genres (Tableau 7). Le genre *Pseudomonas* est alors restreint aux espèces du groupe ARN de type I (Tableau 7) [2, 28, 30].

Groupe d'ARN	Genres
Groupe I	*Pseudomonas stricto sensu*
Groupe II	*Burkholderia, Pandoraea, Ralstonia*
Groupe III	*Acidovorax, Comamonas, Delftia*
Groupe IV	*Brevundimonas*
Groupe V	*Stenotrophomonas*

Tableau 7 : Classification des *Pseudomonaceae* selon Palleroni et Doudoroff [26, 30]

Le Bergey's Manual retenait 29 espèces dont 13 d'intérêt médical dans l'édition 1974, puis 30 espèces principales dans l'édition de 1984. En 1998, 118 espèces sont décrites dans le genre *Pseudomonas* [27] alors qu'en 2016, 231 espèces sont intégrées dans le genre [28]. C'est donc un genre en constante évolution. Des espèces quittent le genre

Pseudomonas pour être affiliées à un autre et de nouvelles espèces sont décrites au sein du genre grâce à l'avancée des méthodes d'identification.

L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences partielles de l'ADNr 16S regroupe les principales espèces du genre *Pseudomonas* et illustre la notion de groupes distincts ou clusters (Figure 13, Annexe 2) [26, 28].

- groupe *putida*,
- groupe *fluorescens*
- groupe *aeruginosa*
- groupe *syringae*
- groupe *chlororaphis*
- groupe *stutzeri*
- groupe *pertucinogena*

Le séquençage du génome entier de toutes les souches types et l'analyse par Multilocus Sequence Analysis (MLSA) fournit des informations précieuses sur l'évolution et les relations taxonomiques en bactériologie. Au sein du genre *Pseudomonas*, elle a permis de différencier à ce jour 19 groupes [31] :

- *fluorescens* (contient les espèces *fluorescens, azotoformans, marginalis, libaniensis*)*, gessardii* (contient les espèces *gessardii*, *proteolytica*, *brenneri*, *meridiana*)*, fragi, jessenii, koreensis, mandelii, chlororaphis, corrugata, asplenii, lutea, syringae* (contient les espèces *savastanoi, caricapapaye*) *anguilliseptica, putida (*contient les espèces *entomophila, monteilii, mosselii, plecoglossicida*) *straminea, aeruginosa* (contient les espèces *alcaligenes, resinovorans, otitidis), oleovorans* (contient les espèces *mendocina, oleovorans*)*, stutzeri, oryzihabitans, pertucinogena*

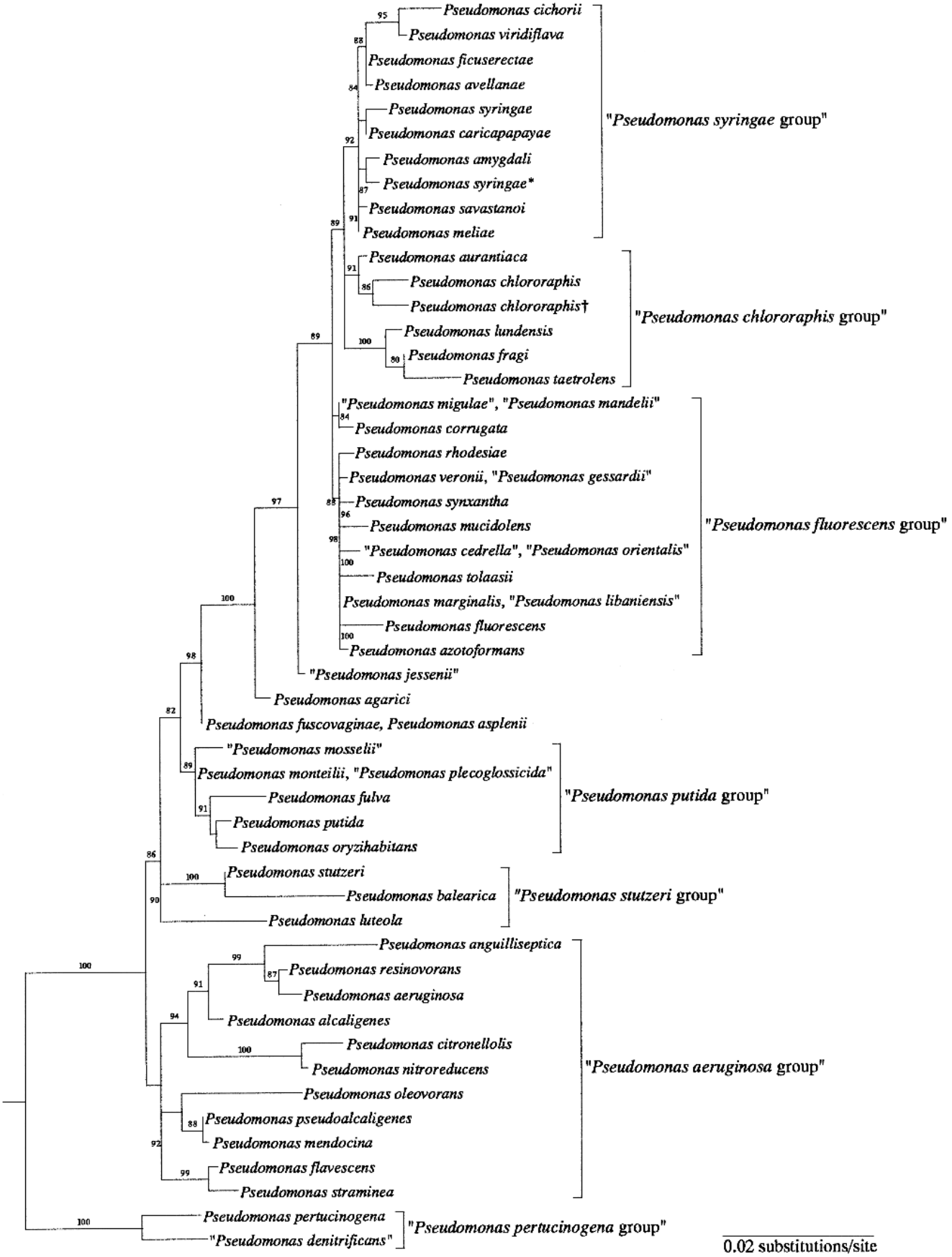


Figure 13 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène de l'ADNr 16S [26, 28]

2. Principales caractéristiques bactériologiques

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à gram négatif (Figure 14), droits et fins (0,5 à 1,3 µm de diamètre), mobiles par une ciliature polaire (un ou plusieurs flagelles), non sporulés, aérobies strictes, non exigeants.

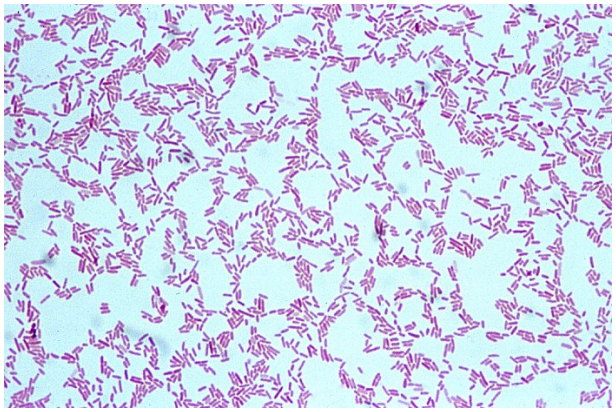


Figure 14 : Coloration de Gram d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* [32]

Certaines espèces peuvent produire des pigments fluorescents ou non fluorescents [6, 26] (Tableau 8). Certaines produisent un pigment fluorescent appelé pyoverdine (jaune-vert) jouant le rôle de sidérophore. Ces espèces sont classées dans le groupe des *Pseudomonas* fluorescents : *aeruginosa, chlororaphis subsp. chlororaphis, fluorescens, monteilli, putida, plecoglossidica, simiae, syringae*. Ces pigments ont un rôle dans la virulence de la bactérie [6]. Les *Pseudomonas* du groupe non fluorescent sont notamment les espèces *alcaligenes*, *fragi*, *mendocina*, *stutzeri*, *pseudoalcaligenes*.

Groupe fluorescent	Groupe non fluorescent
P.aeruginosa	*P.alcaligenes*
P.chlororaphis	*P.fragi*
P.fluorescens	*P.fulva*
P.monteilii	*P.mendocina*
P.mosselii	*P.pseudoalcaligenes*
P.putida	*P.stutzeri*
P.simiae	
P. syringae	
P.tawainensis	

Tableau 8 : Espèces de *Pseudomonas* sp. appartenant aux groupes fluorescent et non fluorescent [33]

Certaines espèces (*aeruginosa, chlororaphis subsp. aureofaciens*) produisent des pigments phénaziniques, non fluorescents. Le plus courant est la pyocyanine, spécifique de *P. aeruginosa* jouant un rôle de transporteur d'électrons. Ce pigment a une action néfaste sur les cellules endothéliales. L'espèce *chlororaphis* peut produire un pigment vert ou orange selon le biovar. De nombreuses espèces peuvent présenter un pigment non fluorescent [6, 26] (Tableau 9).

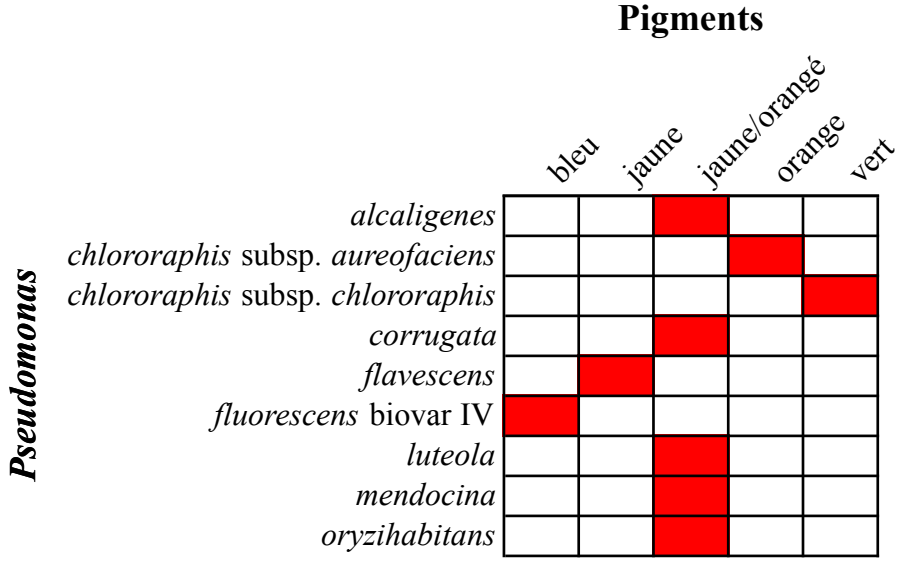


Tableau 9 : Principaux pigments non fluorescents produits selon les espèces de *Pseudomonas* [6, 26] (rouge = présence/ blanc = absence)

La température optimale de croissance est de 30°C, de nombreuses espèces ne cultivant pas à 37°C. Certaines espèces survivent à des températures extrêmes : 4°C pour les espèces *putida* et *fluorescens* et croissance à 41°C pour les espèces *aeruginosa, alcaligenes, pseudoalcaligenes, stutzeri, mendocina* [6].

3. Habitat

Ces bactéries ont des exigences nutritives très modestes. Elles survivent et se multiplient dans des environnements humides. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans l'eau, le sol, les végétaux et les tissus biologiques. Elles ont une capacité à s'installer dans des niches différentes [34].

Il existe des souches psychotropes (capables de se développer de 0 à 20°C mais dont la température optimale de croissance est entre 20 et 35°) [35] responsables de la détérioration des denrées alimentaires et des produits biologiques conservés au froid (espèces *fluorescens*, *putida*)[36]. Certaines espèces sont considérées comme des dépolluants car elle présentent des capacités à dégrader les hydrocarbures cycliques et

linéaires présents dans les sols et dans les eaux (espèces *alcaligenes*, *putida* et *mendocina*). Pour cela, elles fabriquent des biosurfactants qui les protègent et aident à la dégradation des polluants [37, 38, 39, 40]. Elles peuvent être présentes dans l'eau destinée à la consommation humaine.

Globalement, en France, les données concernent essentiellement *Pseudomonas aeruginosa*.

Selon la base SISE-Eaux (Système d'information en santé environnement sur les eaux) des concentrations quantifiables de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas* sp. sont retrouvées dans environ 4% des échantillons de 100mL d'eaux analysés [2].

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont principalement retrouvées dans l'environnement mais aussi en milieu hospitalier, en tant que contaminants des eaux et des solutions antiseptiques, dont l'origine n'est pas connue [6].

Dans les années 1980, Keys *et al*. [40] ont décrit les cas de 24 patients sur 2 ans dont les hémocultures ont été positives à *Pseudomonas stutzeri*, à cause d'un savon contaminé utilisé sur peau saine avant un acte invasif.

4. Pathogénicité

1) Pathogénicité végétale et animale

La pathogénicité végétale et animale des principales espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa* est présentée dans le Tableau 10.

Les espèces P. *fluorescens* et P. *plecoglossicida* sont pathogènes chez les poissons et crustacés [41].

L'espèce P. *fluorescens*, est responsable de « *red skin disease* » chez différents organismes (carpe de roseau, crevettes) se manifestant par des hémorragies locales et générales, ulcérations des nageoires et détérioration des écailles [42, 43] (Tableau 10).

L'espèce *P. marginalis* est reconnue comme étant un phytopathogène. *P. tolaasii* est un pathogène des champignons [44].

Les espèces psychrophiles *P. lundensis*, *P. fragi* et *P. putida* sont fréquemment retrouvées en tant qu'agents de détérioration des denrées alimentaires [36].

L'espèce *P. entomophila* [33] est un pathogène des insectes, reconnu chez la drosophile, producteur de toxinzs insecticides.

L'espèce *syringae* est un phytopathogène reconnu. Différentes phytotoxines sont produites selon les pathovars (Tableau 11). Ces pathovars sont spécifiques selon les végétaux (Tableau 12).

Espèce	Caractéristiques	Pouvoir pathogène	Références
alcaligenes	dépolluant organique et minéral		Suzuki *et al*. O' Mahony *et al*.
entomophila	producteur de toxines insecticides	insectes (drosophile : *Drosophila melanogaster*)	Mulet *et al.*
fluorescens	biofertilisant production mupirocine détérioration denrées alimentaires	pathogène des oiseaux pathogène des poissons et crustacés « red skin disease »	Wang *et al*.
marginalis		pathogène des végétaux	Moore *et al*.
mendocina	dépolluant organique et minéral dénitrification		Ramos-Gonzalez *et al*.
oleovorans	contaminant des liquides de coupe de métaux		Sabina *et al*.
plecoglossicida		pathogène des poissons (ascite chez poisson ayu : *Plecoglossus*)	Izumi *et al*.
putida	dépolluant organique et minéral détérioration denrées alimentaires (lait, viande, poisson)		Fernandez *et al*. Ercolini *et al*. Zylstra *et al*.
stutzeri	dépolluant organique et minéral dénitrification		Lalucat *et al*.
syringae	producteur de phytotoxines	pathogène des végétaux,	Bender *et al*.
tolaasii		pathogène des champignons	Moore *et al*.

Tableau 10 : Caractéristiques et pouvoir pathogène (autre qu'en clinique humaine) pour les principales espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa* [28, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 42, 44, 45, 46, 47]

TABLE BXII.γ.109. Some toxins produced by phytopathogenic *Pseudomonas* species and pathovars[a]

Species	Toxins	Target or mechanism
P. syringae		
P. syringae pathovar *atropurpurea*	Coronatine	
P. syringae pathovar *coronafaciens*	Tabtoxinine-β-lactam	Glutamine synthetase
P. syringae pathovar *garcae*	Tabtoxinine-β-lactam	Glutamine synthetase
P. syringae pathovar *glycinea*	Coronatine, polysaccharide	
P. syringae pathovar *lachrymans*	Polysaccharides	
P. syringae pathovar *maculicola*	Coronatine	
P. syringae pathovar *morsprunorum*	Coronatine	
P. syringae pathovar *phaseolicola*[b]	Phaseolotoxin	Ornithine transcarbamylase
P. syringae pathovar *savastanoi*[b]	Indole acetate, cytokinins	
P. syringae pathovar *syringae*	Syringomycins	Plasma membrane
	Syringopeptins	
	Syringotoxins	Plasma membrane
P. syringae pathovar *tabaci*	Tabtoxinine-β-lactam	Glutamine synthetase
P. syringae pathovar *tagetis*	Tagetitoxin	Chloroplastic RNA polymerase
P. syringae pathovar *tomato*	Coronatine	
P. tolaasii	Tolaasin	Plasma membrane

[a]For symbols see standard definitions. Modified from Durbin (1992). The nomenclature used is the one preceding the proposal by Gardan et al. (1992).

[b] *P. syringae* pathovar *savastanoi* is described in this treatment as an independent species, *P. savastanoi*, and pathovar *phaseolicola* is considered as a pathovar of *P. savastanoi*; see description of this species in the list of species).

Tableau 11 : Phytotoxines produites par *P. tolaasii* et les différents pathovars de *P. syringae* [28]

pathovars	**cibles de la phytopathogénicité**
syringae	arbres fruitiers à noyaux : cerisiers, pruniers, pêchers, abricotiers
mors-prunorum	cerisiers, pruniers
persicae	pêcher
coronafaciens	graminés, céréales
atrofaciens	blé, orge
glycinea	soja
lachrymans	cucurbitacées
phaseolicola	haricot
savastanoi	olivier
maculicola	crucifères (choux, etc.)
pisi	pois
tabaci	tabac, soja
tomato	tomate
aptata	betterave

Tableau 12 : Phytopathogénicité selon les différents pathovars de *Pseudomonas syringae* [48]

2) Pathogénicité humaine

Pseudomonas aeruginosa représente l'espèce type du genre *Pseudomonas* et est l'espèce la plus couramment isolée en clinique humaine. Elle est responsable majoritairement d'infections nosocomiales pulmonaires, urinaires, cutanées, oculaires,

bactériémies, etc., mais d'autres espèces appartenant au genre *Pseudomonas* peuvent être isolées chez l'homme. Leur isolement dépend souvent de l'écologie locale. Elles sont souvent retrouvées dans les unités à haut risque infectieux (hématologie clinique, oncologie, unité de soins intensifs, etc.) chez des patients profondément immunodéprimés [6, 29, 49].

Lorsqu'elles sont isolées, il est difficile de prouver clairement leur implication clinique du fait de leur faible virulence. L'expression d'un pouvoir pathogène est liée à leur entrée inopinée et massive dans la circulation générale. La plupart du temps, elles sont impliquées dans des pseudo-bactériémies ou isolées sur des prélèvements de matériel invasif chez des patients hospitalisés. Elles sont souvent retrouvées avec un autre germe, reconnu comme étant volontiers plus pathogène qu'un *Pseudomonas* sp. [50]. Mais dans certains cas, l'implication d'un *Pseudomonas* sp. en tant que pathogène n'est pas remise en cause.

Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont les *Pseudomonas* du groupe *putida* et les *Pseudomonas* du groupe *fluorescens* [29, 51].

De manière plus rare, quelques cas d'infections sont décrits pour *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. otitidis* et *P. pseudoalcaligenes/oleovorans*.

2.1. Facteurs de virulence

Lorsqu'ils sont comparés à *P. aeruginosa*, il est certain que les *Pseudomonas* autres qu'*aeruginosa* n'ont pas un pouvoir pathogène aussi important.

Une étude a recherché différents facteurs de virulence (production de pyocyanine, cytotoxicité sur des cellules humaines HT29, production de cytokines pro-inflammatoires, influence sur la sécrétion de polynucléaires neutrophiles, etc.) chez des souches de *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida* et *P. stutzeri* (Tableau 13). Il a été montré que ces facteurs de virulence étaient majoritairement présents chez l'espèce *aeruginosa* et absents chez les espèces *putida*, *fluorescens* et *stutzeri* [52].

Summary of Assays for Comparing Potential Virulence Characteristics of *Pseudomonas*.

Pseudomonas Strain	Growth at 37°Cin TSB	Growth at 42°Cin TSB	Pyocyanin (Blue-green Pigment)	HT29 Cytotoxicity (24 hrs)	Pulmonary IL-1beta	Pulmonary IL-6	Pulmonary TNF-alpha	Pulmonary Neutrophil Infiltration	Serum Amyloid A (≥ 48 hrs)
PAO1	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Pa10752	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Pa31480	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Pa700370	+	(+)	+	+	+	+	-	+	-
Pa700371	+	(+)	+	+	-	-	-	+	-
Pf13525	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp12633	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp31483	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp31800	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp700369	(+)	-	-	-	-	+	-	-	-
Ps17587	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 13 : Facteurs de virulence potentiels d'espèces de *Pseudomonas* sp. (Pa = *P. aeruginosa*, Pf = *P. fluorescens*, Pp = *P. putida*, Ps = *P. stutzeri*) [52]

Fernandez *et al*. [34] se sont intéressés au potentiel pouvoir pathogène de l'espèce *putida* et montrent que certaines souches produisent un biofilm en quantité comparable à celle produite par la souche PA01 de *P. aeruginosa*. Elles entraînent aussi une altération de la structure de l'épithélium cutané : une vacuolisation et dégénération nucléaire des cellules épithéliales. Certaines souches se comportent comme des pathogènes opportunistes en étant responsable de lésions dans un modèle animal dont l'épithélium cutané est préalablement lésé avant inoculation [34].

Concernant *P. fluorescens,* il a été montré que la sécretion de bêta-défensine HB-D2 contribue au pouvoir pathogène de cette espèce. Aussi les molécules secrétées au niveau intestinal (sérotonine, épinéphrine et substance P) ont un rôle dans la motilité de la bactérie, la production de pyoverdine et d'IL-8 et donc dans la virulence de *P. fluorescens* [53]. Il a aussi été mis en évidence sa capacité à faire du biofilm sur une surface abiotique [54]. *P. fluorescens* est suspecté d'avoir un rôle dans la pathogénicité de la maladie de Crohn. Il a été constaté que le peptide I2 produit par *P. fluorescens* est détecté plus fréquemment dans les biopsies coliques, et les anticorps anti-I2 dans le sérum des patients atteints d'une maladie de Crohn ; sans qu'on ne sache si la bactérie contribue directement à l'inflammation chronique ou s'il s'agit seulement d'un biomarqueur indirect de la maladie [29].

Par ailleurs, une étude a mis en évidence une toxicité de *Pseudomonas mosselii* envers des lignées cellulaires Caco2-TC7, une faible capacité d'invasion, une induction de la sécretion de béta2-défensine humaine et une altération la perméabilité épithéliale [55].

Enfin, il a été montré la capacité de sélectionner des mutants de *P. fluorescens, P. putida et P. mendocina* producteurs d'exopolysaccharides, comme chez *P. aeruginosa*. Les mutants n'ont pas pu être obtenus avec les espèces *P. stutzeri, P. pseudoalcaligenes* [56].

2.2. Manifestations cliniques

Nous rapportons ci-dessous quelques cas cliniques ayant impliqué les principales espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa* (Tableau 14).

Les manifestations cliniques décrites dans la littérature sont peu spécifiques d'espèce excepté pour *Pseudomonas otitidis*.

Pseudomonas fluorescens, a été impliqué dans des tableaux de neutropénie fébrile. Dans la littérature, des cas de neutropénie fébrile avec colonisation à *P. fluorescens* dans une unité de greffe de moelle osseuse [57] ou des péritonites [58] ont été rapportés. Le site infectieux où *P. fluorescens* est le plus couramment retrouvé est l'hémoculture [29].

Il a été décrit des épidémies de bactériémies ou colonisations de cathéter dans un service d'oncologie [59] et de cardiologie [60].

Dans l'unité d'oncologie [59], il s'agissait de quatre patients porteurs d'un port-a-cath, ayant fait une bactériémie à *P. fluorescens* durant un épisode fébrile après administration de la chimiothérapie. L'origine de la bactériémie n'a pas pu être mise en évidence a posteriori. L'identification avec les techniques biochimiques classiques et carte GN sur automate Vitek bioMérieux® n'allait pas dans le sens d'une même espèce. C'est la composition en acides gras qui a orienté par la suite vers un profil, comparable à celui de la souche ATCC *P. fluorescens* 13525. L'analyse par amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD = random amplified polymorphic DNA) oriente vers un même clone.

Benito *et al*. [60], ont eux rapporté le cas de six patients qui ont eu des hémocultures et/ou un prélèvement de cathéter positif à *P. fluorescens* sur une période de six mois. Parmi les six patients, trois étaient fébriles, un des trois patients présentait une hémoculture et un prélèvement de cathéter positif. Les trois ont bénificié d'un retrait de leur cathéter et deux ont reçu une antibiothérapie systémique. Pour trois autres patients, la présence de *P. fluorescens* sur les prélèvements de cathéter uniquement a été étiquetée comme une colonisation du cathéter. La source était l'eau de la glace utilisée pour refroidir

les seringues utilisées dans le cadre du cathétérisme cardiaque à des fins diagnostiques (culture positive à *P. fluorescens*). Le typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé a montré que les isolats cliniques étaient identiques à l'isolat cultivé à partir de l'eau [60].

Il a aussi été isolé lors d'une sacro-illite septique chez un militaire immunocompétent présentant des douleurs dans le bas du dos irradiant dans la cuisse et une mobilité limitée. Le prélèvement articulaire a mis en évidence un nombre important de polynucléaires neutrophiles et la présence de bacilles à gram négatif à l'examen direct. En culture, un germe a été préalablement identifié comme un *Burkholderia* sp. par l'ID GN de l'automate Vitek 2, bioMérieux®. Mais par la suite, l'absence de culture sur milieu spécifique de *Burkholderia cepacia,* la culture à 4°C et l'identification >90% par une galerie API20NE, bioMérieux® ont permis de s'orienter vers un *P. fluorescens*. Mais aucune analyse génotypique n'est venue documenter ce résultat [61].

Pseudomonas putida a été isolé dans un cas de bactériémie (co-infection avec *Enterobacter cloacae* dans un liquide de conservation d'une transplantation hépatique) [62], dans une bactériémie à point de départ sur cathéter veineux central avec cathéter inflammatoire et fièvre en onco-hématologie [63]. Il a aussi été isolé dans un cas de conjonctivite [64], résolutive après traitement local par ciprofloxacine. Dans les trois cas, l'identification du germe a été obtenue par automate Vitek 2, bioMérieux® [62, 63, 64].

Pseudomonas mendocina a été isolé chez quatre patients présentant une endocardite. Deux ont été décrites sur valves natives et deux sur valves prothétiques, sans que le lien direct avec l'infection n'ait été établi. L'imputabilité de *P. mendocina* est forte dans les deux cas décrits sur valve native. Dans le premier cas, la souche a été isolée des six premières hémocultures à l'admission et des végétations [65]. Dans le deuxième cas, 4 paires d'hémocultures ont été positives à l'admission [66].

P. mendocina a aussi été impliqué dans un cas de spondylodiscite avec probable contamination par voie hématogène [67] et un cas de sepsis [68].

Le pouvoir pathogène de ***Pseudomonas otitidis*** est spécifiquement localisé à l'oreille humaine. Cette espèce a été décrite comme appartenant au genre *Pseudomonas* à partir de 41 cas d'atteintes de l'oreille : 34 cas d'otite aigüe externe, 6 cas d'otite moyenne aiguë avec otorrhée, 1 cas d'otite moyenne chronique suppurative [69].

Pseudomonas mosselii a été décrit dans un cas d'encardite sur valve prothétique [55, 70].

En général, ***Pseudomonas stutzeri*** est retrouvé dans des colonisations asymptomatiques (liées aux soins) d'origine iatrogène via l'utilisation de solutés, produits sanguins, etc. contaminés, mais il a été impliqué dans des cas de bactériémie, méningite, pneumonie et ostéomyélite [71, 72, 73, 74].

Dans le cas d'ostéomyélite, la bactérie a été mise en évidence en culture sur des biopsies CT (computerized tomography) - guidées osseuses répétées [73]. La contamination a été exclue par des cultures répétées négatives du matériel du kit de biopsie, des eaux stériles utilisées au laboratoire, etc.

Les cas de méningite sont très rares. Une méningite a été décrite chez un patient sous immunothérapie pour une maladie de Crohn, présentant 10 jours après l'injection du traitement des signes avérés de méningite (fièvre, photophobie, maux de tête, raideur de nuque). La souche de *P. stutzeri* a été cultivée à partir du liquide céphalo-rachidien. L'infection a été résolutive après 2 semaines d'antibiothérapie par céfépime [74].

Pseudomonas oleovorans a été isolé au cours d'une bactériémie chez une enfant de onze ans dont l'état a continué de se dégrader après un choc septique à *Staphylococcus aureus* sous antibiothérapie efficace. Deux paires d'hémocultures différentes ont permis l'isolement d'un bacille à gram négatif identifié comme un *P. oleovorans* par MALDI-TOF puis par séquençage de l'ADNr 16S [75].

Pseudomonas pseudoalcaligenes, espèce décrite comme étant très proche de *P. oleovorans,* a été impliquée dans un cas de péritonite. Les hémocultures ont permis l'isolement de *P. pseudoalcaligenes* mais la culture du liquide de dialyse péritonéale est restée négative. La méthode d'identification n'est pas précisée. L'infection a été résolutive après 7 jours de traitement par méropénem [76].

Ainsi, les espèces autres que *P. aeruginosa* ont été isolées dans des situations cliniques où leur implication a parfois pu être prouvée (Tableau 14). Cependant, on ne connaît pas de facteurs de virulence étayant leur pouvoir pathogène dans un type d'infection donnée. La bibliographie doit par ailleurs être étudiée avec prudence du fait des

difficultés d'identification fiable au rang de l'espèce avec les méthodes phénotypiques utilisées en routine au laboratoire, avant l'avènement de la spectrométrie de masse.

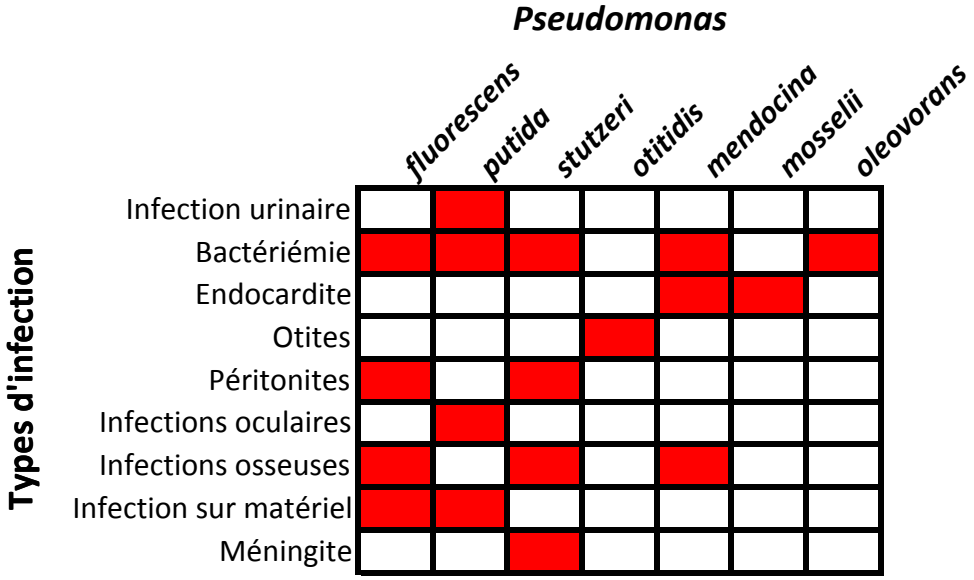


Tableau 14 : Implication de différentes espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa* en pathologie humaine [34, 36, 58, 59, 62, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 77]

rouge : description dans la littérature/ blanc : absence de description

5. Méthodes d'identification

1) Phénotypiques

1.1. Caractères culturaux

Les *Pseudomonas* sp. sont des bactéries non exigeantes. La culture peut être réalisée sur des milieux nutritifs de base, des milieux enrichis ou des milieux sélectifs.

La gélose TSA (Trypto-caséine Soja Agar) est un milieu de base, elle peut être intéressante en pré-enrichissement avant isolement. Elle est utilisée pour le dénombrement des bactéries, notamment dans des prélèvements d'eaux hospitalières. Ensuite, la bactérie du genre *Pseudomonas* peut-être ré-isolée.

La gélose columbia additionnée de 5% de sang de cheval couramment appelée gélose au sang est un milieu avec apport nutritif plus riche permettant la visualisation d'un éventuel pouvoir hémolytique.

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif contenant un antiseptique (le cétrimide) et un antibiotique (l'acide nalidixique, quinolone de 1ère génération) qui permet préférentiellement l'isolement des *Pseudomonas* sp. La présence de chlorure de

magnésium et de sulfate de potassium stimule la production de pigments (pyocanine et/ou pyoverdine selon les espèces).

La gélose CFC (Céphalosporine/ Fucidine/ Cetrimide) est un milieu sélectif des *Pseudomonaceae*, utilisé pour l'isolement et le dénombrement des *Pseudomonas*. La présence d'une céphalosporine (la céfalotine), de cétrimide et de fucidine permet d'inhiber la plupart des contaminants [49]. Elle est utilisée dans les contrôles alimentaires des produits à base de viandes, produits laitiers, volailles, etc.

1.2. Identification biochimique

Des tests d'orientation permettront à partir de milieux non sélectifs de repérer les colonies de *Pseudomonas* sp. d'intérêt pour ensuite les ré-isoler sur des milieux plus sélectifs afin de les identifier au rang de l'espèce. Ils sont indispensables à réaliser avant de choisir la galerie d'identification biochimique.

1.2.1 Tests d'orientation

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont la plupart du temps caractérisées en 1ère ligne par la production d'une enzyme, la cytochrome oxydase ou oxydase. La détection de cette enzyme se fait à l'aide d'un disque de papier absorbant imprégné de N, N, N', N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (incolore). Si la bactérie produit une cytochrome oxydase, cette enzyme oxydera ce substrat en un produit indophénol bleu [78].

Au sein des bacilles à gram négatifs, la production d'une oxydase n'est pas spécifique du genre *Pseudomonas* puisqu'elle est aussi notamment présente chez les genres *Vibriomonas*, *Aeromonas, Alcaligenes, Flavobacterium* [28].

La production de pigments oriente vers l'identification d'une bactérie appartenant aux *Pseudomonaceae* mais pas au genre *Pseudomonas stricto sensu*. Par exemple, *Stenotrophomonas maltophilia* peut produire un pigment jaune.

1.2.2 Identification manuelle

Deux galeries biochimiques API (bioMérieux®) peuvent être utilisées pour l'identification des bactéries du genre *Pseudomonas* : API20NE et API ID32GN.

La base de données d'interprétation de la galerie API 20NE bioMérieux® contient 5 espèces de *Pseudomonas* : *aeruginosa*, *fluorescens*, *mendocina*, *putida*, *stutzeri*.

La galerie ID32GN contient elle 8 espèces : *aeruginosa*, *alcaligenes*, *fluorescens*, *luteola*, *mendocina*, *oryzihabitans*, *putida* et *stutzeri*. De nombreuses bactéries ayant

appartenu au genre *Pseudomonas* y sont également représentées : *Burkholderia*, S*phingomonas*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*, *Delftia*, etc.

Le délai de rendu de résultat est un inconvénient majeur : il est de minimum 24h, voire 48h dans les cas où le profil obtenu en 24h est non valide ; ce qui retarde la réalisation d'un antibiogramme adapté à l'identification.

1.2.3 Identification automatisée

En France, il existe principalement deux automates pour l'identification bactérienne biochimique automatisée, chacun possédant une cassette ou galerie spécifique des bacilles à gram négatif non fermentants tels que les *Pseudomonas* sp.

Sur l'automate Vitek2 bioMérieux®, la cassette Vitek® 2 GN permet l'identification des bacilles à gram négatifs de type entérobactéries, non entérobactéries (dont *P. aeruginosa* et 8 autres espèces appartenant au genre *Pseudomonas* : *alcaligenes*, *fluorescens*, *luteola*, *mendocina*, *oleovorans*, *oryzihabitans*, *putida*, *stutzeri*)[77].

Sur l'automate BD Phoenix®, la galerie d'identification des bacilles à gram négatifs (carte NID) permet l'identification de *P. aeruginosa* et 7 autres espèces appartenant au genre *Pseudomonas* : *fluorescens*, *mendocina*, *luteola*, *oryzihabitans, pseudoalcaligenes*, *putida*, *stutzeri* [79].

Comme pour les techniques manuelles, le délai de rendu de résultat est un inconvénient puisque l'identification ne peut être lue que le lendemain du lancement de la carte d'identification.

Pour les techniques d'identifications biochimiques classiques, la nécessité d'avoir réalisé au préalable des tests d'orientation est un inconvénient. La faiblesse de certaines bases de donnée est une limite de l'identification biochimique.

Dans l'étude de Bosshard *et al*. [80], les performances des techniques phénotypiques API 20 NE et Vitek 2 sont comparées au séquençage de l'ADNr 16S chez les bacilles à gram négatif non fermentants (Tableau 15).

Identification system	No. (%) identified at taxonomic level:		
	Species	Genus	No identification
16S rRNA gene sequencing	98 (92)	9 (8)	
API 20 NE	58 (54)	7 (7)	42[a] (39)
VITEK 2	57 (53)	1 (1)	49[b] (46)

[a] 11 of the 42 isolates not identified belong to a species not included in the API 20 NE database.
[b] 39 of the 49 isolates not identified belong to a species not included in the VITEK 2 ID-GNB database.

Tableau 15 : Pourcentages d'identification au rang de l'espèce, d'identification au rang du genre et d'échec d'identification selon les méthodes utilisées (séquençage de l'ADNr 16S, API 20NE ou Vitek 2, bioMérieux®) pour 107 isolats de bacilles à gram négatif non fermentant [80]

Parmi les *Pseudomonas*, les résultats obtenus avec API 20 NE sont meilleurs que ceux obtenus avec l'automate Vitek2 (Tableau 16) mais cette étude ne comportait que très peu de souches.

Identification by 16S rRNA gene sequencing (*n*)	No. of isolates	API 20 NE[a] result	VITEK 2[a,b] result
Pseudomonas aeruginosa	1[c]	*Pseudomonas aeruginosa*; very good (1), acceptable (1)	*Pseudomonas aeruginosa*; excellent (2)
Pseudomonas aeruginosa	1	*Pseudomonas aeruginosa*; very good (1), acceptable (1)	*Pseudomonas aeruginosa*; excellent (2)
Pseudomonas fluorescens or *P. jessenii*	1	*Pseudomonas fluorescens*; excellent	No identification
Pseudomonas putida or *P. parafulva*	1	*Pseudomonas putida*; good	Low discrimination (*Shigella* group or NF[c])
Pseudomonas stutzeri	1	*Pseudomonas stutzeri*; very good	Low discrimination (*Pseudomonas aeruginosa* or NF)
Pseudomonas aeruginosa	1	Low discrimination (*Pseudomonas aeruginosa*)	No identification
Pseudomonas aeruginosa	1	No identification	Low discrimination (*Bordetella* sp. or NF)
Pseudomonas mendocina	1[c]	No identification	Low discrimination (*Ralstonia pickettii* or NF)
Pseudomonas pseudoalcaligenes or *P. oleovorans*	1	Low discrimination (*Comamonas testosterone* or *Pseudomonas alcaligenes*)	No identification
Pseudomonas stutzeri	1[c]	Low discrimination (*Pseudomonas stutzeri*)	Low discrimination (*Pseudomonas aeruginosa* or NF)
Pseudomonas sp.	1	Low discrimination (*Pseudomonas stutzeri*)	Low discrimination (*Ralstonia pickettii* or *Burkholderia cepacia*)

Tableau 16 : Comparaison des identifications obtenues par séquençage de l'ADNr 16S avec celles obtenues par API 20 NE et Vitek 2, bioMérieux® [80]

Cette étude illustre l'importance cruciale de la base de données. Celle-ci n'est pas assez fréquemment mise à jour pour les techniques biochimiques (API, VITEK 2, bioMérieux®, BD Phoenix®) au regard des nombreux remaniements taxonomiques du genre *Pseudomonas.*

Par ailleurs, les performances des méthodes biochimiques, manuelles et automatisées sont souvent entachées par la faible variabilité métabolique et biochimique entre les espèces et l'absence de caractéristiques spécifiques d'espèces.

1.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'identification des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* peut-être réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) directement à partir de la colonie. La base de données Bruker® Species DB 5989 mise à jour en juillet 2015 comporte 80 espèces différentes de *Pseudomonas* (Tableau 17). Le nombre de MSP par espèce n'est pas disponible.

Pseudomonas *abietaniphila*	*Pseudomonas luteola*
Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas mandelii*
Pseudomonas agarici	*Pseudomonas marginalis*
Pseudomonas alcaligenes	*Pseudomonas mendocina*
Pseudomonas alcaliphila	*Pseudomonas migulae*
Pseudomonas anguilliseptica	*Pseudomonas monteilii*
Pseudomonas antarctica	*Pseudomonas mosselii*
Pseudomonas asplenii	*Pseudomonas mucidolens*
Pseudomonas avellanae	*Pseudomonas nitroreducens*
Pseudomonas azotifigens	*Pseudomonas oleovorans*
Pseudomonas azotoformans	*Pseudomonas orientalis*
Pseudomonas balearica	*Pseudomonas oryzihabitans*
Pseudomonas boreopolis	*Pseudomonas otitidis*
Pseudomonas brassicacearum	*Pseudomonas panipatensis*
Pseudomonas brenneri	*Pseudomonas pertucinogena*
Pseudomonas caricapapayae	*Pseudomonas pictorum*
Pseudomonas cedrina ssp cedrina	*Pseudomonas plecoglossicida*
Pseudomonas chlororaphis ssp chlororaphis	*Pseudomonas poae*
Pseudomonas cichorii	*Pseudomonas pohangensis*
Pseudomonas citronellolis	*Pseudomonas proteolytica*
Pseudomonas composti	*Pseudomonas pseudoalcaligenes ssp pseudoalcaligenes*
Pseudomonas congelans	*Pseudomonas putida*
Pseudomonas corrugata	*Pseudomonas resinovorans*
Pseudomonas extremorientalis	*Pseudomonas rhizosphaerae*
Pseudomonas flavescens	*Pseudomonas rhodesiae*
Pseudomonas fluorescens	*Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi*
Pseudomonas fragi	*Pseudomonas segetis*
Pseudomonas frederiksbergensis	*Pseudomonas sp*
Pseudomonas fulva	*Pseudomonas straminea*
Pseudomonas fuscovaginae	*Pseudomonas stutzeri*
Pseudomonas gessardii	*Pseudomonas synxantha*
Pseudomonas graminis	*Pseudomonas syringae ssp syringae*
Pseudomonas grimontii	*Pseudomonas taetrolens*
Pseudomonas indica	*Pseudomonas thermotolerans*
Pseudomonas jessenii	*Pseudomonas thivervalensis*
Pseudomonas jinjuensis	*Pseudomonas tolaasii*
Pseudomonas kilonensis	*Pseudomonas trivialis*
Pseudomonas koreensis	*Pseudomonas umsongensis*
Pseudomonas libanensis	*Pseudomonas vancouverensis*
Pseudomonas lundensis	*Pseudomonas veronii*
Pseudomonas lutea	*Pseudomonas viridiflava*
	Pseudomonas xanthomarina

Tableau 17 : Espèces de *Pseudomonas* sp. présentes dans la base de données MALDI-TOF Bruker biotyper®

La base de données Vitek® MS contient 12 espèces de *Pseudomonas* différentes (Tableau 18).

Identification affichée pour les sous-espèces, espèces ou groupes d'espèces		Espèces ou sous-espèces
Pseudomonas aeruginosa		*Pseudomonas aeruginosa*
Pseudomonas alcaligenes		*Pseudomonas alcaligenes*
Pseudomonas chlororaphis	(4)	*Pseudomonas chlororaphis* *Pseudomonas chlororaphis ssp aureofaciens* *Pseudomonas chlororaphis ssp chlororaphis*
Pseudomonas fluorescens		*Pseudomonas fluorescens*
Pseudomonas luteola		*Pseudomonas luteola*
Pseudomonas mendocina		*Pseudomonas mendocina*
Pseudomonas oleovorans		*Pseudomonas oleovorans*
Pseudomonas oryzihabitans		*Pseudomonas oryzihabitans*
Pseudomonas putida		*Pseudomonas putida*
Pseudomonas stutzeri		*Pseudomonas stutzeri*
Pseudomonas veronii		*Pseudomonas veronii*
Pseudomonas viridiflava		*Pseudomonas viridiflava*

Tableau 18 : Espèces de *Pseudomonas* sp. présentes dans la base de données MALDI-TOF Vitek MS bioMérieux®

La comparaison de la méthode d'identification par spectrométrie de masse sur automate Bruker biotyper® avec l'identification biochimique sur automate BD Phoenix® montre pour l'identification des bacilles à gram négatif au sens large que la spectrométrie de masse est statistiquement plus performante à l'échelle du genre et de l'espèce [18]. Cependant, parmi les 132 souches étudiées en tant que souches occasionnelles dans l'étude de Saffert *et al.* [18], seulement 10 souches de *Pseudomonas* sp. étaient incluses, et le succès de l'identification à l'espèce est comparable (5/10) avec les deux méthodes. Cette étude ne montre pas de supériorité de l'identification par spectrométrie de masse puisque les deux méthodes identifient correctement au rang du genre mais pas au rang de l'espèce (Tableau 19).

Isolate type and name	No. of isolates	No. of isolates identified to the indicated level by the:			
		BD Phoenix		Bruker Biotyper	
		Genus	Species	Genus	Species
Pseudomonas aeruginosa/fluorescens/putida	1	1	1	1	1
Pseudomonas fluorescens/putida	3	2	2	3	2
Pseudomonas luteola	2	2	2	2	2
Pseudomonas oryzihabitans	2	1	1	2	1
Pseudomonas sp.	2	2	0	2	0

Tableau 19 : Comparaison de la méthode d'identification BD Phoenix® et MALDI-TOF MS (Bruker®) pour les *Pseudomonas* sp. [18]

Almuzara *et al*. [81] ont évalué en 2015 les performances du MALDI-TOF MS en utilisant l'automate Bruker biotyper®. L'étude a porté sur 256 isolats de bacilles à gram négatif non fermentant appartenant à 29 genres différents dont 44 espèces de *Pseudomonas* (24 *aeruginosa*, 1 *oryzihabitans* ayant maintenant été exclu du genre, 4 *mendocina*, 13 *stutzeri*, 34 du groupe *putida*, 15 du groupe *fluorescens*). Les résultats obtenus par MALDI-TOF MS ont été comparés à ceux obtenus par des méthodes moléculaires (séquençage ADNr 16S en première intention). Le MALDI-TOF et le séquençage de l'ADNr 16S n'ont pas permis de discriminer les espèces au sein des groupes *putida* (*fulva, monteilii, mosselii, plecoglossicida, putida*) et *fluorescens* (*fluorescens, koorensis, libanensis, lundensis*) [81] mais l'identification a été correcte au rang de l'espèce pour *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. orizyhabitans* et *P. stutzeri*.

La comparaison de l'automate Bruker biotyper® avec le Vitek MS® pour l'identification des bacilles à gram négatifs non fermentant a montré des résultats combinés d'identification au genre-complexe-espèce meilleurs avec l'automate Bruker biotyper® (97% vs 89,5%) mais un recours nécessaire à l'étape d'extraction protéique plus fréquent. Cependant, la concordance de l'identification à l'espèce avec la méthode de référence a été comparable pour les deux méthodes [82] mais cette étude ne comportait que 4 souches de *Pseudomonas* sp. Une souche de *P. pseudoalcaligenes* a été identifiée au rang du genre avec Bruker® alors qu'aucune identification n'a été obtenue avec le Vitek MS, bioMérieux® (Tableau 20).

Conventional biochemical or molecular method identification	No. of isolates	Bruker Biotyper				Vitek MS				
		No. of isolates with agreement with:			No. of isolates with no identification	No. of isolates with agreement with:				No. of isolates with no identification
		Species	Complex	Genus		Species	Complex	Genus	Family	
Pseudomonas aeruginosa	73	73				73				
Pseudomonas aeruginosa, mucoid	16	16				16				
Pseudomonas pseudoalcaligenes	1			1[j]						1
Pseudomonas spp.	3			2[k]	1			2[k]		1

Tableau 20 : Comparaison des méthodes d'identification par spectrométrie de masse Bruker® et Vitek MS, bioMérieux® par rapport à l'identification conventionnelle biochimique ou moléculaire [82]

La méthode MALDI-TOF MS a permis d'améliorer l'identification de quatre souches de *Pseudomonas* qui étaient initialement identifiées par API20NE en groupe *fluorescens* : *libanensis*, *gessardi*, *tolaasii* et *koreensis* [83]. Mais aucune technique génotypique n'a servi de référence pour valider cette identification au rang de l'espèce.

Une étude multicentrique [51] concernant les bacilles à Gram négatif non fermentant s'est intéressée aux performances du MALDI-TOF MS par rapport à celles des techniques biochimiques classiques. Tous les isolats cliniques de bacilles à Gram négatif non fermentant autres que *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumanii* ont été inclus (n=173). Tous les isolats ont été identifiés par API20NE, par la carte ID-GN du Vitek 2 (bioMérieux®), par l'automate MALDI-TOF, Bruker® et par séquençage de l'ADNr 16S. Dans l'étude, le séquençage de l'ADNr 16S a identifié 26 *Pseudomonas* sp., 17 *Pseudomonas* appartenant au groupe *putida*, 9 *P. putida*, 4 *P. oryzihabitans*, 2 *P. entomophila/putida/mosselii*, 1 *P. monteilii*, 1 *P. mosselii*, 5 *Pseudomonas* appartenant au groupe *stutzeri*, 4 *P. stutzeri*, 1 *P. luteola*, 2 *P. fluorescens*, 4 *P. aeruginosa* (Tableau 21). Parmi les 173 souches cliniques étudiées, les *Pseudomonas* du groupe *putida* étaient prédominants [51].

Identification groups		API 20 NE					VITEK-2					MALDI-TOF-MS				
Species	*n*	DB	No-ID	Mis-ID	GLI	SLI	DB	No-ID	Mis-ID	GLI	SLI	DB	No-ID	Mis-ID	GLI	SLI
Pseudomonas putida group																
Pseudomonas putida	9	Y	2		7	5	Y			9	8	Y			9	5
Pseudomonas oryzihabitans	4	Y			4	3	Y			4	4	Y			3	3
Pseudomonas monteilii	1	N			1		N	1				Y			1	1
Pseudomonas mosselii	1	N	1				N		1			Y			1	
Pseudomonas stutzeri group																
Pseudomonas stutzeri	4	Y			4	4	Y			3	3	Y			4	4
Pseudomonas luteola	1	Y			1	1	Y			1	1	Y			1	1
Pseudomonas fluorescens	2	Y			2	1	Y			2	1	Y			2	2
Pseudomonas aeruginosa	4	Y	3		1	1	Y	1	2	1	1	Y			4	4

Tableau 21 : Identification des souches de *Pseudomonas* sp. par API20NE, Vitek2 (bioMérieux®) et MALDI-TOF MS (Bruker®) (Jacquier *et al.*) [83]

DB = base de données / No-ID = pas d'identification / Mis-ID = mauvaise identification / GLI = identification au rang du genre / SLI = identification au rang de l'espèce / Y= présents dans la base de données/ N= absent de la base de données.

Il est mis en évidence une meilleure identification au rang du genre pour le MALDI-TOF (92,9%) que pour les autres techniques API20NE (76,2%) et Vitek2 (80,8%). Le taux de germes non identifiés est plus bas avec le MALDI-TOF (4%) qu'avec les deux autres techniques : 19,8% et 13,1% respectivement.

Pour le genre *Pseudomonas*, l'inconvénient des techniques classiques (API20NE et Vitek2) est la faiblesse des bases de données. Avec le MALDI-TOF, toutes les souches sont identifiées au moins au rang de groupe et aucune n'était mal identifiée, contrairement aux deux autres techniques.

2) Moléculaires

Pour identifier au rang d'espèce les souches de *Pseudomonas* sp., le séquençage de fragments de divers gènes a été proposé.

2.1. ADNr16S

Le séquençage de l'ADNr 16S est admis comme une méthode pertinente pour attribuer une position taxonomique à une souche bactérienne [23, 30]. L'avantage de l'ADNr 16S est son universalité pour la détection d'ADN bactérien et la présence de régions conservées et variables. Les espèces au sein d'un même groupe ont des caractéristiques communes phénotypiques (métaboliques) et pathogènes. Par exemple, dans le cluster *fluorescens*, on retrouve principalement des espèces pathogènes des plantes ou des champignons (*chlororaphis, fluorescens*). Les espèces du cluster *aeruginosa* sont connues pour leur capacité de dénitrification (excepté *flavescens* et *resinovorans*) [44].

Grâce au développement d'amorces spécifiques du genre *Pseudomonas,* une PCR ADNr 16S a été développée pour la détection des *Pseudomonas* sp. directement à partir de prélèvements environnementaux [84].

Le premier inconvénient du séquençage de l'ADNr 16S est son pouvoir de discrimination insuffisant au sein du genre *Pseudomonas*. Ce gène montre en effet un faible polymorphisme pour certaines espèces (Annexe 3). Les similarités entre les espèces vont de 93,3% (entre *P. cichorii* et *P. citronellolis*) à 99,9% (entre *P. pseudoalcaligenes* et *P. oleovorans*). La région hypervariable *hv1* est connue pour être une zone discriminante entre les espèces. Cependant, selon les espèces, certaines régions sont plus discriminantes que d'autres. Par exemple, *P. stutzeri* et *P. alcaligenes* ont des région *hv1* et *hv2* identiques. Cependant, elles peuvent être distinguées grâce à un nucléotide différent dans la région *hv3*.

Dans le groupe *fluorescens*, la similarité va de 98,3 à 99,5%. Le groupe *syringae* inclut, lui, jusqu'à 40 pathovars qui ne peuvent pas être distingués par des techniques phénotypiques et sont différenciés par leur spécificité d'hôte.

Les autres limites de l'ADNr 16S, déjà évoquées, sont l'hétérogénéité des différents opérons ribosomaux et les éventuelles recombinaisons génétiques qui impactent respectivement sur la qualité et l'interprétation de la séquence obtenue.

Le séquençage ADNr 16S est donc controversé pour l'identification de certaines espèces de *Pseudomonas* sp. [81]. Ce problème a conduit à utiliser d'autres gènes pour l'identification génotypique.

2.2. *opr*F

OprF est une porine non spécifique, majoritaire dans la membrane externe des *Pseudomonas* sp. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la paroi [85]. Chez *P. fluorescens*, elle semble avoir un rôle dans le maintien de la morphologie bactérienne et la croissance dans les milieux à faible osmolarité. Cependant, elle ne semble pas être la voie privilégiée de passage des antibiotiques, notamment des béta-lactamines [86]. Elle semble être impliquée dans l'adhésion des espèces phytopathogènes aux racines des plantes [87].

Bodilis *et al*. [85 et 87] ont évalué l'intérêt de séquencer ce gène cible pour l'identification des espèces de *Pseudomonas* sp. La majorité des souches étaient des *Pseudomonas* du groupe *fluorescens,* préalabalement identifiés par API20NE, bioMérieux® [87]. Les amorces utilisées permettaient l'obtention d'un fragment d'environ

900-950 pdb. Ils ont ainsi décrit 5 clusters *vs* 3 avec l'ADNr 16S. Le groupe *fluorescens* est séparé en deux clusters distincts (*vs* 1 seul cluster pour l'ADNr 16S), de même pour le groupe *putida*. Ces clusters peuvent être corrélés à l'habitat de ces isolats permettant de différencier des niches écologiques [85, 87, 88].

L'inconvénient du gène oprF est qu'il n'existe pas de bases de données publiées disponibles.

2.3. rpoD

rpoD est le gène codant le facteur σ 70 de l'ARN polymérase. Cette protéine reconnaît des séquences spécifiques du promoteur lors de la transcription de l'ADN.

Les amorces décrites par Mulet et *al.* [89] permettent l'obtention d'un fragment amplifié de 736 pb.

L'évolution dans le temps du gène *rpoD* est beaucoup plus rapide que celle de l'ADNr 16S. Il présente un fort pouvoir de discrimination entre les espèces de *Pseudomonas* sp., une bonne spécificité et sensibilité des amorces utilisées [71 et 89].

Une étude regroupant 159 souches de *P. stutzeri* a montré de bons résultats d'identification avec le séquençage du gene *rpoD* en utilisant les amorces de Mulet *et al*. [71] Cela facilite la différenciation de génomovars parmi les *P. stutzeri* [71 et 89].

La base de données PseudoMLSA Database, publiée par Mulet *et al*. [89] contient peu de données non fiables mais doit être enrichie ; actuellement, elle contient 311 séquences du fragment *rpoD* de *Pseudomonas sp*. accessibles à tous [89, 90, 91, 92].

2.4. *rpoB*

Le gène *rpoB* code la sous-unité béta de l'ARN polymérase qui se fixe grâce au facteur sigma au promoteur d'un gène et permet la synthèse d'ARN messager à partir d'ADN (transcription). C'est un gène de ménage très conservé, existant en une seule copie chez toutes les espèces bactériennes du fait de son rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire. Une étude a évalué l'intérêt de séquencer le gène *rpoB* pour identifier au rang d'espèce 186 souches de *Pseudomonas* sp. représentant 75 espèces différentes [93]. Le fragment obtenu est de 1229 pb. La résolution est trois fois meilleure avec les séquences *rpoB* comparativement aux séquences ADNr 16S. Ce résultat est obtenu en comparant les distances phylogénétiques entre les espèces (longueur des branches). Les clusters contiennent un plus grand nombre d'espèces et la corrélation avec l'ADNr 16S est bonne [93]. 79,5% des souches ont été identifiées au rang de l'espèce. Parmi les 75 espèces

étudiées, certaines n'ont pas pu être identifiées. Le séquençage *rpoB* ne permet pas de distinguer les espèces *monteilii* et *putida*.

2.5. *oprI*

Le gène *oprI* code la lipoprotéine I constituant la membrane externe des *Pseudomonas sp.* L'amplification de ce gène montre une bonne spécificité en identifiant uniquement les *Pseudomonaceae* du groupe ARN I. L'avantage est que le fragment obtenu est court (249 pb) et le gène est présent en une seule copie sur le génome. [94, 95]

2.6. *gyrB*

L'ADN gyrase est une topo-isomérase de classe II constituée de deux sous-unités : la sous-unité A (codée par le gène *gyrA*) responsable du clivage de l'ADN et la sous-unité B (codée par le gène *gyrB*) qui hydrolyse l'ATP fixé permettant le relâchement de l'ADN. Yamamoto et Harayama [96] ont développé des amorces spécifiques du groupe *putida* permettant l'amplification d'un fragment de 966 pb. Le polymorphisme du gène *gyrB* est plus important que celui de l'ADNr 16S et permet de définir les relations phylogénétiques pour le groupe *putida*.

2.7. *oprD*

OprD est un gène codant une porine de la membrane externe à 8 boucles dont certaines sont impliquées dans la liaison et le transport des antibiotiques. La diminution ou la perte de l'expression de cette porine chez *P. aeruginosa* empêche l'entrée des carbapénèmes dans l'espace périplasmique et est responsable d'une résistance. L'analyse phylogénétique du gène *oprD* montre 3 clusters dans le groupe *fluorescens* (*vs* 1 cluster pour l'ADNr 16S) et seulement 1 pour les *putida*. Les séquences sont très conservées au sein d'un cluster mais très variables d'un cluster à l'autre. Le séquençage du gène *oprD* présente surtout un intérêt en terme d'analyse des relations phylogénétiques pour le groupe *fluorescens* et de distinction de niches écologiques [97].

3) Comparaison des méthodes d'identification phénotypiques et moléculaires (séquençage de l'ADNr 16S)

La technique d'identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF présente de nombreux avantages (Tableau 22). Les points forts sont la facilité d'utilisation, l'intégration facile de l'automate en routine au laboratoire, ne nécessitant pas d'équipements spécifiques en plus de l'automate. La rapidité et la réduction du délai de rendu des résultats sont importantes. On estime ce délai pour le MALDI-TOF à 6 minutes

vs 5 à 48h pour les techniques classiques biochimiques [11]. Contrairement à l'identification biochimique automatisée, l'identification peut-être disponible à J1 post-ensemencement, ce délai court permet une adaptation thérapeutique rapide. Avec le MALDI-TOF, il n'est plus nécessaire d'avoir réalisé au préalable les tests phénotypiques d'orientation, contrairement aux méthodes biochimiques conventionnelles pour lesquelles il est obligatoire de choisir une carte d'identification correspondant à un groupe bactérien ou une famille de bactéries. De plus, la base de données MALDI-TOF, Bruker daltonics® contient 10 fois plus d'espèces de *Pseudomonas* différentes que celle des techniques biochimiques classiques (80 espèces vs 5 à 8) mais elle reste assez faible sur l'automate Vitek MS, bioMérieux®. L'intégration est très facile dans le système automatisé du laboratoire, la traçabilité est excellente, parfaitement compatible avec les exigences d'accréditation. Le coût technique au quotidien n'est pas très important (faible coût de la matrice, réutilisation des cibles après lavage). Ce coût est estimé à 2,44 euros pour l'identification par MALDI-TOF vs 4,60 à 13,85 euros pour les autres techniques phénotypiques [11]. Ce coût tient compte des consommables, du salaire du personnel, de la perte de la valeur de l'automate sur cinq ans, etc.

Critères	Spectrométrie de masse MALDI-TOF	Identification biochimique classique	Identification génomique séquençage ADNr16S
Coût consommables	+	++	+++
Temps technique	+	++	+++
Délai rendu résultat	J1	J2	variable
Nécessité d'orientation diagnostique préalable	non	oui	non
Compétence technique	+	+	+++
Richesse base de données	++	+	+++

Tableau 22 : Comparaison de trois méthodes d'identification : spectrométrie de masse MALDI-TOF, identification biochimique semi-automatisée et identification génomique par séquençage de l'ADNr16S.

Les inconvénients de la technique MALDI-TOF sont le coût de l'automate par rapport à celui d'un automate d'identification en milieu liquide. De plus, l'acquisition d'un automate MALDI-TOF se surajoute souvent à celle d'un automate d'indentification en

milieu liquide. En effet, les laboratoires utilisent fréquemment ce dernier pour la réalisation d'antibiogramme en milieu liquide [98].

La faiblesse actuelle des bases de données pour les souches environnementales peut-être un problème pour l'identification des espèces peu fréquemment rencontrées en clinique humaine, comme les *Pseudomonas* non *aeruginosa*.

Les limites de la spectrométrie de masse dans l'identification de certains germes peuvent parfois s'expliquer pour des espèces très proches sur le plan phylogénétique. Dans ce cas, l'analyse spectrale des protéines ribosomales est insuffisante et par conséquent l'amplification du gène de l'ARN16S ne permettra pas d'améliorer l'identification du germe car il s'agit d'un ADN ribosomique. Par exemple, le séquençage de l'ADNr 16S n'est pas plus performant que le MALDI-TOF pour différencier les espèces *putida* et *mosselii* [99].

Il est alors nécessaire de séquencer des gènes domestiques différents du gène ADNr 16S.

4) Apport du séquençage d'autres gènes à l'identification bactérienne

La tendance actuellement est de proposer le séquençage d'un ou plusieurs gènes domestiques en complément du séquençage de l'ADNr 16S pour une étude phylogénétique optimale. Le choix du gène à séquencer est fonction de plusieurs critères.

La taille du fragment amplifié à séquencer est importante car le fragment à séquencer ne doit pas être trop long pour obtenir une séquence de qualité et faciliter la lecture.

Il est nécessaire que la base de donnée soit facile d'utilisation, comme la base de données BIBI (Bio Informatic Bacterial Identification) [100, 101].

Elle doit aussi être la plus complète possible et actualisée avec les changements taxonomiques. Elle doit être de bonne qualité. En effet, la qualité des bases de données publiques est critiquable. Les séquences sont déposées indépendamment de leur qualité.

La présence du gène en une seule copie permet un séquençage optimal.

Les valeurs des bootstraps dans l'arbre phylogénétique qui illustrent les liens entre espèces doivent être élevées. En effet, le bootstrap permet de témoigner de la robustesse de l'arbre. Pour déterminer ces valeurs, il faut échantillonner les positions de l'alignement pour relancer la construction phylogénétique de façon répétée ($n > 1000$). Une valeur de bootstrap est donnée à chaque branche de l'arbre phylogénétique obtenu et indique le

nombre de fois que cette configuration été retrouvée au cours des échantillonnages. La valeur peut aller de 0 à 100%.

Enfin, il est important que ces gènes ne se transmettent pas horizontalement par recombinaison et le taux d'évolution du gène cible doit être plus important que celui de l'ADNr 16S [102].

Pour identifier des souches de *Pseudomonas* sp., Flores Ribeiro *et al*. [92] ont utilisé le séquençage du gène *oprF* (amorces de Bodilis *et al*. [85 et 87]) et *rpoD* (amorces de Mulet *et al*. [89]) car ils présentent un fort pouvoir discriminant au sein de ce genre et une histoire évolutive avec quelques transferts latéraux.

L'étude conjointe des gènes *gyrB*, *rpoD* et de l'ADNr 16S [102] montre une topologie semblable des arbres phylogénétiques. Les *Pseudomonas sp*. sont regroupés en deux clusters. Un premier cluster regroupe 13 *P. putida* incluant les espèces du biovar A et un deuxième cluster incluant les espèces du biovar B, les *P. fluorescens* et *P. chlororaphis*. Le séquençage des régions variables V1-V8 de l'ADNr 16S permet d'obtenir un arbre avec deux clusters : un cluster *putida* et un cluster *fluorescens/chlororaphis*. La corrélation entre les distances génétiques obtenues avec les gènes *rpoD*, *gyrB* est meilleure quand le séquençage est réalisé en excluant les régions variables de l'ADNr 16S. Il est donc conseillé d'utiliser le séquençage du gène de l'ADNr 16S en excluant les régions variables [102].

Vaz-Moreira *et al*. [103] ont identifié les souches de *Pseudomonas* sp. par séquençage de l'ADNr 16S. En complément, le séquençage des gènes *rpoD*, *rpoB* et *gyrB* a été réalisé. L'identification à l'espèce coïncide entre le séquençage du gène ADNr 16S et celui des autres gènes. Pour certaines espèces (*P. jessenii*, *P. toyotomiensi*, *P. koreensis*, *P. peli*) le voisin le plus proche dans l'arbre phylogénétique est différent entre celui obtenu avec l'ADNr 16S et celui obtenu avec les trois autres gènes [103]. Pour d'autres espèces, ce le voisin le plus proche dans l'arbre phyloégéntique diffère pour chacun des quatres gènes. (*P. argentina, P. poae, P. veronii, P. xanthomarina, P. arsenicoxidans, P. thivervalensis*).

Il semble que la meilleure conduite à tenir soit d'utiliser le séquençage de gènes domestiques (*rpoD, oprF, rpoB,* etc.) Si le séquençage du gène de l'ADNr 16S est utilisé, il faut préférer l'exclusion des régions variables V1 à V8.

6. Profil de sensibilité aux antibiotiques

Les données concernant la résistance bactérienne des *Pseudomonas* non *aeruginosa* sont rares, du fait de leur implication faible en clinique humaine. On se réfère le plus souvent aux résistances décrites chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Trois études ont déterminé les profils de résistance aux antibiotiques de souches de *Pseudomonas* sp. isolées de prélèvements d'eaux potables (Flores Ribeiro *et al*.[92] et Vaz-Moreira *et al.*[103]) et d'eaux usagées (Luczkiewicz *et al*.[104]). Les résistances sont citées molécule par molécule mais sans chercher à déterminer les mécanismes en jeu.

Flores Ribeiro *et al*. [92] ont décrit 580 souches de *Pseudomonas* sp. isolées de prélèvements d'eaux résistantes à au moins une molécule. Parmi les 39 souches isolées dans les prélèvements de réservoir d'eau potable, 8 souches ont été caractérisées comme appartenant au genre *Pseudomonas stricto sensu* à l'aide d'une PCR spécifique du gène *oprI*. C'est ensuite un séquençage du gène *oprF* et *rpoD* qui a permis d'identifier l'espèce. Les souches appartennaient au groupe *fluorescens* et au groupe *putida*. La plupart étaient résistantes à 4-6 molécules ; les résistances les plus fréquentes étaient celles à la ticarcilline, l'association ticarcilline et acide clavulanique, la cefsulodine, l'aztréonam, la fosfomycine et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. Aucune résistance à la gentamicine et à la lévofloxacine n'a été décrite [92].

Vaz-Moreira *et al*. [103] ont décrit les profils de sensibilité aux antibiotiques de 138 *Pseudomonas* sp. identifiés par le séquençage des gènes *rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, *recA* et ITS (internal transcribed spacer). Les souches étaient résistantes à 3 antibiotiques ou plus dans la moitié des cas. Ils ont majoritairement retrouvé des résistances à la ticarcilline (84%) et à l'association ticarcilline-acide clavulanique (80%) et plus rarement des résistances à la ceftazidime (18%) et au céfépime (2%) [104]. L'espèce la plus résistante était *P. chlororaphis* (groupe *fluorescens*). Dans cette étude, aucune résistance plasmidique n'a été mise en évidence. Ces données sont à prendre avec précaution du fait de la non connaissance des mécanismes de résistance naturelle chez les espèces autres qu'*aeruginosa*.

Dans l'étude de Luczkiewicz *et al.*[104], les 146 souches collectées, identifiées par automate BD, Phoenix®, étaient majoritairement des *P. putida* (60%), puis des *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. protegens* et *P. mandelii.* Les souches étaient majoritairement résistantes à la ticarcilline (63,7%), à l'association ticarcilline-acide clavulanique (40,4%) et à l'aztreonam (54,8%). Une souche de *P. putida* et une

souche de *P. pseudoalcaligenes* étaient résistantes à la pipéracilline et à l'association pipéracilline et tazobactam. Une souche de *P. putida* (n=1/146) était considérée comme toto-résistante (résistance aux béta-lactamines, aminosides et fluoroquinolones et excepté à la colistine).

Une autre étude a évalué la sensibilité aux antibiotiques de 320 souches cliniques de *Pseudomonas* sp. dont la méthode d'identification n'était pas précisée (Tableau 23). Les valeurs de CMI les plus basses étaient observées pour le céfépime et l'amikacine pour les espèces *putida/fluorescens.* Par ailleurs, *P. stutzeri* présentait très peu de résistances avec des profils de sensibilité allant de 91,9% à 100% selon les antibiotiques. [72]

Antimicrobial agent (no. tested)	MIC (mg/l)			% susceptible[a]	% resistant[a]
	50%	90%	Range		
Pseudomonas fluorescens/putida (253)					
Ceftriaxone	16	>16	≤0.25->16	31.6	46.6
Ceftazidime	4	>16	≤2->16	81.3	11.9
Cefepime	4	16	≤0.12->16	84.2	6.3
Piperacillin	8	128	≤1->128	76.7	11.5
Piperacillin/Tazobactam	8	>64	≤0.5->64	80.2	10.3
Ticarcillin/Clavulanate	128	>128	≤16->128	13.5	69.8
Aztreonam	>16	>16	≤0.12->16	25.0	57.5
Imipenem	1	8	≤0.5->8	82.5	8.7
Meropenem	2	>8	≤0.06->8	73.7	15.9
Ciprofloxacin	≤0.25	>2	≤0.25->2	78.3	19.0
Gatifloxacin	1	>4	≤0.03->4	76.7	16.2
Levofloxacin	≤0.5	>4	≤0.5->4	79.8	15.0
Amikacin	2	32	≤0.25->32	88.5	9.1
Gentamicin	≤2	>8	≤2->8	79.0	19.0
Tobramycin	0.5	>16	≤0.12->16	83.7	15.1
Tetracycline	≤4	>8	≤4->8	53.4	44.3
Trimethoprim/Sulphamethoxazole	>2	>2	≤0.5->2	22.1	77.9
Polymyxin B[b]	≤1	>8	≤1->8	82.3	17.7
Pseudomonas oryzihabitans (30)					
Ceftriaxone	2	>32	≤0.25->32	70.0	20.0
Ceftazidime	≤1	16	≤2->16	86.7	10.0
Cefepime	0.25	16	≤0.12->16	86.7	6.7
Piperacillin	2	128	≤1->128	83.3	13.3
Piperacillin/Tazobactam	2	16	≤0.5->64	90.0	10.0
Ticarcillin/Clavulanate	≤16	128	≤16->128	70.0	13.3
Aztreonam	16	>16	0.5->16	36.7	40.0
Imipenem	≤0.5	1	≤0.5->8	96.7	3.3
Meropenem	≤0.06	2	≤0.06->8	93.3	6.7
Ciprofloxacin	≤0.25	>2	≤0.25->2	80.0	16.7
Gatifloxacin	0.12	4	≤0.03->4	83.3	6.7
Levofloxacin	≤0.5	4	≤0.5->4	83.3	6.7
Amikacin	0.5	32	≤0.25->32	86.7	10.0
Gentamicin	≤2	>8	≤2->8	80.0	16.7
Tobramycin	≤0.12	>16	≤0.12->16	80.0	16.7
Tetracycline	≤4	>8	≤4->8	70.0	23.3
Trimethoprim/Sulphamethoxazole	1	>2	≤0.5->2	70.0	30.0
Polymyxin B[b]	≤1	2	≤1->8	94.1	5.9
Pseudomonas stutzeri (37)					
Ceftriaxone	1	4	≤0.25–8	100.0	0.0
Ceftazidime	≤2	≤2	≤2–8	100.0	0.0
Cefepime	≤0.12	2	≤0.12–4	100.0	0.0
Piperacillin	2	4	≤1–64	97.3	0.0
Piperacillin/Tazobactam	1	4	≤0.5–32	97.3	0.0
Ticarcillin/Clavulanate	≤16	≤16	≤16	100.0	0.0
Aztreonam	0.5	8	≤0.12->16	91.9	5.4
Imipenem	≤0.5	≤0.5	≤0.5–2	100.0	0.0
Meropenem	0.12	0.5	≤0.06–0.5	100.0	0.0
Ciprofloxacin	≤0.25	≤0.25	≤0.25	100.0	0.0
Gatifloxacin	0.12	0.25	≤0.03–0.5	100.0	0.0
Levofloxacin	≤0.5	≤0.5	≤0.5	100.0	0.0
Amikacin	1	2	≤0.25–32	97.3	0.0
Gentamicin	≤2	≤2	≤2->16	97.3	2.7
Tobramycin	0.25	1	≤0.25–8	97.3	0.0
Tetracycline	≤4	≤4	≤4->8	97.4	2.6
Trimethoprim/Sulphamethoxazole	≤0.5	2	≤0.5->2	91.9	8.1
Polymyxin B[b]	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0

Tableau 23 : Profil de résistance aux antiobiotiques testés selon les espèces de *Pseudomonas sp*. [72]

Ces études mettent en évident la présence de *Pseudomonas* sp. résistants aux antibiotiques dans les eaux potables et usagées sous la pression de sélection.

Actuellement, de nombreuses études décrivent des résistances aux carbapénèmes.

Récemment, Angeletti S *et al*. [105] ont réalisé des écouvillonnages rectaux, nasaux et pharyngés dans un centre accueillant des réfugiés politiques syriens en Italie. Ils ont isolé, dans les écouvillonnages rectaux principalement de nombreux *Pseudomonas*, rarement isolés en Europe dans ce type de prélèvement. Les souches ont été identifiées à l'aide d'un automate MALDI-TOF (Brucker® daltonics) comme appartenant aux espèces *putida, monteilii, mosselli et fulva*. Chez ces quatre espèces, une résistance au méropénem a été détectée. Cependant le mécanisme de résistance n'a pas été caractérisé.

De nos jours, l'existence de mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques chez les *Pseudomonas* non *aeruginosa* intéresse de plus en plus le milieu médical : ces souches pourraient avoir un rôle en tant que réservoir et donc être un potentiel disséminateur de mécanismes de résistances. Plusieurs publications relatent la présence de carbapénémases de classe B (métallo-béta-lactamases de type IMP, VIM) et plus rarement de classe A (type KPC) chez certaines espèces. L'espèce la plus souvent décrite dans ces études est *P. putida* (Tableau 24). Des métallo-béta-lactamases chromosomiques ont été décrites chez *P. otitidis* (POM-1) [106] et *P. alcaligenes* (PAM-1) [107]. Ces deux enzymes, proches de l'enzyme MBL de type L1 retrouvé chez *Stenotrophomonas maltophilia*, hydrolysent faiblement les carbapénémes, mais ces souches peuvent devenir totalement résistantes aux carbapénèmes quand se surajoutent des mécanismes d'imperméabilité de la membrane externe.

Le support génétique de la résistance aux carbapénèmes n'est pas toujours connu. Lorsqu'il a été caractérisé, il s'agit le plus souvent d'une cassette de gènes au sein d'un intégron de classe 1 ou 3. Certaines études ont essayé des expériences de transférabilité à des *P. aeruginosa* par conjugaison sans succès. Le plasmide porteur du gène codant l'enzyme IMP-12 retrouvé chez *P. putida* n'est pas auto-transférable par conjugaison chez un *P. aeruginosa* et *Escherichia coli* mais il est transférable par électroporation [108], à l'instar du gène VIM-1 retrouvé sur l'intégron In110 chez un *P. putida* [109].

Malgré l'absence d'études montrant la transmission par conjugaison de tels gènes de résistances, d'autres données suggèrent qu'il existe un support plasmidique et/ou chromosomique. En effet, Senda *et al*. [110] ont décrit un gène de cassette IMP précédé d'une intégrase de classe 3 IntI3 et suivi d'un gène de cassette aac(6')-Ib (codant pour la résistance aux aminosides) plus ou moins conservés parmi les souches étudiées (Figure

15). Cela suggère la propagation de ces cassettes de gènes au sein de ces bacilles à gram négatif [110].

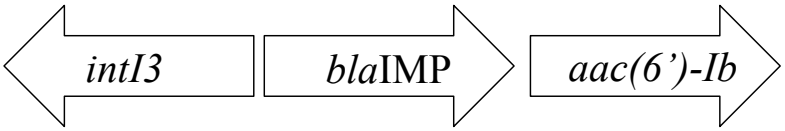


Figure 15 : Schéma simplifié du support génétique de la résistance aux antibiotiques chez une souche de *P. putida* [110]

Juan C *et al*. [111] se sont intéressés à des souches produisant une métallo-bétalactamase et ont décrit un gène VIM-2 localisé dans un intégron de classe 1 avec un motif GGG entre -10 et -35 activant le promoteur P2, flanqué d'une transposase. Ce transposon est le même chez les souches de *P. aeruginosa* et de *P. putida*, suggérant le rôle de *P. putida* dans la dissémination de VIM-2. Il est accompagné d'un module de transposition suggérant que l'intégron VIM-2 peut être mobilisé en utilisant la machinerie *tni* [111].

Le tableau 24 résume les carbapénémases caractérisées chez différentes souches de *Pseudomonas* non *aeruginosa.*

espèce	pays	date	enzyme	localisation	isolats	support génétique	identification	conjugaison	électroporation	références
putida	Italie	2002	VIM-1	urine (infection urinaire)	3	cassette intégron classe 1 plasmidique	ID32GN	échec	ND	Lombardi *et al*.
putida	Argentine	2007	VIM-2	cathéter urétral, aspiration trachéale	2	ND	API20NE	ND	ND	Almuzara *et al*.
putida	Japon	1996	IMP	ND (clinique)	1	cassette intégron classe 3	ND	ND	ND	Senda et al
monteilii	Belgique	2011	IMP-13	surface	1	cassette intégron classe 1 chromosomique	16S (*P. putida* au vitek)	ND	échec	Bogaerts *et al*.
putida	Italie	2009	KPC-2	liquide de transplantation hépatique	1	ND	Vitek puis 16S	ND	ND	Bennett *et al*.
putida	Japon	2005	IMP-1	urine (infection urinaire)	4	ND	ND	ND	ND	Horii *et al*.
putida	Italie	2003	IMP-12	urine (infection urinaire)	1	cassette intégron classe 1	ND	échec	oui	Docquier *et al*.
putida	Espagne	2014	4 VIM-2 1 VIM-1 et 2	3 urines 1 hémoculture 1 inguinal	5	chromosomique	ND	échec	échec	Viedma *et al*.
putida	Espagne	2010	2 VIM-1 6 VIM-2	1 urine 3 hémocultures 1 cathéter 2 péritonéaux 1 crachat	8	cassette intégron classe 1 7 plasmidiques 1 chromosomique	API20NE	nd	oui	Juan *et al*.

Tableau 24 : Carbapénémases isolées chez des espèces de *Pseudomonas* non *aeruginosa* (nd=non déterminé) [108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116]

Très fréquemment, les isolats cliniques sont porteurs de gènes cryptiques codant une carbapénèmase avec un bas niveau de résistance aux carbapénèmes. Le carbapénème principalement touché par ces enzymes est le méropénème. C'est l'association de ce mécanisme avec la diminution de la production des porines Outer Membrane Protein (OMP) qui explique les CMI augmentées des carbapénèmes chez certaines souches de *P. putida* [112].

Les données bibliographiques sur la résistance aux carbapénèmes concernent principalement l'espèce *P. putida*, mais les méthodes d'identification utilisées dans ces publications sont parfois des techniques phénotypiques avec des bases de données peu diversifiées. Ce biais peut aussi être dû au fait que l'on s'intéresse majoritairement dans ces études à des souches cliniques, au sein desquelles l'espèce *P. putida* est une des plus fréquemment recontrées [51].

Concernant la résistance aux quinolones, il a été décrit des souches de *P. putida* avec des CMI allant de 8 à >128 mg/L pour la norfloxacine, la gatifloxacine, la sitafloxacine, la levofloxacine, la sparfloxacine et la pazufloxacine) ; elles présentaient des mutations dans *gyrA*, *gyrB* et *parC*. Ces mutations étaient également retrouvées chez *P. aeruginosa* [112].

L'étude de Poole K. [117] a montré l'expression de pompes d'efflux chez *P. putida,* homologues aux systèmes d'efflux RND-MFP-OMF. Fukumori *et al*. [118] ont décrit chez *P. putida* le système d'efllux MepABC, très proche du système d'efflux MexAB-OprM décrit chez *P. aeruginosa.* Il concerne à la fois les solvants organiques mais aussi certains antibiotiques (béta-lactamines, tétracycline) [118]. D'autres systèmes d'efflux ont été décrits tels que TtgDEF, ArpABC et TtgABC chez des souches de *P.putida* [112].

Les connaissances en terme de sensibilité aux antibiotiques sont faibles concernant les *Pseudomonas* non *aeruginosa*. Mais l'émergence de résistance aux carbapénèmes, molécules de dernier recours, suggère la possibilité d'un réservoir environnemental de gènes de résistance même si la transférabilité à des germes pathogènes tels que *P. aeruginosa* n'est pas évidente.

7. Profil de sensibilité aux désinfectants

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont habituellement sensibles aux antiseptiques à base d'ammoniums quaternaires dont le plus couramment utilisé le chlorure de benzalkonium. Ces bactéries sont sensibles à l'hypochlorite de sodium à 1 %, à l'éthanol à 70 %, au glutaraldéhyde à 2 % et au formaldéhyde.

Les résistances naturelles concernent des désinfectants utilisés pour traiter l'eau potable tels que le chlore, les chloramines, l'ozone et l'iode.

La persistance de bactéries dans les solutions d'antiseptiques est une préoccupation actuelle (espèce *fluorescens*) [119, 120].

Des résistances aux antiseptiques sont actuellement décrites chez les bacilles à gram négatif non fermentant. Des résistances aux désinfectants sont décrites chez 5 souches de *P. fluorescens* [121] (1 souche isolée d'une solution désinfectante et 4 souches cliniques). Cette résistance concerne les surfactants cationiques de la famille des ammoniums quaternaires (notamment chlorure de benzalkonium, chlorure de cetylpyridinium, chlorure de benzéthonium). Deux mécanismes de résistance sont décrits pour le chlorure de benzalkonium : une diminution de l'absorption à la surface de la cellule et par un mécanisme énergie dépendant d'expression de pompes d'efflux [121]. Il existe des gènes localisés sur des intégrons de classe 1 notamment *qac*E impliqués dans la résistance à au moins 30 composés cationiques [122].

III. Le dossier de validation de méthode

Depuis 2007, les laboratoires (privés ou publics) de biologie médicale en France sont soumis à la norme NF EN ISO 15189 et 17025. Cette norme spécifie les exigences de la qualité des prestations fournies par les laboratoires de biologie médicales auprès des prescripteurs [123].

En 1994, le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) a été créé puis désigné en 2008 comme unique instance nationale d'accréditation.

Les objectifs des laboratoires sont les suivants :

- être entré dans la démarche d'accréditation le 31 octobre 2013
- avoir au moins 50% des examens accrédités avant le 30 octobre 2016 et au moins 80% d'ici 2017 puis 100% en 2020

Le système d'assurance qualité (SAQ) couvre toute les exigences qualité de l'activité du laboratoire : processus de management, processus supports, processus pré-analytique, analytique et post-analytique.

La constitution d'un dossier de validation de méthode pour une analyse concerne le processus analytique. De nombreux documents édités par le COFRAC tels que le SH GTA 04, détaillent les exigences concernant cette validation de méthode. Ce sont ces documents qui aident les laboratoires de biologie médicale dans leur démarche d'accréditation [124].

Avant la constitution du dossier de validation de méthode, le laboratoire se doit de connaître les critères de performance à vérifier qui dépendent du type de méthode à accréditer.

Pour cela il faut distinguer :

- les méthodes qualitatives, non numériques, nécessitant parfois une lecture subjective
- les méthodes quantitatives, fournissant des résultats issus de données numériques
- les méthodes assimilées semi-quantitatives ou semi-qualitatives (par exemple : une interprétation qualitative à partir d'un résultat quantitatif comparé à un seuil) qui doivent être considérées comme des méthodes quantitatives.

Les examens de biologie médicale à accréditer doivent être définis par le laboratoire en tant que processus simple (une seule méthode/étape/processus) ou processus complexe (enchaînement de plusieurs méthodes/étapes/sous-processus)

Les critères de performance sont dépendants de la portée d'accréditation. Il s'agit de l'énoncé précis des activités pour lesquelles le laboratoire demande l'accréditation. Le SH REF 08 définit les deux types de portées flexibles d'accréditation.

La portée flexible standard A permet de mettre en place sous accréditation des méthodes adoptées, sans évaluation spécifique et préalable, en respectant les performances annoncées par le fournisseur. C'est la vérification de méthode.

La portée flexible étendue B permet de mettre en œuvre des méthodes adaptées/développées à partir de méthodes déjà définies. Cela peut être une méthode mise en place par le laboratoire ou une adaptation d'une méthode validée pour l'ajuster aux besoins du laboratoire. On parle dans ce cas de validation de méthode [125].

Les critères de performance sont explicités dans le SH GTA 04 du COFRAC (Tableau 25) [124].

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
Fidélité *(répétabilité et fidélité intermédiaire)*	*Essai*	*Essai*	*Essai*	*Essai*
Justesse/exactitude *(approche)*	*Essai*	*Essai*	*Essai*	*Essai*
Incertitudes/facteurs de variabilité *et évaluation*	*Essai*	*Maîtrise des facteurs de variabilité*	*Essai*	*Maîtrise des facteurs de variabilité*
Comparaison *avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir[9], EBMD) et analyse des discordances[10]*	*Essai*	*Essai*	*Essai*	*Essai*
Intervalle de mesure ***(Limite de quantification et limites de linéarité)***	*Bibliographie*	*/*	*Essai*	*/*
Interférences *(lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, …)*	*Bibliographie*	*Bibliographie*	*Essai*	*Essai*
Contamination *entre échantillons (s'il y a lieu)*	*Bibliographie*	*Bibliographie*	*Essai*	*Essai*
Robustesse	*Bibliographie*	*Bibliographie*	*Essai*	*Essai*
Stabilité réactifs *(après ouverture, embarqués)*	*Bibliographie*	*Bibliographie*	*Essai*	*Essai*
Intervalle de référence *(valeurs usuelles)*	*Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)*	*Bibliographie*	*Essai*	*Essai*
Limite de détection	*/*	*Bibliographie*	*/*	*Essai*
Spécificité/sensibilité analytique	*/*	*Bibliographie*	*/*	*Essai*
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude[11] de la méthode ou du système analytique.				

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Tableau 25 : Performances à évaluer lors d'une vérification (portée A) / validation de méthode (portée B) [125]

TRAVAIL PERSONNEL

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce travail a porté sur l'identification et la caractérisation phénotypique et moléculaire de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa*.

L'objectif de l'étude était de procéder à la validation de méthode en portée B flexible de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant comme méthode de référence l'identification moléculaire par séquençage de l'ADNr 16S et du gène *rpoD*. Pour cela, une collection de souches de *Pseudomonas* sp. de prélèvements environnementaux et cliniques a été utilisée

Par ailleurs, le profil de résistance de chaque souche a été étudié pour évaluer le risque sanitaire lié à l'antibiorésistance des *Pseudomonas* sp. d'origine hydrique.

MATERIEL ET METHODES

I. Validation de méthode de l'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Le dossier de validation de méthode concerne ici le domaine de la Biologie Médicale, sous-domaine Microbiologie, sous-famille Bactériologie (BACTH). Il s'agit d'une méthode qualitative de portée flexible B (Tableau 26).

Code	Nature de l'échantillon	Nature de l'analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode
BA5	Culture bactérienne	Identification de germes bactériens	Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	Méthode reconnue, adaptée ou développée (B)

Tableau 26 : Portée d'accréditation pour l'analyse « identification de germes bactériens »

Les items à valider pour notre méthode sont : la répétabilité, la fidelité intermédiaire, la variabilité inter-opérateurs, la sensibilité et spécificité analytique, l'incertitude de mesures, la contamination, la robustesse et la stabilité des réactifs et la comparaison de méthodes.

1. Principe de la méthode

La méthode est une analyse d'identification de germes bactériens par une technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur colonies bactériennes (voir partie I.1.3. Identification par spectrométrie de masse)

2. Souches étudiées

Sept souches de référence de la collection de l'institut Pasteur à Paris (CIP) correspondant à des souches ATCC ont été utilisées pour la validation de méthode (Tableau 27). Cinq espèces de *Pseudomonas* sp ont été choisies car elles sont fréquemment rencontrées dans les prélèvements d'eaux d'après les données du laboratoire et celles de la littérature [126] : *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* subsp. *syringae* et *P. stutzeri*.

Les deux témoins « négatifs » choisis étaient des espèces d'un genre différent mais proche du genre *Pseudomonas : Stenotrophomonas maltophilia* et *Sphingomonas paucimobilis.*

N°	Désignation de la souche	N° ATCC	N° CIP
1	*Pseudomonas aeruginosa*	27853	76.110
2	*Stenotrophomonas maltophilia*	13637	60.77T
3	*Pseudomonas fluorescens*	13525	69.13T
4	*Pseudomonas putida*	12633	52.191T
5	*Pseudomonas stutzeri*	17588	103022T
6	*Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*	19310	106698T
7	*Sphingomonas paucimobilis*	29837	100752T

Tableau 27 : Souches ATCC utilisées pour la validation de méthode de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

3. Maîtrise des risques

Pour respecter les exigences de la norme, le laboratoire doit tout faire pour connaître les risques potentiels pouvant entraîner le rendu d'un résultat erroné. Le but est de bien identifier les risques, les évaluer pour pouvoir les maîtriser. La méthode des 5M (Matière, Matériel, Milieu, Méthode, Main d'œuvre) a été utilisée en envisageant tous les points critiques. Elle concerne la matière (échantillon), le milieu (conditions environnementales), le matériel (équipements et réactifs), la méthode et la main-d'œuvre. [127]

Une analyse AMEDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité) permet d'évaluer la criticité d'un risque.

À chaque risque identifié a été attribué un indice de criticité calculé de la manière suivante : fréquence × indice de gravité × indice de détection

Les 3 paramètres sont définis de la manière suivante :

Evaluation de la fréquence

- ½ fois par an 1
- 1 fois par trimestre 2
- ½ fois par mois 3
- 1/3 fois par semaine 4
- 1 fois par jour 5

Evaluation de la gravité

- sans conséquence visible 1
- conséquence visible mais faible 2
- conséquence grave mais réversible 3
- conséquence grave et irréversible 4
- conséquence extremement grave 5

Evaluation de la détéctabilité

- détectable automatiquement 1
- faiblement détectable 2
- détection non spontanée 3
- difficilement détectable 4
- indétectable 5

Le score final a été pondéré par le coefficient de maîtrise du risque par le calcul :

indice de criticité × maîtrise du risque

Le coefficient de maîtrise du risque est évalué de la manière suivante :

Evaluation de l'efficacité des actions de maîtrise mises en œuvre par le laboratoire :

- actions de maîtrise efficaces et utilisées par tous 0,5
- actions de maîtrise efficaces et utilisées par une ou plusieurs personnes 0,7
- actions de maîtrise partiellement efficaces et utilisées par tous 0,8
- actions de maîtrise partiellement efficaces et utilisées par une ou plusieurs personnes 0,9
- absence d'actions de maîtrise ou actions inefficaces 1

4. Validation technique : évaluation des performances de la méthode

1) Répétabilité

La répétabilité consiste à analyser un même échantillon par le même opérateur dans les même conditions avec les même réactifs et instruments le même jour.

La répétabilité a été évaluée en réalisant 10 fois le dépôt de chacune des 7 souches ATCC dans les conditions standard recommandées par le fournisseur (culture de 18h sur gélose au sang) le même jour par le même utilisateur (n=70) sur la même cible.

2) Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire consiste à tester la reproductibilité de la méthode. Cela consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un paramètre : l'opérateur, le temps, les réactifs et instruments. Pour cela, les 7 souches ATCC ont été déposées en double 5 jours différents, sur 5 cibles différentes et par des opérateurs différents (n=70). Les opérateurs étaient 5 personnes habilitées au dépôt sur cible MALDI.

3) Variabilité inter-opérateurs

Pour maîtriser la variabilité inter-opérateurs, il faut vérifier la formation et l'habilitation des opérateurs. La variabilité inter-opérateurs est prise en compte dans les essais de Fidélité intermédiaire.

4) Sensibilité et spécificité analytique

Pour notre méthode qualitative en portée B, la sensibilité et la spécificité ont été étudiées par une analyse bibliographique. A la place des termes sensibilité et spécificité, la notion de concordance au genre et à l'espèce est préférable pour une méthode d'identification microbienne. Elle est prise en compte dans la comparaison de méthode avec la méthode de référence (voir 8-Comparaison des méthodes).

5) Incertitude de mesures

Cette évaluation a été réalisée dans l'étape d'analyse des risques avec la méthode des 5M.

6) Contamination

La contamination inter-échantillons entre deux puits sur une cible MALDI-TOF peut entraîner une modification des résultats.

L'étude des contaminations a déjà été réalisée au laboratoire de bactériologie. Elle a consisté à déposer sur une cible une alternance de dépôts de bactérie + matrice (n=6) et de dépôts de matrice seule (n=6).

7) Robustesse et stabilité des réactifs

La robustesse est une mesure de la capacité d'une méthode à supporter de faibles changements de conditions expérimentales. Le test de robustesse est indispensable en portée B du fait de l'utilisation de conditions d'analyse différentes de celles recommandées par le fournisseur Bruker®. En effet, celui-ci recommande d'utiliser des cultures fraîches de 18h sur gélose au sang. Le but de la validation de méthode réalisée ici était d'évaluer l'influence de la durée d'incubation et de la nature des milieux de culture sur les résultats d'identification.

Ainsi ont été évaluées les performances du MALDI sur des cultures de 24, 48 et 72 heures isolées sur des milieux de type gélose au sang (bioMérieux®) gélose trypticase soja (TSA) (bioMérieux®), géloses sélectives cétrimide (bioMérieux®) et CFC (bioMérieux). La température d'incubation utilisée était de 30°C pour toutes les conditions testées, en atmosphère aérobie. Pour tester la robustesse, les 7 souches ATCC ont été testées en double après culture sur les quatre différents milieux et après les trois différents délais d'incubation.

Concernant la stabilité des réactifs après ouverture, le laboratoire a suivi les recommandations fournisseurs. Les réactifs ont été stockés et utilisés dans le cadre des délais de péremptions en respectant les préconisations du fournisseur (Bruker®) [19].

8) Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes a été réalisée en comparant l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF avec l'identification par séquençage de fragment de l'ADNr 16S et du gène *rpoD* en tant que méthode de référence. Pour cela, une collection de souches environnementales et cliniques a été utilisée. L'objectif était de vérifier la corrélation entre les deux méthodes.

II. Caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa*

1. Souches étudiées

Des souches de *Pseudomonas* sp. ont été collectées à partir de prélèvements d'eaux réalisés par le laboratoire d'hygiène au sein du CHU Charles Nicolle à Rouen entre le 28 mai 2013 et le 17 février 2016. Avant ce travail, ces souches avaient été identifiées comme étant des *Pseudomonas* sp. par des techniques phénotypiques classiques (hors spectrométrie de masse) : tests d'orientation (oxydase, production de pigment) et identification phénotypique classique (galerie API20NE, bioMérieux® et galerie GNI , automate BD, Phoenix®)

Cette collection a été complétée par des souches isolées lors de campagnes de prélèvements d'eaux de soin standard (ESS) entre le 24 novembre 2015 et le 16 mars 2016 au sein d'établissements extérieurs en Seine Maritime tels que le site Bois Guillaume du CHU de Rouen, Les Herbiers, l'hôpital du Belvédère, le centre dentaire Moizan, les CH de Dieppe, Barentin et Oissel, le CH du Rouvray à Saint-Etienne du Rouvray et l'unité centrale de production (UCP) à Bois Guillaume.

Pour chaque point d'eau prélevé, un flacon de 250 ml d'eau mitigée était recueilli après écoulement du robinet pendant quelques secondes. Ces eaux étaient prélevées dans des flacons contenant du thiosulfate. Ensuite, ce sont 100 mL d'eau qui étaient filtrés sur une membrane par technique de filtration sur rampe (Sartorius®). Chaque membrane a ensuite été déposée sur un milieu CFC. Les géloses CFC ont été incubées à 30°C et inspectées jusqu'à 72h de culture.

Des souches de *Pseudomonas* sp. issues de prélèvements cliniques isolées entre mai 2015 et mars 2016 et conservées au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen ont été collectées ainsi que des souches issues de prélèvements cliniques du centre Henri Becquerel. Ces souches avaient été identifiées par des techniques phénotypiques par API20NE (bioMérieux®) ou galerie GNI, BD (Phoenix®) ou spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker®).

2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les souches du souchier constitué avant ce travail ont été décongelées sur milieu TSA ou gélose au sang puis identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur l'automate biotyper (Bruker®). Toutes les souches collectées à partir des ESS des établissements extérieurs entre 2015 et 2016 ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF après repiquage sur un milieu sélectif (CFC).

La colonie isolée à identifier était déposée sur une cible MALDI-TOF en réalisant un dépôt fin et homogène, comme recommandé par le fournisseur. Dans les dix minutes après séchage, le dépôt était ensuite recouvert d'1 microlitre de solution matrice IVD HCCA : acide 4-cyano-4-hydroxycinnamique, préparée conformément aux recommandations du fournisseur. Sur chaque cible, l'IVD Bacterial Test Standard (BTS) a été déposé, en tant que contrôle de validation. Le projet était ensuite créé sur le logiciel InfectioMaldi (Bruker®). Après séchage, la cible MALDI était disposée dans le spectromètre de masse Microflex (Bruker®) et le projet créé était lancé à partir du logiciel IVD MALDI Biotyper.

En l'absence de détection du pic et lors d'un résultat avec un indice de confiance B (faible cohérence) ou C (aucune cohérence), le dépôt simple était répété, voire complété par un dépôt après extraction simple avec acide formique, selon la procédure suivante : avant l'ajout de la matrice, 1 microlitre d'acide formique était déposé directement sur le dépôt bactérien. Les résultats d'identification étaient rendus après analyse des dix MSP.

3. Identification moléculaire par séquençage

1) Extraction

L'ADN de toutes les souches ayant été identifiées comme des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse a ensuite été extrait à partir de colonies sur milieu gélosé à l'aide du kit InstaGene ^{TM}Matrix (Biorad®). Les colonies étaient mises en suspension dans 500 µL d'eau, et la suspension était vortexée puis centrifugée 1 minute à 12 000 rotations par minute (rpm). La majorité du surnageant a été éliminée et 200 µL d'InstaGene^{TM} Matrix ont été ajoutés. Le mélange était incubé à 56°C pendant 30 minutes puis vortexé pendant 10 secondes puis incubé à 100°C pendant 10 minutes. Ensuite, il était vortexé pendant 10 secondes et centrifugé 3 minutes à 12 000 rpm. Le surnageant contenant l'extrait était récupéré et conservé à +4°C.

2) Amplification ADNr16S

Le couple d'amorces choisi pour l'amplification de l'ADNr 16S était celui utilisé en routine au laboratoire de bactériologie (Tableau 28). Il s'agit d'amorces « maison ».

Gène	Amorce	Séquence 5' -> 3'	Référence	Longueur fragment (pb)
16S	16S1	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	Laboratoire	environ 1500
	16S5	GTG GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC	Laboratoire	

Tableau 28 : Séquences des amorces pour la PCR 16S1/5

Les amplifications ADNr 16S ont été réalisées sur des thermocycleurs Veriti Applied ou TC512 Techne. Le programme d'amplification choisi était le suivant : 95°C pendant 5' puis 30 cycles dont :

- 10 cycles "touch down" avec diminution de 1°C de la température d'hybridation à chaque cycle (cette étape permet d'augmenter la spécificité) : 95°C 30 secondes, 65°C 1 minute et 72°C 1 minute 30
- 20 cycles : 95°C 30 secondes, 55°C 1 minute et 72°C 1 minute 30, suivis d'une étape à 72°C pendant 5 minutes puis 4°C à l'infini.

3) Amplification *rpoD*

Les amorces permettant l'amplification d'un fragment du gène *rpoD* ont été choisies à partir de données de la littérature [89] et obtenues auprès du fournisseur Eurogentec® (Tableau 29).

Gène	Amorce	Séquence 5' -> 3'	Référence	Longueur fragment (pb)
rpoD	*rpoD* 30F	ATY-GAA-ATC-GCC-AAR-CG	Mulet *et al.*	736
	rpoD 790R	CGG-TTG-ATK-TCC-TTG-A		

Tableau 29 : Séquences des amorces pour la PCR *rpoD* [89]

La température d'hybridation étant de 50°C pour le couple d'amorces choisi, le programme de PCR initialement utilisé pour l'amplification ADNr 16S a été modifié en programmant 30 cycles au lieu de 20 cycles : 95°C pendant 30 secondes puis 55°C pendant 1 minute et enfin 72°C pendant 1 minute 30.

La spécificité de l'amplification vis-à-vis du genre *Pseudomonas* a été vérifiée après migration sur gel électrophorétique des amplicons obtenus pour les espèces du genre *Pseudomonas* et autres genres proches (*Sphingomonas* et *Stenotrophomonas*).

4) Séquençage nucléotidique

Après la réaction de PCR, tous les amplicons ont été purifiés à l'aide du kit PCR clean-up gel extraction Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Le but était de les débarrasser des sels, nucléotides, amorces, polymérases, etc. L'amplicon a été repris dans une solution tampon Buffer NT de façon à ajuster le volume total à 50 µL. Puis deux volumes de ce même tampon ont été ajoutés, soit 100 µL. Le mélange a été transféré sur une colonne avec un tube collecteur puis centrifugé 1 minute à 11 000 tours/min. Le tube collecteur a été vidé et replacé sous la colonne. Une première étape de lavage a été réalisée avec 700 µL de Buffer NT3. Le mélange a été centrifugé 1 min à 11 000 tours/min. Cette étape a été répétée une deuxième fois. Le tube collecteur a été vidé, le mélange a été à nouveau centrifugé 1 min à 11 000 tours/min afin de permettre le séchage. Puis 30 µL de Buffer NE, tampon d'élution ont été laissés au contact de la colonne. Après centrifugation 1 min à 11 000 tours/min, l'éluat a été récupéré et conservé à +4°C.

La réaction de séquence était lancée à partir de ces amplicons purifiés et des amorces sens (5'-3') ou *forward* (séquences 16S1 et *rpoD* 30F, Tableau 28 et 29) ont été utilisées. Le séquençage a été réalisé sur des thermocycleurs Veriti Applied ou TC512 Techne. Le programme de séquençage utilisé était identique pour les deux gènes : 95°C pendant 2 minutes puis 60 cycles : 96°C 10 secondes, 50°C 10 secondes et 60°C 4 minutes. Enfin, 4°C à l'infini.

Une solution stop a été ajoutée dans chaque produit de réaction de séquence. Ceux-ci ont ensuite été purifiés selon un protocole recommandé par le fournisseur. Soixante microlitres d'éthanol à 95° étaient ajoutés à chaque tube puis les tubes étaient centrifugés 10 minutes à 3500 g. Le surnageant était éliminé. Un lavage par 200 µL d'éthanol à 70% puis centrifugation 3 minutes à 3500 g était réalisé deux fois. Les produits étaient séchés à l'aide d'un SpeedVac® puis additionés de 40 µL de SLS (sample loading solution). Le séquençage était lancé sur automate Beckman.

Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Genome lab system. Elles ont ensuite été soumises à une base de données. Les bases de données BIBI (Bio Informatic Bacteria Identification) [100, 101], GenBank [128] et PseudoMLSA Database [90, 129] ont été utilisées pour les séquences du fragment du gène ADNr 16S. Pour les séquences du gène *rpoD*, deux bases de données ont été utilisées. Les séquences ont d'abord été « blastées » dans GenBank puis dans la base de données PseudoMLSA Database [90,129]. Les séquences obtenues ont ensuite été alignées avec le logiciel BioEdit. Le logiciel

MEGA a permis de construire des arbres phylogénétiques en utilisant la méthode du Neighbour-Joigning, en y insérant des séquences-types de *Pseudomonas* sp.

C'est la présence conjointe de la souche à identifier avec une séquence-type au sein d'une même grappe de l'arbre avec une bonne valeur de bootstrap (>70%) qui a permis de confirmer l'identification à l'espèce.

4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose

Pour chaque souche clinique ou environnementale, un antibiogramme a été réalisé par diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CASFM-EUCAST 2016 [130] pour le genre *Pseudomonas*. Les antibiogrammes ont donc été réalisés sur une gélose de Mueller-Hinton (MH, bioMérieux®), incubée à 35+/- 2°C en aérobiose 16 à 24h, avec un inoculum standardisé de 0,5 McFarland.

Les quatorze antibiotiques testés appartiennent à la liste recommandée par le CASFM-EUCAST 2016 (Tableau 30) [130].

Molécules	**Diamètres critiques (mm)**		**Charge du disque (µg)**
	S ≤	**R >**	
Ticarcilline	18	18	75
Ticarcilline – acide clavulanique	18	18	75-10
Pipéracilline	18	18	30
Pipéracilline – tazobactam	18	18	30-6
Ceftazidime	16	16	10
Céfépime	19	19	30
Imipénème	20	17	10
Méropénème	24	18	10
Tobramycine	16	16	10
Amikacine	18	15	30
Ciprofloxacine	25	22	5
Aztréonam	50	16	30
Gentamicine	15	15	10
Lévofloxacine	20	17	5

Tableau 30 : Diamètres critiques et charge de disques utilisés pour les quatorze molécules testées lors d'antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé, selon les recommandations du CASFM-EUCAST 2016 [130].

Les diamètres ont été lus visuellement et les souches ont été classées sensible, intermédiaire ou résistante à chaque molécule selon les diamètres critiques définis par le CASFM-EUCAST (Tableau 30).

Lorsqu'une souche présentait un profil de résistance aux céphalosporines de 3ème (ceftazidime) et/ou 4ème génération (céfépime) un antibiogramme sur une gélose MH additionnée de 500 mg/L de cloxacilline était réalisé. Lorsque la gélose MH additionnée de 500 mg/L de cloxacilline ne restaurait pas la sensibilité aux béta-lactamines, des géloses avec une concentration de 1000 mg/L puis 2000 mg/L étaient utilisées. Si le phénotype évoquait une bêta-lactamase de classe C (céphalosporinase) avec des images d'induction, la gélose avec cloxacilline n'était pas réalisée. L'interprétation des phénotypes de résistance a été faite en fonction des données de la littérature [131].

Les données obtenues concernant la résistance aux antibiotiques pour des souches cliniques et environnementales ont ensuite été comparées à l'aide d'un test de Chi2 (avec correction de Yates). Les différences étaient considérées comme significatives pour des valeurs de $p<0,05$ (* si $p<0,05$, ** si $p<0,01$).

RESULTATS

I. Validation de méthode de l'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

1. Maîtrise des risques

L'analyse détaillée présentant les points critiques, les éléments à maîtriser et les moyens de maîtrise sont résumés dans le SH FORM 43 (Annexe 4 : SH FORM 43 Fiche type de vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale)

2. Validation technique : évaluation des performances de la méthode

1) Répétabilité

Les résultats des essais de répétabilité sont résumés dans le Tableau 31.

Souche ATCC	Scores (colonies de 18h sur gélose au sang)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pseudomonas aeruginosa	2,4	2,34	2,47	2,46	2,5	2,44	2,46	2,31	2,44	2,44
Sphingomonas paucimobilis	2,32	2,26	2,38	2,43	2,34	2,38	2,29	2,3	2,31	2,31
Stenotrophomonas maltophilia	2,37	2,36	2,44	2,44	2,52	2,52	2,53	2,46	2,48	0
Pseudomonas fluorescens	2,38	2,34	2,42	0	2,41	2,36	2,18	2,26	2,42	2,44
Pseudomonas putida	2,53	0	2,6	2,6	2,53	2,55	2,5	2,57	2,59	2,58
Pseudomonas syringae	2,12	2,02**	2,15*	2,12	1,98**	1,99**	2,1	0	2,05**	1,96**
Pseudomonas stutzeri	2,22	2,16	2,37	0	2,26	2,3	2,32	2,31	2,29	0

* savastanoi ** caricapapaye

Tableau 31 : Scores obtenus pour les 10 dépôts des 7 souches ATCC par le même expérimentateur à partir de colonies de 18 heures sur gélose au sang

87% des scores étaient supérieurs 2. Si on considère les 3 scores inférieurs à 2 mais proches du seuil (1,96 ; 1,98 et 1,99) comme une identification réussie, 92% des identifications étaient correctes. L'absence d'identification liée à la non détection des pics (score 0) n'est pas considérée comme un résultat erroné mais une erreur survenue à cause d'un dépôt de mauvaise qualité par l'expérimentateur (6/70 dépôts soit 8%). Pour *P. aeruginosa*, *S. paucimobilis*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *S. maltophilia*, les scores étaient tous supérieurs 2 avec un indice de confiance A (haute cohérence). Les dix MSP proposés pour chacun appartenaient tous à la même espèce. Cependant, un problème de discrimination à l'espèce pour les espèces *P. fluorescens* et *P. syringae* a été observé puisque l'indice de

confiance est classé en B (bonne concordance au genre mais pas à l'espèce) pour 7/10 des identifications de *P. fluorescens* et 9/10 des identifications de *P. syringae*. De plus, pour les dix MSP de *Pseudomonas syringae subsp. syringae*, les identifications donnent aléatoirement les espèces *syringae/caripapayae/savastanoi*, qui sont des pathovars connus de *P. syringae* (6/10 donnent une autre espèce appartenant au groupe *syringae*).

2) Fidélité intermédiaire

Les résultats des essais de reproductibilité sont résumés dans le Tableau 32.

Scores Gélose au sang 18H	Souches ATCC	*Pseudomonas aeruginosa*	*Sphingomonas paucimobilis*	*Stenotrophomonas maltophilia*	*Pseudomonas fluorescens*	*Pseudomonas putida*	*Pseudomonas syringae*	*Pseudomonas stutzeri*
	Opérateur 1	2,4	2,32	2,37	2,38	2,53	2,12	2,22
		2,34	2,26	2,36	2,34	2,6	2,12	2,16
	Opérateur 2	2,25	2,44	2,48	2,38	2,52	2,09*	2,16
		2,21	2,55	2,54	2,39	0	2,2	2,2
	Opérateur 3	2,52	2,43	2,39	2,29	2,6	2,11	2,22
		2,62	2,47	2,46	2,41	2,52	1,92**	2,22
	Opérateur 4	2,55	2,42	2,2	2,49	2,53	2,24	2,19
		2,43	2,41	2,27	2,46	2,57	2,25	2,18
	Opérateur 5	2,42	2,44	2,38	2,41	2,61	2,2	2,27
		2,37	2,41	2,23	2,484	2,57	2,16	2,3

**savastanoi **caricapapaye*

Tableau 32 : Scores obtenus pour les 7 souches ATCC par les 5 opérateurs différents dans les conditions standard (culture sur gélose au sang en 18h)

Pour 68 dépôts, un résultat présentant un score > 2 a été obtenu. Pour *P. syringae*, un score à 1,92 a été obtenu. Pour *P. putida*, un dépôt entraîne une non identification (pas de pic détecté) dû à une mauvaise qualité du dépôt ponctuelle, identifiée *a posteriori* par l'expérimentateur. Si l'on considère ce score inférieur 2 mais proche du seuil comme une bonne identification, l'identification est correcte à 98,6% (69/70 dépôts).

La méthode est donc vérifiée pour la reproductibilité. Le problème de discrimination à l'espèce est à nouveau relevé pour les 2 souches ATCC *P. syringae* subsp. *syringae* et *P. fluorescens* (indice de confiance B).

3) Variabilité inter-opérateurs

Les essais de reproductibilité n'ont pas mis en évidence d'influence de l'expérimentateur (Tableau 32).

4) Incertitude de mesures

L'analyse détaillée présentant les points critiques, les éléments à maîtriser, l'échelle de criticité attribuée et les moyens de maîtrise est présentée dans le SH FORM 43 (Annexe 4).

5) Contamination

On a constaté l'absence de contamination pour les dépôts de matrice seule (aucun pic détecté).

6) Robustesse et stabilité des réactifs

Les résultats des essais de robustesse (168 scores) sont résumés dans le Tableau 33.

Milieu	Souche ATCC	Scores		
		24 H	48 H	72 H
Gélose au sang	*Pseudomonas aeruginosa*	2,39	2,38	2,3
	Sphingomonas paucimobilis	2,39	2,46	2,46
	Stenotrophomonas maltophilia	2,38	2,41	2,25
	Pseudomonas fluorescens	2,33	2,45	2,37
	Pseudomonas putida	2,52	2,42	2,52
	Pseudomonas syringae	2,07	2,24	2,33
	Pseudomonas stutzeri	2,33	2,35	2,24
CFC	*Pseudomonas aeruginosa*	2,29	2,44	2,44
	Sphingomonas paucimobilis	2,5	2,49	2,47
	Stenotrophomonas maltophilia	2,32	2,36	2,35
	Pseudomonas fluorescens	2,33	2,45	2,4
	Pseudomonas putida	2,49	2,53	2,62
	Pseudomonas syringae	2,14	2,13	2,13
	Pseudomonas stutzeri	2,15	2,21	2,24
Cétrimide	*Pseudomonas aeruginosa*	2,39	2,33	2,42
	Sphingomonas paucimobilis	2,4	2,43	2,48
	Stenotrophomonas maltophilia	2,29	2,35	2,32
	Pseudomonas fluorescens	2,21	2,39	2,34
	Pseudomonas putida	2,5	2,47	2,46
	Pseudomonas syringae	2,1-1,8	1,82-1,92	1,9-1,96
	Pseudomonas stutzeri	2,18	1,97-2,17	2,21
TSA	*Pseudomonas aeruginosa*	2,45	2,48	2,48
	Sphingomonas paucimobilis	2,53	2,37	2,4
	Stenotrophomonas maltophilia	2,43	2,38	2,15
	Pseudomonas fluorescens	2,38	2,46	2,24
	Pseudomonas putida	2,62	2,59	2,49
	Pseudomonas syringae	2,11	2,15	2,21
	Pseudomonas stutzeri	2,22	2,42	2,37

Tableau 33 : Moyenne ou détail des scores (lorsque 1 ou 2 scores sont inférieurs à 2) pour chaque souche ATCC en fonction des milieux et des délais d'incubation testés

Six scores étaient inférieurs à 2 (1,97 ; 1,8 ; 1,82 ; 1,92 ; 1,9 ; 1,96) mais sans discordance d'identification. Cinq scores inférieurs à 2 concernaient l'identification de *P. syringae* à partir du milieu cétrimide et 1 score concernait *P. stutzeri* à partir du milieu cétrimide. L'identification au rang de l'espèce pour *P. syringae* pose problème pour 3 résultats en 24 heures en donnant une identification à l'espèce différente : à partir du milieu gélose au sang (*P. savastanoi*), du milieu TSA (*P. savastanoi*), et du milieu cétrimide (*P. caricapapaye*).

Cela nous permet de valider l'identification bactérienne par MALDI-TOF à partir des différentes géloses utilisées au laboratoire d'hygiène et sous une température d'incubation à 30°C en aérobie, à partir de colonies après différents temps d'incubation (24, 48 et 72 heures) tout en émettant une réserve quand à l'identification *de P. syringae* à partir du mileu cétrimide lorsque les colonies sont trop petites.

Concernant la stabilité des réactifs après ouverture, le laboratoire a suivi les recommandations fournisseurs. Les réactifs ont été stockés et utilisés dans le cadre des délais de péremption en respectant les préconisations du fournisseur (Bruker®) [19].

7) Comparaison de méthodes

7.1. Identification moléculaire par séquençage

Les 85 souches de *Pseudomonas* sp. ont été identifiées par séquençage ADNr 16S et *rpoD*. Les résultats sont illustrés en Annexe 5.

L'identification de chaque souche après soumission dans chacune des bases de données a été établie selon les règles suivantes, en fonction des scores d'homologies entre la séquence de la souche étudiée et celles des espèces proposées :

- lorsque la soumission proposait un profil satisfaisant pour 1 à 3 espèces (soit des scores d'homologies élevés pour cette (ces) espèce(s) et une différence significative de ceux-ci avec ceux des espèces suivantes), les identifications proposées étaient relevées
- lorsque la soumission proposait un profil satisfaisant pour plus de 3 espèces, le résultat était rendu au groupe (si les espèces appartenaient au même groupe)
- lorsque la soumission proposait un profil satisfaisant avec des espèces appartenant à plusieurs groupes d'espèces, le résultat était rendu en « *Pseudomonas* sp. »

Les séquences ADNr 16S ont été analysées dans trois bases de données : BIBI, GenBank et PseudoMLSA database [90, 100, 128]. Un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences ADNr 16S de notre collection et de souches d'espèces-types (lorsque cela était possible) pour valider les identifications au rang d'espèce, de groupe ou de genre (Annexe 6).

Deux séquences n'ont pas pu être obtenues ; donc il n'y a aucune identification ADNr 16S pour deux souches. L'effectif total compte alors 83 souches pour ce gène.

La base de donnée BIBI a permis l'identification de 8 souches au rang de genre, 42 souches au rang de groupe et 33 souches au rang d'espèces.

La base de donnée MLSA a permis l'identification de 5 souches au rang de genre, 64 au rang de groupe et 14 au rang d'espèces.

La base de donnée GenBank a permis l'identification de 7 souches au rang de genre, 43 au rang de groupe et 33 au rang d'espèces.

Les pourcentages de concordance d'identification au rang de groupe et d'espèce entre les trois bases de données sont résumés dans les Tableaux 35 et 36.

Groupe	16S MLSA	16S GenBank
16S BIBI	88%	88%
16S MLSA		89%

Tableau 35 : Pourcentage de concordance d'identification au rang de groupe entre les trois bases de données

Espèce	16S MLSA	16S GenBank
16S BIBI	12%	24%
16S MLSA		23%

Tableau 36 : Pourcentage de concordance d'identification au rang d'espèce entre les trois bases de données

Les données d'identification au rang d'espèce de la base BIBI sont globalement mieux corrélées avec celles de GenBank qu'avec celles de la PseudoMLSA Database.

Les trois bases de données utilisées pour le séquençage ADNr 16S condordaient à 84,5% au rang de groupe (71/84) et 15% au rang de l'espèce (8/53) (si l'on considère

l'identification valide lorsque l'espèce *P. pseudoalcaligenes* est proposée pour l'identification d'un *P. oleovorans*).

Dans les trois bases de données, des discordances au rang de groupe ont été retrouvées systématiquement pour les identifications des *Pseudomonas* du groupe *aeruginosa* (6 discordances au rang de groupe pour les 6 souches).

Les séquences *rpoD* ont été analysées avec deux bases de données : GenBank et PseudoMLSA database (Annexe 5). Une séquence n'a pas pu être obtenue. L'effectif total compte alors 84 souches pour ce gène.
Un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences *rpoD* de notre collection et de souches d'espèces-types (lorsque cela était possible) pour valider les identifications au rang d'espèce, de groupe ou de genre (Figure 16).

La base de donnée MLSA a permis l'identification de 26 souches au rang de groupe et 58 souches au rang d'espèces.

La base de donnée GenBank a permis l'identification d'une souche au rang de genre, 39 souches au rang de groupe et 44 souches au rang d'espèces.

Les deux bases de données utilisées pour le séquençage *rpoD* concordent à 98,8% au rang de groupe (83/84) et 43,6% au rang de l'espèce (23/54) (si l'on considère l'identification valide lorsque l'espèce *P. pseudoalcaligenes* est proposée pour l'identification d'un *P. oleovorans*).

L'arbre phylogénétique *rpoD* construit enraciné avec des séquences d'espèces-types a permis d'identifier :

- 55 souches au rang d'espèce (65%)
- 30 souches au rang de genre (35%)

L'arbre obtenu avec les séquences du gène *rpoD* présentait un nombre plus important de souches présentes dans une même « grappe » avec une souche-type, avec une bonne valeur de bootstrap.

Du fait de ce pouvoir discriminant supérieur au séquençage ADNr 16S, c'est le séquençage *rpoD* qui a été choisi pour assigner une identification à chaque souche.

Au total, 4 groupes et 9 espèces ont été identifiés :

- groupe *oleovorans (*n=46 dont 23 *P. oleovorans*, 17 *P. indoloxydans,* 1 *P. mendocina*)
- groupe *putida* (n=21 dont 1 *P. soli* et 1 *P. monteilii).*
- groupe *fluorescens* (n=12 dont 7 *P. fluorescens* 1 *P. gessardii*, 1 *P. meridiana*, 2 *P. migulae et 1 P. proteolytica).*
- groupe *aeruginosa* (n=6, contenant uniquement des *Pseudomonas* non *aeruginosa* dans cette étude)

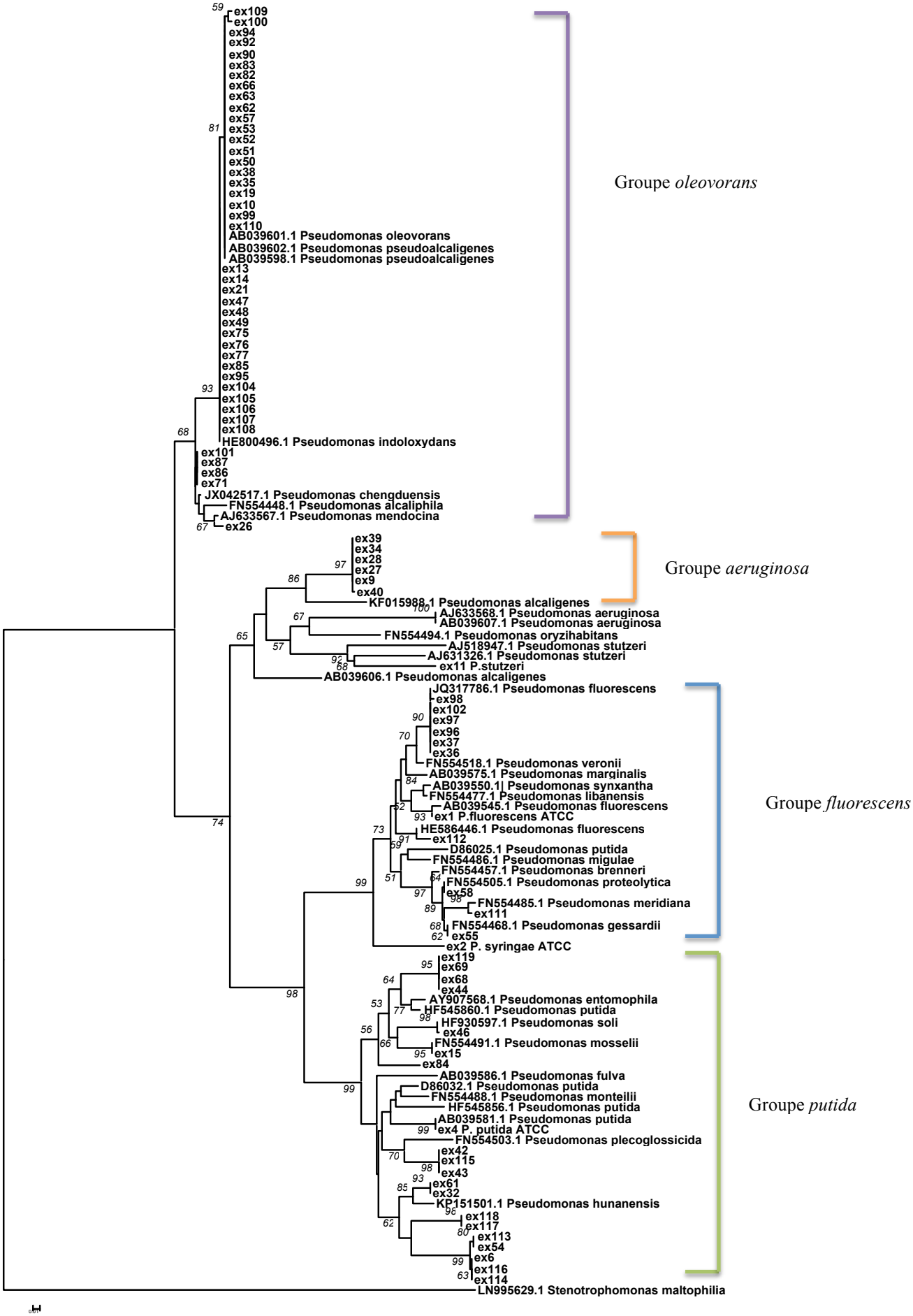


Figure 16 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'un fragment du gène *rpoD* pour 77 des 85 souches étudiées et enraciné de séquences-types

7.2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les 85 souches de *Pseudomonas* sp. ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Une extraction simple à l'acide formique a été nécessaire pour améliorer l'identification de 2 souches (Annexe 7).

79 souches sur 85 ont été identifiées au rang d'espèces.

6 souches sur 85 ont été identifiées au rang de genre (*Pseudomonas* sp.) : 5 souches du groupe *aeruginosa* et 1 souche du groupe *putida*.

Au total, 4 groupes et 15 espèces ont été identifiés :

- groupe *oleovorans* (n=46 souches dont 25 *P. oleovorans*, 15 *P. pseudoalcaligenes*, 1 *P. mendocina*, 5 *P. alcaliphila*).
- groupe *putida* (n=20 souches dont 11 *P. monteilii,* 4 *P. putida*, 3 *P. plecoglossicida*, 2 *P. mosselii*).
- groupe *fluorescens* (n=12 souches dont 4 *P. libaniensis*, 3 *P. azotoformans*, 2 *P. gessardii*, 1 *P. brennerii*, 1 *P. proteolytica*, et 1 *P. marginalis*).
- groupe *aeruginosa* (n=1 souche soit 1 *P. alcaligene*s).

Le tableau 37 illustrent les identifications obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF par rapport à celles obtenues avec le séquençage des gènes ADNr 16S et *rpoD.*

N° souche	Identification MALDI-TOF	Identification génotypique	N° souche	Identification MALDI-TOF	Identification génotypique
6	*P. monteilii*	groupe *putida*	69	*P. monteilii*	groupe *putida*
7	*P. azotoformans*	*P. migulae*	71	*P. alcaliphila*	groupe *oleovorans*
8	*P. marginalis*	*P. migulae*	72	*P. alcaliphila*	groupe *oleovorans*
9	*Pseudomonas sp.*	groupe *aeruginosa*	74	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*
10	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	75	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
13	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*	76	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
14	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans*	77	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
15	*P. mosselii*	*P. mosselii*	82	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*
19	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	83	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*
21	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*	84	*P. putida*	groupe *putida*
26	*P. mendocina*	*P. mendocina*	85	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans*
27	*Pseudomonas sp.*	groupe *aeruginosa*	86	*P. alcaliphila*	groupe *oleovorans*
28	*Pseudomonas sp.*	groupe *aeruginosa*	87	*P. alcaliphila*	groupe *oleovorans*
29	*P. monteilii*	groupe *putida*	89	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
32	*P. monteilii*	groupe *putida*	90	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
34	*Pseudomonas sp.*	groupe *aeruginosa*	91	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
35	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*	92	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*
36	*P. libanensis*	*P. fluorescens*	94	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
37	*P. libanensis*	*P. fluorescens*	95	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
38	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	96	*P. azotoformans*	*P. fluorescens*
39	*Pseudomonas sp.*	groupe *aeruginosa*	97	*P. azotoformans*	*P. fluorescens*
40	*P. alcaligenes*	groupe *aeruginosa*	98	*P. libanensis*	*P. fluorescens*
41	*P. putida*	groupe *putida*	99	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
42	*P. plecoglossicida*	groupe *putida*	100	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
43	*P. plecoglossicida*	groupe *putida*	101	*P. alcaliphila*	groupe *oleovorans*
44	*P. monteilii*	groupe *putida*	102	*P. libaniensis*	*P. fluorescens*
46	*P. monteilii*	*P. soli*	104	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
47	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans*	105	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
48	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*	106	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
49	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*	107	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
50	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	108	*P. oleovorans*	*P. indoloxydans*
51	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*	109	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
52	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	110	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*
53	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*	111	*P. brenneri*	*P. meridiana*
54	*P. monteilii*	groupe *putida*	112	*P. gessardi*	*P. fluorescens*
55	*P. gessardii*	*P. gessardii*	113	*P. monteilii*	groupe *putida*
57	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*	114	*P. monteilii*	groupe *putida*
58	*P. proteolytica*	*P. proteolytica*	115	*P. plecoglossicida*	groupe *putida*
61	*P. monteilii*	groupe *putida*	116	*P. monteilii*	groupe *putida*
62	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	117	*P. mosselii*	groupe *putida*
63	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*	118	*Pseudomonas sp.*	groupe *putida*
66	*P. oleovorans*	*P. oleovorans*	119	*P. putida*	groupe *putida*
68	*P. putida*	groupe *putida*			

Tableau 37 : Identification de 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage des fragments de l'ADNr 16S et de *rpoD*.

Il a été constaté des difficultés dans l'identification de certaines espèces en MALDI-TOF :

- **Proposition de plusieurs espèces avec un score > 2**

C'est le cas pour les espèces *P. oleovorans* et *P. pseudoalcaligenes* qui appartiennent au même groupe (Figure 17) :

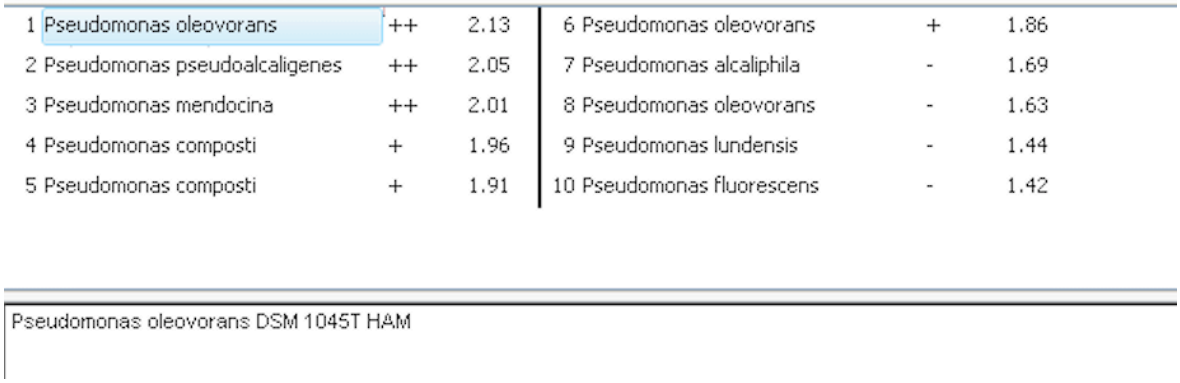


Figure 17 : Discordance de l'identification à l'espèce de trois espèces très proches phylogénétiquement *P. oleovorans/P. pseudoalcaligenes/P. mendocina*.

- **Non reproductibilité de l'indice de confiance empêchant la validation**

Pour l'espèce *P. mendocina*, trois identifications successives dans les mêmes conditions pour une même souche n'ont pas donné les même scores et indices. Les trois résultats d'identification ont donné un score=2,29 (A++), un score=2,09 (B++) et un score=1 ,98 (B+). L'indice de confiance attribué n'était donc pas reproductible même si l'espèce proposée en premier était toujours la même. Dans le premier cas, l'indice de confiance est classé en A car la comparaison avec le spectre de *P. compostii* en 2ème position n'obtient pas un score supérieur à 2 (Figure 18).

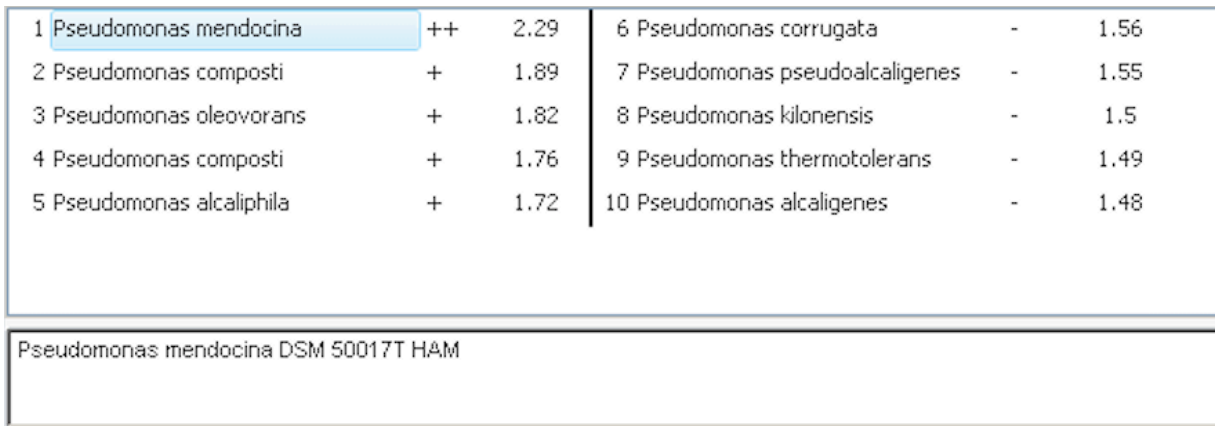


Figure 18 : Identification d'un *P.mendocina* avec score=2,29 (A++)

Dans le 2ème cas, *P. mendocina* et *P. compostii* ont obtenu tous deux un score supérieur à 2, donc l'indice de confiance a été classé en B (Figure 19).

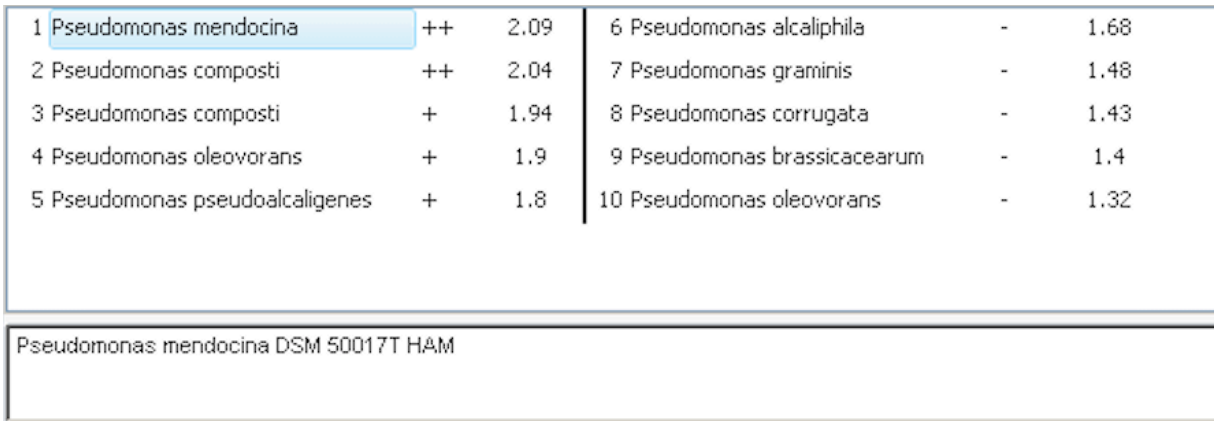


Figure 19 : Identification d'un *P. mendocina* avec score=2,09 (B++)

Dans le 3ème cas, aucun score n'est supérieur à 2 (Figure 20).

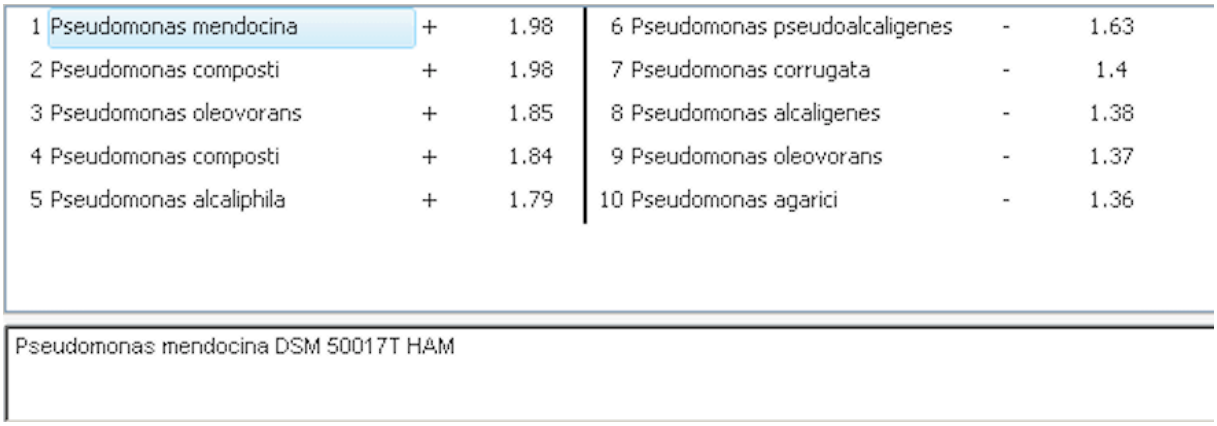


Figure 20 : Identification d'un *P. mendocina* avec score=1,98 (B+)

Ce problème concerne aussi les espèces appartenant au groupe *putida*. L'identification Bruker® donne un indice de confiance en A car les trois premiers spectres sont des *P. monteilii* mais le 4ème spectre présente un score >2 pour un *P. putida*.

7.3. Etude des concordances

Dans l'étude, l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est l'analyse que l'on compare avec une méthode de référence : l'identification obtenue grâce au séquençage de deux fragments de gènes (ADNr 16S et *rpoD*).

Pour les 85 souches, 100% de concordance d'identification au genre ont été observées entre la spectrométrie de masse et l'identification moléculaire, de même 100% des souches ont été identifiées correctement au rang de groupe.

Parmi les 55 souches ayant pu être identifiées au rang d'espèce par séquençage, 27% (n=15) l'ont été également par spectrométie de masse. Pour les 40 autres souches non identifiées au rang d'espèce, il y a une discordance à l'espèce mais une concordance au genre et au groupe (Tableau 38).

Les discordances d'identification au rang d'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF concernent les espèces *P. pseudoalcaligenes* (n=15/15), *P. oleovorans* (n=14/25), *P. libaniensis* (n=4/4), *P. monteilii* (n=1/11), *P. azotoformans* (n=3/3), *P. marginalis* (n=1/1), *P. brennerii* (n=1/1) et *P. gessardii* (n=1/2).

Les 15 concordances au rang d'espèces concernent les espèces *P. oleovorans* (n=11/25), *P. gessardii* (n=1/2), *P. mendocina* (n=1/1), *P. mosselii* (n=1/2), et *P. proteolytica* (n=1/1).

Un logigramme de validation a alors été établi (Annexe 8) pour la validation des identifications de *Pseudomonas* sp. par MALDI-TOF.

Souches identifiées par MALDI-TOF	Nombre	Identification concordante au genre	Identification concordante au groupe	Identification concordante à l'espèce	Identification incorrecte au genre	Identification incorrecte au groupe	Identification incorrecte à l'espèce
Pseudomonas sp.	6	6	NC	NC	0	NC	NC
P. alcaliphila	5	5	5	NC	0	0	NC
P. alcaligenes	1	1	1	NC	0	0	NC
P. azotoformans	3	3	3	0	0	0	3
P. brenneri	1	1	1	0	0	0	1
P. gessardi	2	2	2	1	0	0	1
P. libaniensis	4	4	4	0	0	0	4
P. marginalis	1	1	1	0	0	0	1
P. mendocina	1	1	1	1	0	0	0
P. mosselii	2	2	2	1	0	0	0
P. monteilii	11	11	11	0	0	0	1
P. oleovorans	25	25	25	11	0	0	14
P. plecoglossicida	3	3	3	NC	0	0	NC
P. proteolytica	1	1	1	1	0	0	0
P. pseudoalcaligenes	15	15	15	0	0	0	15
P. putida	4	4	4	NC	0	0	NC
Total	**85**	**85**	**85**	**15**	**0**	**0**	**40**

Tableau 38 : Comparaison des concordances genre/espèce/groupe entre l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF et l'identification par technique génotypique (séquençage des fragments de l'ADNr 16S et *rpoD*) pour les 85 souches incluses dans l'étude

NC=non concerné

II. Caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa*

1. Souches étudiées

1) Souches environnementales

Au total, la collection de souches étudiées comportait 107 souches environnementales, isolées à partir de prélèvements d'eau de soins standard, c'est à dire de l'eau du réseau de distribution intérieur de l'établissement utilisée pour les soins des patients sans risque particulier ou pour le rinçage de certains dispositifs médicaux.

Parmi les 107 souches environnementales, 92 ont été identifiées avant l'acquisition de l'automate MALDI-TOF comme étant des *Pseudomonas* sp. par des techniques phénotypiques classiques : tests biochimiques d'orientation, API20NE (bioMérieux®) et galerie GNI (BD Phoenix®). Les identifications obtenues étaient *Pseudomonas* sp. (n=75), *P. putida* (n=10), *P. stutzeri* (n=4), *P. fluorescens* (n=2) et *P. alcaligenes* (n=1). Les autres souches (n=15) ont été identifiées d'emblée comme des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker®) (Figure 21).

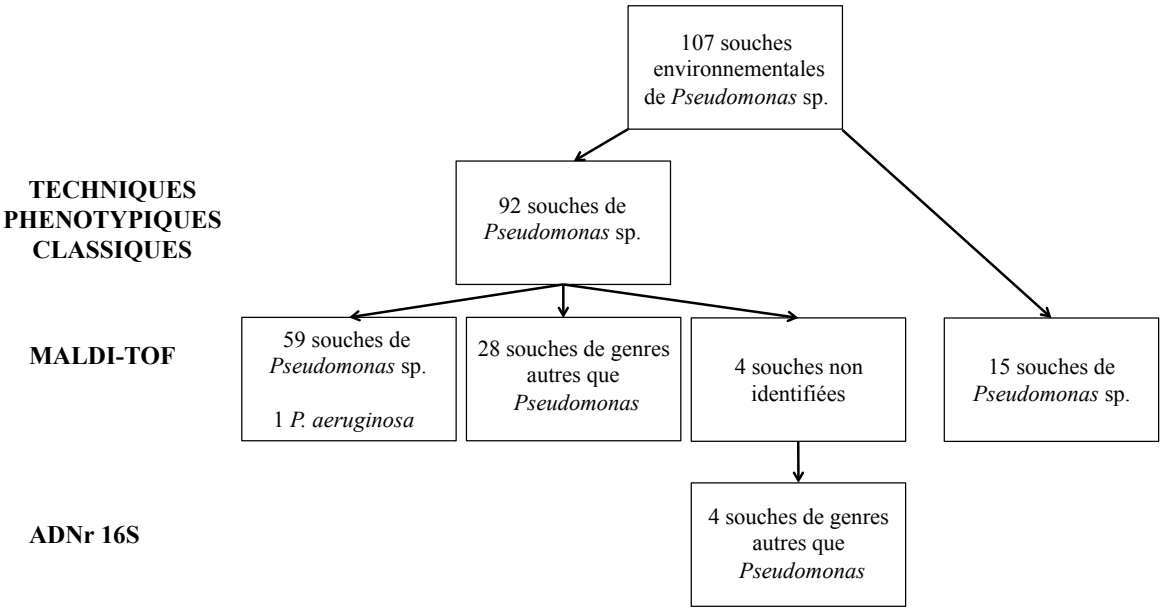


Figure 21 : Bilan de l'identification de 107 souches environnementales de *Pseudomonas* sp. par différentes méthodes phénotypiques et moléculaires

Parmi les 92 souches préalablement identifiées comme des *Pseudomonas* par des techniques phénotypiques classiques, 59 souches ont été identifiées par MALDI-TOF MS comme des *Pseudomonas* non *aeruginosa*, une souche comme un *P. aeruginosa* et 28 souches comme n'appartenant pas au genre *Pseudomonas*. Ces dernières appartenaient aux genres *Burkholderia, Cupriavidus, Stenotrophomonas, Acidovorax, Delftia, Sphingomonas, Brevundimonas*. Quatre souches n'ont pas pu être identifiées par MALDI-TOF MS ; elles ont été identifiées comme n'appartenant pas au genre *Pseudomonas* ultérieurement par séquençage de l'ADNr 16S : *Sphingobium*, *Sphingopyxis*, *Brevundimonas* et *Acidovorax*.

La collection de souches environnementales de *Pseudomonas* sp. comportait donc 74 souches provenant des sites Charles Nicolle, Bois Guillaume, Les Herbiers, du CHSR, et du CH de Barentin (Tableau 39).

	Sites hospitaliers					
	Charles Nicolle	Bois Guillaume	CHR	Les Herbiers	CH de Barentin	Total
Nombre de souches de *Pseudomonas* sp.	57	12	3	1	1	74

Tableau 39 : Origine géographique des souches environnementales de *Pseudomonas* sp. incluses dans l'étude

Les campagnes de prélèvements en milieux extérieurs (n=35 prélèvements) sur neuf sites ont permis de récolter six souches de *Pseudomonas* sp. (Tableau 40).

	Sites hospitaliers									
	Bois Guillaume	Les Herbiers	Belvédère	UCP	Moizan	Oissel	CHR	CH de Dieppe	CH de Barentin	Total
Prélèvements réalisés	2	9	3	1	2	2	3	7	6	35
Souches de *Pseudomonas* sp. recollectées	2	0	0	0	0	0	3	0	1	6

Tableau 40 : Nombre de prélèvements réalisés et de souches de *Pseudomonas* sp. isolées selon les sites hospitaliers

Parmi les 74 souches environnementales,

- 61% (n=45/74) appartennaient au groupe *oleovorans* (22 *P. oleovorans*, 17 *P. indoloxydans,* 5 *Pseudomonas* du groupe *oleovorans* non identifiés au rang de l'espèce et 1 *P. mendocina*.)
- 17,6% (n=13/74) au groupe *putida* (dont 1 *P. mosselii* et 12 *Pseudomonas* du groupe *putida*)
- 13,5% (n=10/74) au groupe *fluorescens* (*P. fluorescens* [n=6], *P. gessardii* [n=1]*, P. migulae* [n=2] *et P. proteolytica* [n=1])
- 8,1% (n=6/74) au groupe *aeruginosa* (incluant des *Pseudomonas* non *aeruginosa*)

2) Souches cliniques

Deux des souches cliniques provennaient du centre Henri Becquerel et dix proviennent de l'hôpital Charles Nicolle. L'origine des souches était variée : 1 souche provenait d'une hémoculture périphérique, 5 d'hémocultures sur matériel, 1 d'une biopsie cutanée, 2 de liquide céphalo-rachidien, 1 d'un prélèvement orthopédique, 1 d'une plaie d'arête de poisson et 1 d'un liquide de conservation.

Une souche n'a pas pu être incluse dans l'étude, en l'absence de subculture. Elle a uniquement été integrée aux données brutes de résistance, mais n'a pas été utilisée pour les données de résistance en fonction de l'espèce.

La collection de souches cliniques incluait donc 11 souches cliniques provenant du site Charles Nicolle et du Centre Henri Becquerel.

Parmi les 11 souches cliniques, 8 appartennaient au groupe *putida* (dont 1 souche identifiée au rang d'espèce en *P. soli*), 2 au groupe *fluorescens* (1 souche de *P. fluorescens* et 1 souche de *P. meridiana*) et 1 au groupe *oleovorans* (espèce *P. oleovorans*).

Au total, parmi les 85 souches (environnementales et cliniques) (Figure 22) :

- 54% appartenaient au groupe *oleovorans (*n=46) soit 23 *P. oleovorans*, 17 *P. indoloxydans,* 5 *Pseudomonas* du groupe *oleovorans* non identifiés au rang de l'espèce et 1 *P. mendocina*.
- 25% appartenaient au groupe *putida* (n=21) dont 1 *P. soli* et 1 *P. mosselii.*
- 14% au groupe *fluorescens* (n=12) représenté par les espèces *P. fluorescens* (n=7), *P. gessardii* (n=1)*, P. meridiana* (n=1), *P. migulae* (n=2) *et P. proteolytica* (n=1).
- 7% (n=6) appartenaient au groupe *aeruginosa.*

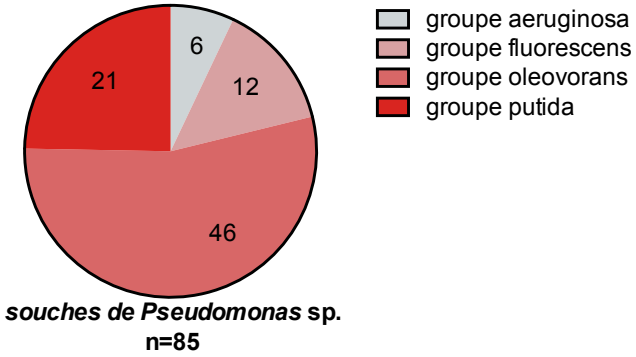


Figure 22 : Groupes d'espèces de *Pseudomonas* sp. représentés dans l'étude

La répartition des espèces de *Pseudomonas* sp. selon les services d'origine est résumée dans le Tableau 41.

		groupe aeruginosa	groupe putida	groupe oleovorans	P. fluorescens	P. gessardii	P. indoloxydans	P. mendocina	P. meridiana	P. migulae	P. mosselii	P. oleovorans	P. proteolytica	P. soli	Total
Barentin	Barentin										1				1
Becquerel	Becquerel		1											1	2
Bois Guillaume	Endocrinologie										1				1
	Pneumologie	6	2		2							1			11
Charles Nicolle	Anneau central			2											2
	Bloc Uro-digestif							1							1
	Chirurgie ambulatoire								1						1
	Chirurgie digestive		4												4
	Dermatologie				1						3				4
	Endoscopie digestive		3								1				4
	Gastrologie				3	1					1				5
	Laboratoire d'hygiène									1					1
	Maladies infectieuses										1				1
	Onco-pédiatrie						1				2				3
	Pédiatrie		2*												2
	Pavillon Mère Enfant										1				1
	Néonatologie		2				5				4				11
	Réanimation chirurgicale		1	3	1						7				12
	Réanimation médicale		1												1
	Réanimation neurochirurgicale		1				1				1				3
	Réanimation pédiatrique						10								10
CHSR	CHSR		1							2					3
Les Herbiers	Les Herbiers		1												1
	Total	6	19	5	7	1	17	1	1	2	1	23	1	1	85

* dont 1 souche clinique

souche clinique

Tableau 41 : Répartition des groupes/espèces de *Pseudomonas* sp. inclus dans l'étude par site d'origine

(CHSR : Centre Hospitalier de Saint-Eienne du Rouvray)

Les 10 souches de *P. indoloxydans* de Réanimation Pédiatrique ont été isolées le 14 mars 2014 (n=7 souches) puis 19 mars 2014 (n=3 souches).

Les 7 souches de *P. oleovorans* de Réanimation Chirurgicale ont été isolées le 5 juillet 2013 (n=1 souche), 3 mars 2014 (n=1 souche), 29 janvier 2016 (n=4 souches) et 30 mars 2016 (n=1 souche).

Les 5 souches de *P. indoloxydans* ont été isolées le 7 juin 2013 (n=1 souche), 14 juin 2013 (n=1 souche) et en janvier 2016 (n=3 souches). Les 4 souches de *P. oleovorans* de Néonatologie ont été isolées le 17 mai 2013 (n=2 souches), 10 juin 2013 (n=1 souche) et 14 juin 2013 (n=1 souche).

2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose

Parmi toutes les souches de *Pseudomonas sp*., 86 antibiogrammes ont pu être réalisés. Parmi les 74 souches environnementales, tous les antibiogrammes ont pu être obtenus. Parmi les souches cliniques, 12 antibiogrammes ont pu être exploités (11 souches identifiées comme *Pseudomonas sp*. et une souche non isolée en subculture mais dont l'antibiogramme avait été réalisé précédemment).

50% (43/86) de l'effectif ne présentait pas de résistance aux molécules d'intérêt (Figure 23).

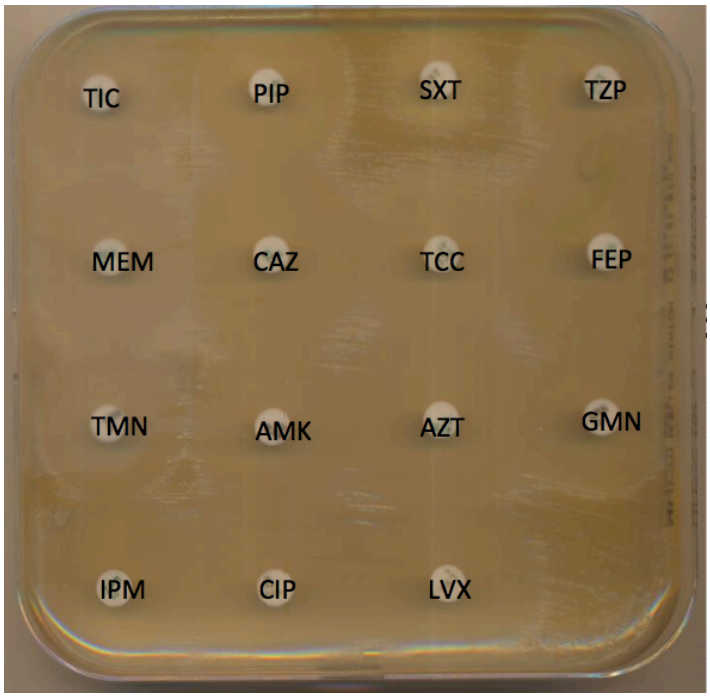


Figure 23 : Antibiogramme obtenu au cours de ce travail pour une espèce multi-sensible
TIC : ticarcilline, PIL : pipéracilline, SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprime, TZP : pipéracilline-tazobactam, MEM : méropénème, CAZ : céftazidime, TCC : ticarcilline-acide clavulanique, FEP : céfépime, TMN : tobramycine, AMK : amikacine, AZT : aztréonam, GMN : gentamicine, IPM : imipénème, CIP : ciprofloxacine, LVX : lévofloxacine

Les pourcentages de souches résistantes pour chaque molécule sont résumés dans la Figure 24. Les molécules auxquelles les souches étaient les plus fréquemment résistantes étaient la ticarcilline (46,5%), puis l'association ticarcilline et acide clavulanique (43%) suivies du méropénème (16,3%).

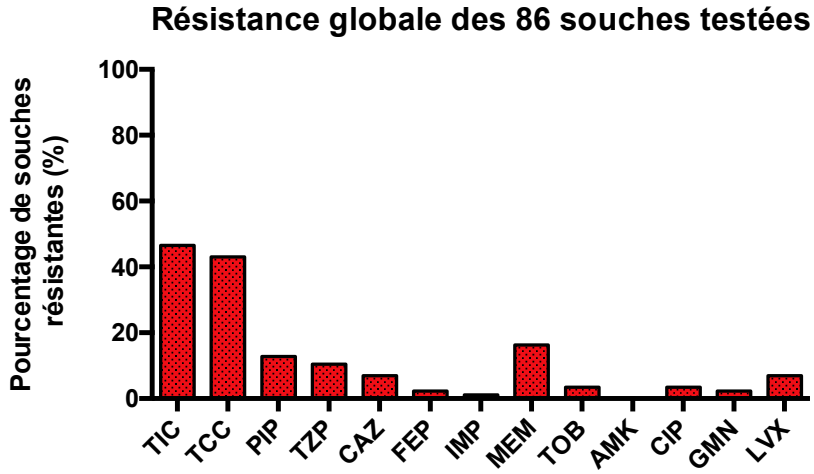


Figure 24 : Pourcentage de souches de *Pseudomonas* sp. résistantes pour chaque molécule testée

Si l'on compare les pourcentages de résistance des souches cliniques et environnementales, on note une fréquence de résistance significativement plus élevée pour la molécule ticarcilline et l'association ticarcilline - acide clavulanique au sein des souches cliniques (Figure 25).

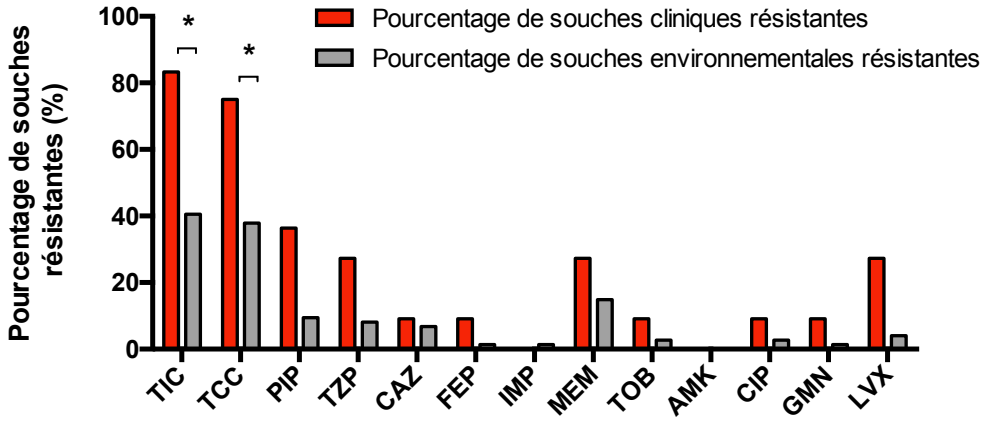


Figure 25 : Pourcentage de souches de *Pseudomonas* sp. résistantes pour chaque molécule testée en différenciant les souches cliniques (n=12) des souches environnementales (n=74)
* $p<0,05$

Le nombre de souches sensibles à toutes les molécules est significativement plus élevé dans le groupe des souches environnementales par rapport au groupe des souches cliniques (Figure 26).

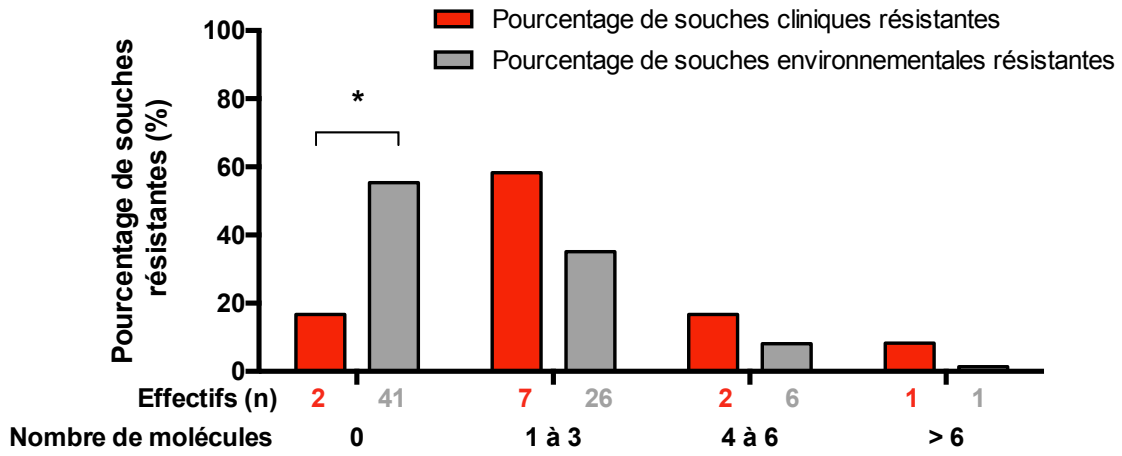


Figure 26 : Pourcentage de souches résistantes de *Pseudomonas* sp. pour chaque molécule testée en différenciant les souches cliniques (n=12) des souches environnementales (n=74)
* $p<0,05$

Parmi les 45 souches appartenant au groupe *oleovorans,* 41 ne présentent aucune résistance aux molécules testées (Figure 27). Les souches appartenant au groupe *aeruginosa, putida* et *fluorescens* sont résistantes à un plus grand nombre de molécules que celles du groupe *oleovorans*.

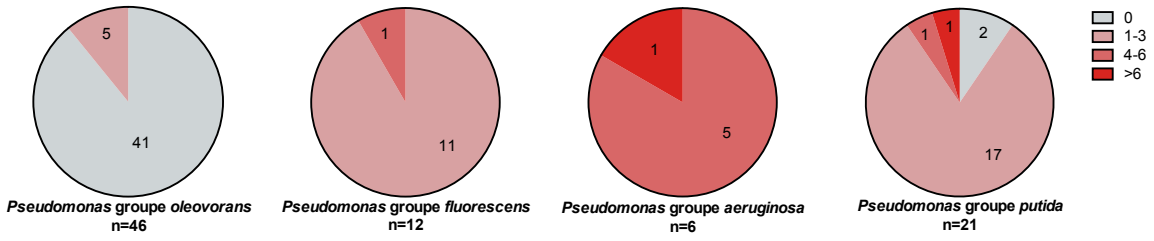


Figure 27 : Pourcentage de résistance aux molécules antibiotiques selon les groupes d'espèces

L'analyse des phénotypes de résistances des 43 souches non sensibles aux antibiotiques (41 souches environnementales, 2 souches cliniques) est résumée dans le Tableau 42.

Molécules													
TIC	TCC	PIP	PTZ	CAZ	FEP	MEM	IMP	TOB	AKN	GMN	CIP	LVX	Nombre souches
I													2
E	E												19
E	E											E	1
E+P	E	P											1
P		P											1
C	C					I							5
C	C	C	C			I							2
C+E	C+E	C	C			I						E	2
C	C	C	C	C	C	I							1
C	C			C			I						1
C*	C*		C*	C*		C*							1
C*	C*	C*	C*	C*		C*							2
C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*		A		A	M	M	1
											M	M	2
								A					1
								A		A			1

Nombre souches	
2	1 *P. oleovorans*, 1 groupe putida
19	7 *P. fluorescens*, 1 *P. migulae*, 1 *P. meridiana*, 1 *P. proteolytica*, 9 groupe *putida*
1	1 groupe *putida*
1	1 *P. mosselii*
1	1 groupe *putida*
5	3 groupe *putida*, 1 *P. mendocina*, 1 *P. gessardii*
2	2 groupe *aeruginosa*
2	2 groupe *putida*
1	1 groupe *aeruginosa*
1	1 *P. migulae*
1	1 groupe *aeruginosa*
2	2 groupe *aeruginosa*
1	1 *P. soli*
2	2 *P. indoloxydans/ P. oleovorans*
1	1 *P. indoloxydans*
1	1 *P. indoloxydans*

Légende : E=surexpression de pompes d'efflux
C=céphalosporinase
M= mutation gyrA/parC probables
A=résistance enzymatique aux aminosides
I=imperméabilité
*=ou carbapénémase

Tableau 42 : Analyse des phénotypes de résistance de 43 souches de *Pseudomonas* sp.

Le phénotype le plus représenté (n=19 souches) était caractérisé par une résistance conjointe à la ticarcilline et l'association ticarcilline et acide clavulanique probablement en lien avec un mécanisme de surexpression de pompe d'efflux.

Parmi les 23 *P. oleovorans*, 21 étaient sensibles à tous les antibiotiques testés alors qu'une souche présentait une résistance à la ticarcilline seule par un probable mécanisme d'imperméabilité, et une souche présentait une résistance croisée aux aminosides gentamicine et tobramycine.

Parmi les 17 *P. indoloxydans*, 14 étaient sensibles à tous les antibiotiques testés alors qu'une souche présentait une résistance aux quinolones, 1 souche présentait une résistance à la tobramycine, 1 souche présentait une résistance croisée tobramycine et gentamicine.

Parmi les *Pseudomonas* du groupe *fluorescens* (n=12), 11 présentaient une résistance commune touchant la ticarcilline, et l'association ticarcilline et acide clavulanique, probablement due à un mécanisme d'efflux. Une souche (*P. migulae*) présentait en plus de ce mécanisme d'efflux, un mécanisme type céphalosporinase hyperproduite et imperméabilité (résistance à la ceftazidime et l'imipénème avec des

diamètres restaurés sur gélose additionée de cloxacilline 1000 mg/L). Une souche présentait seulement un mécanisme type céphalosporinase et imperméabilité.

Tous les *Pseudomonas* du groupe *aeruginosa* (n=6 souches) présentaient un mécanisme de résistance de type céphalosporinase hyperproduite associée à une imperméabilité touchant le méropénème.

Parmi les *Pseudomonas* du groupe *putida*, les mécanismes étaient plus variés, de type imperméabilité (n=1), pénicillinase (n=3), mécanisme d'efflux (n=12), et céphalosporinase hyperproduite associée à une imperméabilité (n=3). Quatre souches présentaient une résistance aux quinolones et 1 aux aminosides (gentamicine et tobramycine). La souche qui présentait une résistance au plus grand nombre de molécules est un *P. soli* (groupe *putida*) vis a vis de laquelle les seules molécules actives étaient l'imipénème et l'amikacine.

Six souches avaient une résistance conjointe aux carbapénémes et aux céphalosporines de 3ème génération. Une restauration de la sensibilité aux molécules était observée sur gélose additionée de cloxacilline 1000 mg/L pour deux souches (phénotype de céphalosporinase hyperproduite couplé à une imperméabilité) mais aucune restauration n'était observée pour les quatre autres souches sur une gélose additionée de cloxacilline 2000 mg/L (Figure 28).

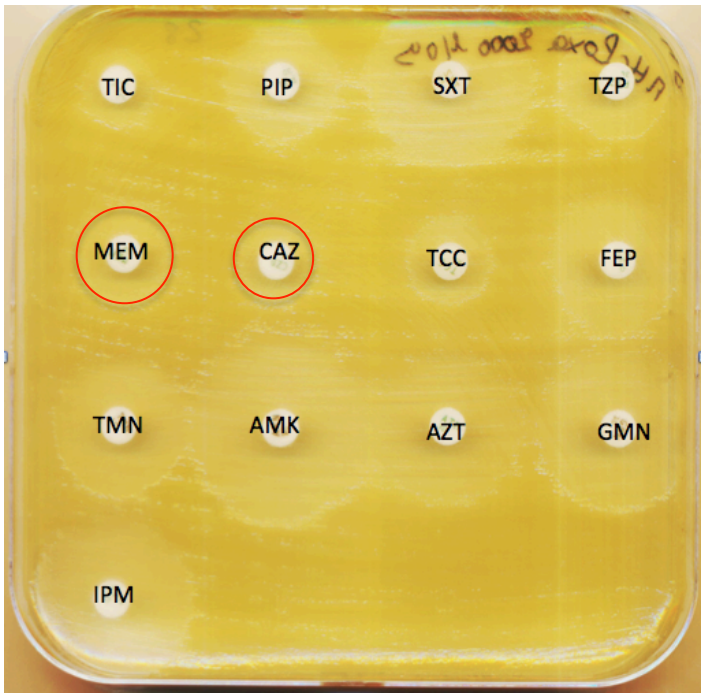


Figure 28 : Absence de restauration de la sensibilité à la ceftazidime et au meropénème par diffusion en gélose en présence de 2000 mg/L de cloxacilline

DISCUSSION

L'identification des bactéries du genre *Pseudomonas* est importante en routine au laboratoire tant dans les prélèvements cliniques que dans les prélèvements environnementaux. L'objectif de ce travail était de réaliser la validation de méthode en portée B flexible de l'identification bactérienne de souches de *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant comme méthode de référence l'identification moléculaire par séquençage des gènes ADNr 16S et *rpoD.*

Pour cela, nous avions caractérisé une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* sp. dont nous avions étudié dans un deuxième temps la sensibilité aux antibiotiques.

I. Validation de méthode de l'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF .

1. Identification moléculaire

La place du séquençage est importante pour identifier au rang de l'espèce les souches de *Pseudomonas* non *aeruginosa*.

Dans la littérature, les principaux gènes utilisés pour identifier les *Pseudomonas* non *aeruginosa* sont l'ADNr 16S, *oprF* [85, 87], *rpoD* [71, 89] et *rpoB* [93].

Les gènes *oprF* et *rpoD* présentaient respectivement un avantage dans l'identification des *Pseudomonas* du groupe *fluorescens* et des *Pseudomonas* du groupe *stutzeri*. Mais, au moment du choix des gènes à séquencer pour identifier nos souches de *Pseudomonas*, nous igniorions encore quelles espèces allaient constituées notre collection de souches, il n'était donc pas possible de choisir les gènes en fonction de leur performance par espèces.

Cependant, au vu des données de la littérature [44], le séquençage de l'ADNr 16S n'est pas assez discriminant pour identifier à lui seul au rang de l'espèce les *Pseudomonas* non *aeruginosa*. Nous avons donc choisi d'identifier les souches *via* l'association du séquençage de deux gènes : ADNr 16S et *rpoD* (en utilisant les amorces de Mulet *et al*.) [89]. Les avantages présentés par *rpoD* par rapport aux autres gènes domestiques (*rpoB*, *oprF*) étaient la présence d'une base de données fiable, assez complète et accessible en

ligne. De plus, la longueur assez courte du fragment amplifié (736 pb) facilitait l'analyse des chromatogrammes [90].

D'un point de vue pratique, le séquençage d'un fragment de l'ADNr 16S n'a pas posé problème ; cette méthode n'a pas nécessité de mise au point car utilisée en routine au laboratoire. Les chromatogrammes étaient d'excellente qualité, donc faciles à lire.

L'analyse des propositions d'identifications après soumission des séquences dans les 3 bases de données de biologie moléculaire a en revanche posé problème. L'évolution taxonomique du genre *Pseudomonas* fragilise en effet la fiabilité des bases de données et impose des mises à jour fréquentes. La base de donnée BIBI [100,101] est facile d'utilisation car elle présente les résultats sous forme d'un arbre phylogénétique. Elle est fiable car les données sont extraites de GenBank. De plus, elles sont croisées avec la nomenclature contenue dans la banque DSMZ [132] et soigneusement analysées afin d'écarter de l'ensemble de référence les séquences suspectes (souches non identifiées au rang d'espèce par des méthodes fiables). Cependant, elle n'est pas exhaustive et certaines espèces ne sont pas du tout représentées dans la base de données BIBI. L'avantage du rendu du résultat sous forme d'un arbre phylogénétique est que l'on visualise immédiatement si la séquence est présente avec une ou plusieurs espèces différentes dans le cluster. Cela évite la mauvaise identification au rang d'espèces. Ce rendu de résultat permet de s'affranchir de l'étape d'analyse des scores des différentes identifications proposées.

Un des avantages de la base de données GenBank est son exhaustivité. L'inconvénient est que des séquences suspectes peuvent y persister.

Les bases de données BIBI et GenBank proposaient plus d'identifications au rang d'espèces que la base de donnée PseudoMLSA Database. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a que 273 séquences ADNr 16S de *Pseudomonas* à ce jour dans la base de donnés PseudoMLSA, toutes les espèces n'y sont pas représentées et certaines souches sont intégrées à la base de données en tant que *Pseudomonas* sp.

Dans la littérature, la majorité des publications utilisent la base de données GenBank [81] ou la construction d'un arbre phylogénétique enraciné de séquences-types et généralement, une seule base de donnée par gène est utilisée pour identifier des *Pseudomonas* sp.

Les identifications proposées par les 3 bases de données étaient bien corrélées au niveau de l'identification au groupe (84,5%). Les bases de données BIBI et PseudoMLSA Database présentaient une moins bonne corrélation pour l'identification au rang d'espèce.

La concordance des trois bases de données entre elles pour l'identification au rang d'espèce était de 15%. Ces résultats soulignent une mauvaise discrimination au sein de l'espèce pour l'ADNr 16S. Des espèces différentes (mais appartenant à un même groupe) étaient présentes dans une même grappe avec une bonne valeur de bootstrap dans l'arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences ADNr 16S. Il a permis de classer les espèces au sein de groupes comme ceux décrits par Gomila *et al*. [31]. Cependant, nous n'avons pas pu fragmenter le cluster *fluorescens* en plusieurs clusters (*gessardii*, *mandelii*, *koreensis*, etc.) par manque de résolution des deux gènes ADNr 16S et *rpoD*. Nos résultats illustrent la difficulté d'identifier les espèces des groupes *fluorescens* et *putida*, comme décrit dans la littérature par Almuzara *et al*. [81] Aussi, dans les trois bases de données, des discordances au rang de groupe ont été retrouvées systématiquement pour les identifications des *Pseudomonas* du groupe *aeruginosa* (6 discordances au rang de groupe pour les 6 souches).

Le séquençage du fragment du gène *rpoD* avec les amorces décrites par Mulet *et al*. [89] a posé problème pour sa mise en place. En effet, des bandes non spécifiques entraînaient des chromatogrammes de mauvaise qualité, voire illisibles pour certaines souches. Les concentrations en amorces dans le mélange d'amplification ont été diluées afin de s'en affranchir.

La base de donnée MLSA a permis plus d'identification au rang d'espèces que la base de donnée GenBank (58 *versus* 44). Cela ne signifie pas que ces identifications étaient par la suite confirmées mais la moindre richesse (311 séquences) de la base de données PseudoMLSA explique peut-être un plus faible taux de scores satisfaisants pour plusieurs espèces.

Les deux bases de données utilisées pour le séquençage *rpoD* concordent à 98,8% au rang de groupe (83/84) et 43,6% au rang de l'espèce (23/54), ce qui est plus satisfaisant que pour le gène ADNr 16S.

Dans la littérature, c'est la base de donnée PseudoMLSA Database qui est recommandée [71] notament pour l'identification des *P. stutzeri*, mais aucune souche de ce groupe d'espèces n'était présente dans notre collection de souches. Elle est préferée pour sa fiabilité, mais GenBank présente les avantages de l'exhaustivité.

L'enracinement des arbres phylogénétiques avec des séquences-types de *Pseudomonas* sp. ADNr 16S et *rpoD* a vraiment amélioré les performances d'identification des souches. Cependant, la première difficulté a consisté à trouver des séquences de

référence pour certaines espèces, en particulier pour le gène *rpoD* dont le séquençage est plus récent que celui de l'ADNr 16S. Une deuxième difficulté a résidé ensuite dans la confrontation des identifications proposées par les séquençages ADNr 16S et *rpoD* compte-tenu des différences de contenu des bases de données afférentes à ces gènes.

Par exemple, 17 souches de la collection ont été identifiées par séquençage de l'ADNr 16S comme étant des *P. indoloxydans*. Lors de la soumission dans la base de données PseudoMLSA Database, ce profil d'espèce n'était jamais proposé car il est absent de la base de données. Il a fallu intégrer une séquence du gène *rpoD* d'une souche type *P. indoloxydans* dans l'arbre phylogénétique *rpoD* pour confirmer l'identification de ces 17 souches. Il en était de même pour l'espèce *P. soli*.

Au final, l'arbre le plus discriminant a été celui obtenu avec *rpoD*. Cela a permis d'identifier 65% des souches au rang de l'espèce. Pour les 35% restants, seule une identification au rang de groupe a été obtenue, en combinant les résultats obtenus avec les deux gènes.

Les espèces les plus difficiles à identifier au rang de l'espèce avec la combinaison des gènes ADNr 16S et *rpoD* étaient celles appartenant aux groupes *aeeruginosa* (hors *P. aeruginosa*) et *putida.* Aucune des 6 souches de *Pseudomonas* du groupe *aeruginosa* n'a pu être identifiée à l'espèce, de même pour 19 souches du groupe *putida*. En revanche, la combinaison de ces deux gènes est fiable pour identifier les espèces du groupe *fluorescens* (100% d'identification à l'espèce) et du groupe *oleovorans* (89% d'identification à l'espèce).

Afin d'affiner nos identifications, et comme le proposent *Flores Ribeiro* et *al*. [92], le séquençage d'un 3ème gène, *oprF* [85, 87] pourrait être une perspective intéressante. Il présente un intérêt dans l'identification des *Pseudomonas* du groupe *fluorescens* et *putida* [85, 87]. La difficulté avec le séquençage du gène *oprF* est qu'aucune base de données publiée ne permet de soumettre la séquence facilement ; il faudra donc déduire les identifications en construisant un arbre phylogénétique enraciné de séquences types les plus fiables possibles.

D'autre part, Mulet *et al*. [89] proposent le séquençage d'au mois quatre gènes domestiques (ADNr 16S, *rpoD, rpoB, oprF*) [31,33] pour augmenter le taux d'identification des souches de *Pseudomonas* non *aeruginosa*. Au final, seul le séquençage du génome entier des séquences-types permettrait d'obtenir les informations les plus

fiables [31]. Bien sûr, cette technique n'est pas envisageable pour nous au laboratoire. En revanche, cela permettrait d'enrichir les bases de données d'identifications indiscutables (sous réserve de changement taxonomique).

2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est très accessible à partir du moment où l'automate d'acquisition onéreuse est disponible au laboratoire. En effet, la méthode ne présente pas de difficulté technique mise à part l'apprentissage du dépôt sur la cible nécessitant une habilitation du personnel. Le dépôt ne doit pas être trop épais, car un échec d'identification peut survenir si une trop grande quantité de matériel biologique est utilisée. L'essai de répétabilité mené dans ce travail a montré que l'absence d'identification liée à la non détection des pics était due à des mauvais dépôts par l'expérimentateur. L'extraction protéique par l'acide formique (dite extraction simple) n'apportait pas d'amélioration dans l'identification des bactéries du genre *Pseudomona*s, la lyse chimique de la paroi cellulaire n'étant contributive que pour les bactéries ayant une paroi cellulaire rigide. L'extraction complète peut être intéressante du fait de l'action solubilisante de l'acétonitrile sur les protéines mais sa complexité la rend inenvisageable en routine au laboratoire d'hygiène.

La validation de méthode a permis d'objectiver les performances de la technique de spectrométrie de masse pour l'identification des *Pseudomonas* sp. Les sept souches ATCC utilisées représentaient des espèces fréquemment retrouvées dans la littérature (*putida*, *fluorescens*, *syringae* et *stutzeri*) Deux souches ATCC de genres différents du genre *Pseudomonas* (*S. maltophilia* et *S. paucimobilis)* ont été incluses car ce sont des germes très fréquement retrouvés dans l'eau. Il était donc important de s'assurer de la fiabilité de leur identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour pouvoir les différencier des *Pseudomonas* sp.

La répétabilité était correcte, avec 92% de scores acceptables, les mauvais scores (8%) étaient dûs à une mauvaise qualité du dépôt par l'expérimentateur.

La fidelité intermédiaire n'a pas montré de variations de résultats selon les conditions expérimentales. Au total 98,6% des identifications présentaient un score supérieur à 2. Il n'a pas été montré d'influence de l'expérimentateur. Il a été objectivé une absence de contaminations possibles lors de l'identification. Les risques étaient maîtrisés ; cette évaluation des risques a été facilitée par l'expérience acquise au laboratoire de microbiologie qui utilise l'automate MALDI-TOF en routine pour l'identification des micro-organismes depuis novembre 2014.

Les tests de robustesse de la méthode ont été satisfaisants. Les quatre milieux utilisés habituellement au laboratoire d'hygiène : gélose TSA, gélose au sang, gélose cétrimide et gélose CFC peuvent être utilisés. Les souches peuvent être identifiées jusqu'à 72h de culture, ce qui respecte le délai de culture de ces germes dont la croissance est parfois un peu plus longue, et ce d'autant plus qu'ils sont soumis à un certain stress environnemental. Cependant, parmi les 168 scores réalisés dans le cadre des essais de robustesse, 6 étaient inférieurs à 2. Parmi eux, 5 concernaient l'identification de la souche ATCC *P. syringae* subsp. *syringae* 19310 sur le milieu cétrimide. Les mauvais scores d'identification étaient dus à une culture insuffisante sur ce milieu, même après un délai de 72 heures.

L'identification par spectrométrie de masse, en plus de sa robustesse, sa facilité d'utilisation et son coût unitaire peu onéreux, présente l'avantage d'une base de données très complète : 80 espèces de *Pseudomonas* (Bruker®) *versus* 5 et 8 pour respectivement l'API20NE (bioMérieux®) et les automates d'identification en milieu liquide (Vitek 2®, bioMérieux et BD Phoenix®).

La base de données Bruker est bien supérieure à celle de l'automate Vitek MS, bioMérieux® (80 espèces *versus* 12) et l'utilisation de l'automate Bruker® a montré des résultats combinés d'identification au genre-complexe-espèce meilleurs (97% *versus* 89,5%) qu'avec l'automate Vitek MS [82]. Il est donc plus pertinent d'utiliser un automate Bruker pour identifier les *Pseudomonas* sp.

Malgré un effort du fournisseur (Bruker®) pour inclure des souches cliniques et environnementales, la base de données est quand même un problème car certaines espèces en sont absentes (exemple : *P. entomophila*, pathogène des insectes). En effet, sur 231 espèces appartenant au genre *Pseudomonas* [27], seules 35% sont actuellement incluses dans la base de données.

Par ailleurs, le nombre de spectres présents pour chaque espèce représentée dans la base de données n'est pas connu. Il est donc difficile de discuter de la répétabilité des spectres lors de la validation d'une identification.

La validation de méthode a permis d'identifier un problème de discrimination à l'espèce pour l'identification MALDI-TOF MS au sein du genre *Pseudomonas*. Pour la souche ATCC 19310 *P. syringae* subsp. *syringae* des identifications différentes ont été proposées, de manière aléatoire entre les espèces *syringae*, *savastanoi* et *caricapapaye* qui

sont des pathovars différents de l'espèce *syringae*. De même, de nombreuses identifications pour les espèces appartenant au groupe *putida* et *fluorescens* étaient classées en indice de confiance B avec un indice de référence précisant que l'espèce appartient à un groupe bactérien. En effet, l'étude de concordances a permis de mettre en évidence une bonne corrélation de l'identification au rang du genre (100%), du groupe (100%) mais des résultats non satisfaisants de corrélation au rang de l'espèce (27,3%). L'absence manifeste de reproductibilité des scores (aléatoirement < ou > à 2) et des indices de confiance (A ou B) pour les espèces proches au sein d'un même groupe (*oleovorans*, *putida*) est à l'origine d'une non discrimination au rang d'espèce.

Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans la littérature. Saffert et al. [18] a montré que le MALDI-TOF MS (Bruker®) permet une identification au rang de genre mais pas au rang d'espèce et Almuzara *et al*. [81] n'a pas réussi à discriminer les espèces au sein des groupes *putida* et *fluorescens* avec le MALDI-TOF MS (Bruker®) et le séquençage de l'ADNr 16S [81].

Actuellement, seule la biologie moléculaire *via* le séquençage de plusieurs gènes (ADNr 16S, *oprF, rpoB, rpoD,* etc…) [92, 103] permet de différencier les espèces entre elles pour de tels groupes.

3. Etude des concordances

Les résultats de la comparaison de méthodes montrent 100% de concordance au genre et au groupe pour les 85 identifications entre l'identification par spectrométrie de masse et le séquençage moléculaire. On retrouve seulement 27,3% d'identifications à l'espèce (n=15/55) par spectrométrie de masse. La technique d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF permet donc une identification fiable au rang de groupes d'espèces.

L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur l'étude des protéines ribosomiques. Il n'est donc pas étonnant que l'identification par le séquençage d'un fragment de l'ADNr 16S, qui constitue la petite sous-unité du ribosome bactérien, présente des performances comparables (faible discrimination au rang d'espèces).

Il est important de regarder les dix MSP avant de choisir de rendre une identification au rang de l'espèce. En effet, selon Bruker®, ce sont les deux meilleurs résultats qui permettent de déterminer les indices de confiance, c'est à dire les deux premiers spectres proposés lors du rendu des résultats [19, 20]. Lorsqu'une identification propose pour les deux premiers spectres un score supérieur à 2, les règles Bruker®

autorisent à rendre une identification à l'espèce avec un indice de confiance A mais si l'on regarde les dix MSP, on peut parfois constater qu'un spectre d'une autre espèce obtient lui aussi un score supérieur à 2. Le choix a donc été fait de ne pas suivre ces règles de validation et d'établir un logigramme de validation (Annexe 8). Si les spectres proposés donnaient un score d'identification > 2 pour une seule et même espèce, l'identification au rang de l'espèce est possible. Si d'autres espèces obtiennent un aussi bon score > 2, l'identification est rendue au sein d'un groupe.

Un problème lié à l'évolution taxonomique a été rencontré pour le *groupe oleovorans/pseudoalcaligenes*. Une majorité des souches de notre collection ont été identifiées par séquençage comme appartenant au groupe *oleovoreans* (n=46). Les identifications des souches par spectrométrie de masse donnaient aléatoirement les espèces *pseudoalcaligenes* ou *oleovorans*. Ces deux espèces étaient en effet présentées comme distinctes dans les bases de données Bruker® alors que la publication de Saha *et al*. [133] présente les espèces *P. pseudoalcaligenes* et *P. oleovorans* comme une seule et unique espèce et propose de scinder l'espèce en deux sous-espèces *P. oleovorans* subsp. *oleovorans* et *P. oleovorans* subsp. *lubricantis*. Cette évolution taxonomique a contibué à qualifier de discordantes les identifications de ces espèces par spectrométrie de masse.

Afin d'affilier une bactérie du genre *Pseudomonas* à une espèce, Bruker® propose la réalisation de dendrogramme à partir des spectres issus de l'identification MALDI-TOF MS. Cette fonction est utilisable en routine pour essayer d'identifier un *Enterobacter* complexe *cloacae* au rang de l'espèce par exemple. Cette étape nécessite une formation à l'utilisation du logiciel. Elle peut être une perspective intéressante pour le laboratoire d'hygiène pour valider les identifications mais ne résoud pas le problème de la faiblesse des bases de données. Cependant, Bruker® permet, après une formation spécialisée de pouvoir créer sa propre base de données. Cette fonction est notamment utilisée par certains laboratoires dans le cadre de l'identification des champignons filamenteux, pour lesquels la base de donnée Bruker® est très pauvre. Il pourrait être intéressant de pouvoir enrichir notre base de données avec notre collection de souches environnementales, une fois que leur identification fiable aura été obtenue par séquençage moléculaire de gènes complémentaires.

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF, Bruker® permet donc une identification fiable au rang de groupe d'espèces.

II. Caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques de *Pseudomonas* non *aeruginosa*

Ce travail confirme l'intérêt de l'utilisateur du MALDI-TOF au laboratoire par rapport aux méthodes phénotypiques classiques (API20NE et méthodes biochimiques en milieu liquide) même si seule une réponse de groupe n'est possible pour les espèces très proches sur le plan de leur composition en protéines ribosomiques.

Les souches analysées dans ce travail ont été collectées dans les services où le personnel du laboratoire d'hygiène est allé prélèver dans le cadre de la surveillance des points d'eaux de l'hôpital (sites Charles Nicolle et Bois Guillaume). Les souches ont été collectées de manière aléatoire et non exhaustive sur une période de 33 mois. Les campagnes de prélèvements dans les établissements hospitaliers extérieurs ont permis de récolter peu de souches (6 souches sur 35 prélèvements d'eaux) mais elles concernent une courte période (5 mois) et peu de prélèvements. Par conséquent, la collection de souches est majoritairement représentée par des souches issues des sites Charles Nicolle (n=57) et Bois Guillaume (n=12).

La majorité de notre collection de souches environnementales était représentée par le groupe *P. oleovorans* (n=46) qui inclut les espèces *indoloxydans*, *oleovorans* et *mendocina.* Dans la littérature, les *Pseudomonas* issus de prélèvements d'eaux, sont majoritairement des *Peudomonas* du groupe *fluorescens* [92, 104] et du groupe *putida* [92]. On constate donc une différence de répartition d'espèces et de groupes d'espèces entre les eaux hospitalières (notre collection de souches) et les eaux potables [92, 104].

Pour ce qui est des souches cliniques, malgré le faible effectif de notre étude, une majorité de *Pseudomonas du groupe putida*, (n=8) a été collectée, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Jacquier *et al.* [51]).

Dans la collection de souches disponible au laboratoire d'hygiène, une souche préalablement identifiée comme un *Pseudomonas* autre qu'*aeruginosa* à partir d'une identification phénotypique classique s'est révelé être identifiée comme étant un *P. aeruginosa* par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ce résultat renforce l'intérêt de ne pas se fier qu'aux techniques phénotypiques classiques pour affirmer l'absence de *P. aeruginosa*.

L'origine des souches est assez variée, la collection est constituée de 85 souches issues de 23 services différents. Parfois, une même espèce a été retrouvée à des périodes différentes dans un même service. Par exemple, nous retrouvons 7 souches de *P.*

oleovorans en Réanimation Chirurgicale isolées à quatre moments différents sur une période de deux ans. Il serait intéressant de réaliser un typage de ces souches par ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus) qui utilise la migration par électrophorèse capillaire d'amplicons de PCR dont les amorces ciblent des régions répétées dispersées. Cela permettrait de discuter d'une éventuelle persistance des souches. S'il s'avère que ce sont les même souches qui persistent au cours du temps, il serait intéressant d'étudier leur capacité à former du biofilm in vitro.

Dans notre étude, les antibiogrammes ont été réalisés et interprétés selon les recommandations du CASFM-EUCAST 2016 [130]. Ces recommandations sont destinées aux *Pseudomonas* sp. et non pas uniquement aux *P. aeruginosa*, malgré le peu de données concernant les résistances des *Pseudomonas* autres qu'*aeruginosa*. Les données de la littérature concernant ces espèces n'ont pas été interprétées selon les mêmes recommandations. Flores-Ribeiro *et al*. [92] ont utilisé le CASFM 2010, Sader *et al*. [72] les données du CLSI 2005 et Luczkiewicz *et al*. [104] les données de l'EUCAST 2015.

Dans la littérature, les données ne présentent pas de profils de résistance mais une énumération des résistances molécule par molécule. Les pourcentages de résistance sont donnés par espèce mais les identifications ne sont pas toujours fiables (API20NE®, galerie d'identification en milieu liquide). Il est donc difficile de connaître des profils de résistance par espèces du fait du problème d'identification fiable des espèces et des différences de méthode d'analyse des résultats.

Notre travail montre que certains groupes d'espèces (*oleovorans*) présentent moins de résistance aux antibiotiques que d'autres (*putida*, *fluorescens, aeruginosa*). L'identification d'un *Pseudomonas* dans un prélèvement clinique au rang de groupe d'espèces en 1ère intention pourrait donc orienter l'antibiothérapie.

Nos données concernant la résistance diffèrent de celles de la littérature. La moitié de nos souches ne présente aucune résistance (50%) et la majorité de nos souches (88%) ne présentent pas de résistance à plus de 3 molécules. Or, les données de Flores Ribeiro *et al*. [92] et Vaz-Moreira *et al*. [103] présentent une majorité de souches résistantes à plus de 3 molécules. Cela peut s'expliquer par l'origine des souches mais aussi par le fait que nous ne nous sommes pas intéressés, contrairement aux autres études, à la résistance au cotrimoxazole (sulfaméthoxazole et triméthoprime), à l'aztréonam et à la colistine. En effet, les recommandations du CASFM-EUCAST 2016 ne proposent plus de diamètres critiques pour la colistine et le cotrimoxazole. En ce qui concerne l'aztréonam, les

diamètres critiques (sensible si > 50 mm) ne permettent plus de rendre une souche sensible à cette molécule.

Dans notre étude, la majorité des résistances retrouvées concernent la résistance à la ticarcilline (46,5% des souches) et à l'association ticarcilline et acide clavulanique (43%). Cela est comparable avec les données de Flores Riberio *et al*. [92]. Cependant les pourcentages de résistance à ces molécules sont deux fois plus élevés que les nôtres (respectivement 84% et 80%). Cela est peut-êtte lié au fait que les souches étudiées par Flores Ribeiro *et al.* ne sont pas issues d'eaux de réseau hospitalier [92]. Cela peut aussi être du au fait que Flores Ribeiro *et al*. [92] retrouvaient essentiellement des *Pseudomonas* des groupes *putida* et *fluorescens* qui semblent être plus résistants que les *Pseudomonas* du groupe *oleovorans*, majoritaires au sein de notre collection de souches. Aucune résistance à l'amikacine n'a été décrite et seule une souche présente une résistance à l'imipénème.

Nous avons interprété les phénotypes en supposant que l'on pouvait extrapoler les mécanismes de résistance de *P. aeruginosa* à ceux des *Pseudomonas* non *aeruginosa* [131]. Dans notre collection de souches, on ne retrouve pas de phénotypes de résistance aberrants. Les systèmes d'efflux décrits chez *P. putida* présentent une forte homologie avec ceux retrouvés chez *P. aeruginosa* [117, 118]. Lorsque nous avions l'association d'une résistance à la ticarcilline et à l'association ticarcilline et acide clavulanique, nous l'avons attribuée à un mécanisme d'efflux. Une résistance conjointe à la ticarcilline et à la pipéracilline a été interprétée comme un phénotype du à une pénicillinase, etc.

Notre collection de souches présente donc une majorité de phénotype de résistance de type mécanisme d'efflux (n=23), pour lequel aucune transmission horizontale n'a été décrite. Depuis quelques années, la majorité des publications liée à la résistance des *Pseudomonas* sp. décrivent des métallo-carbapénémases majoritairement chez des souches de *P. putida* [108, 109, 111, 112, 113, 114, 116]. Dans notre étude, nous disposons de quatre souches (1 *P. soli* [groupe *putida*] et 3 *Pseudomonas* du groupe *aeruginosa*) dont les diamètres d'inhibition de la ceftazidime et du méropénème n'étaient pas restaurés sur gélose additionnée de 2000 mg/L de cloxacilline. Ces souches ne présentaient pas de résistance à l'imipénème. Le phénotype pourrait donc évoquer une bêta-lactamase de classe B codant un bas niveau de résistance aux carbapénèmes, comme décrit dans la littérature [112]. Sachant que les enzymes principalement retrouvées dans la littérature sont des IMP, VIM, il faudrait réaliser une amplification des gènes codant ces enzymes pour nos quatres souches afin de le confirmer.

Les souches cliniques étaient significativement plus résistantes que les souches environnementales, mais les souches cliniques étaient majoritairement représentées par des espèces du groupe *putida*, qui semblent présenter plus de résistance [104] que celles du groupe *oleovorans*, majoritaires parmi les souches environnementales.

Les *Pseudomonas* sp. semblent poser problème en tant que contaminants des solutions de désinfectants [119, 120]. Or, certaines études montrent l'existence d'intégrons porteurs de déterminants de résistance aux désinfectants. Une prochaine étape pourrait être de s'intéresser à la résistance aux désinfectants au sein de notre collection de souches, en particulier pour les souches « persistantes » c'est à dire celles que l'on retrouve dans le même service, à plusieurs reprises au cours du temps.

Une autre difficulté que pose le genre *Pseudomonas* sp. est la caractérisation du pouvoir pathogène par espèce. Dans notre collection de souches cliniques, les *Pseudomonas* étaient issus de prélèvements variés, semblables à ce qui est rapporté dans la littérature [62, 63] tels que des hémocultures sur matériel, liquide de conservation d'organe, biopsie cutanée, etc. Certaines espèces ont un pouvoir pathogène spécifique bien connu (*P. entomophila* et pathogénicité chez les insectes, *P. syringae* et pathogénicité chez les végétaux, *P. otitidis* et otites, etc.). Cependant, les cas cliniques rapportés dans la littérature en santé humaine utilisent souvent jusqu'à maintenant des méthodes d'identfication non fiables à l'échelle de l'espèce (API20NE, bioMérieux®, automate d'identification en milieu liquide) ; il est donc quasiment impossible à l'heure actuelle de déterminer le pouvoir pathogène de ces espèces chez l'homme de façon fiable et de discuter de l'impact sur la santé humaine des espèces retrouvées dans l'eau.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'identification des *Pseudomonas* sp. est difficile au rang de l'espèce du fait de leur évolution taxonomique, la proximité phylogénétique entre les espèces et la faiblesse des bases de données existantes. Le séquençage de l'ADNr 16S s'est montré insuffisamment discriminant, c'est le séquençage de plusieurs gènes domestiques (*rpoD*, *rpoB*, *oprF,* etc.) qui permettra de discriminer les espèces de *Pseudomonas* entre elles.

Le séquençage des gènes ADNr 16S et *rpoD* a permis l'identification des *Pseudomonas* au rang de l'espèce dans 65% des cas.

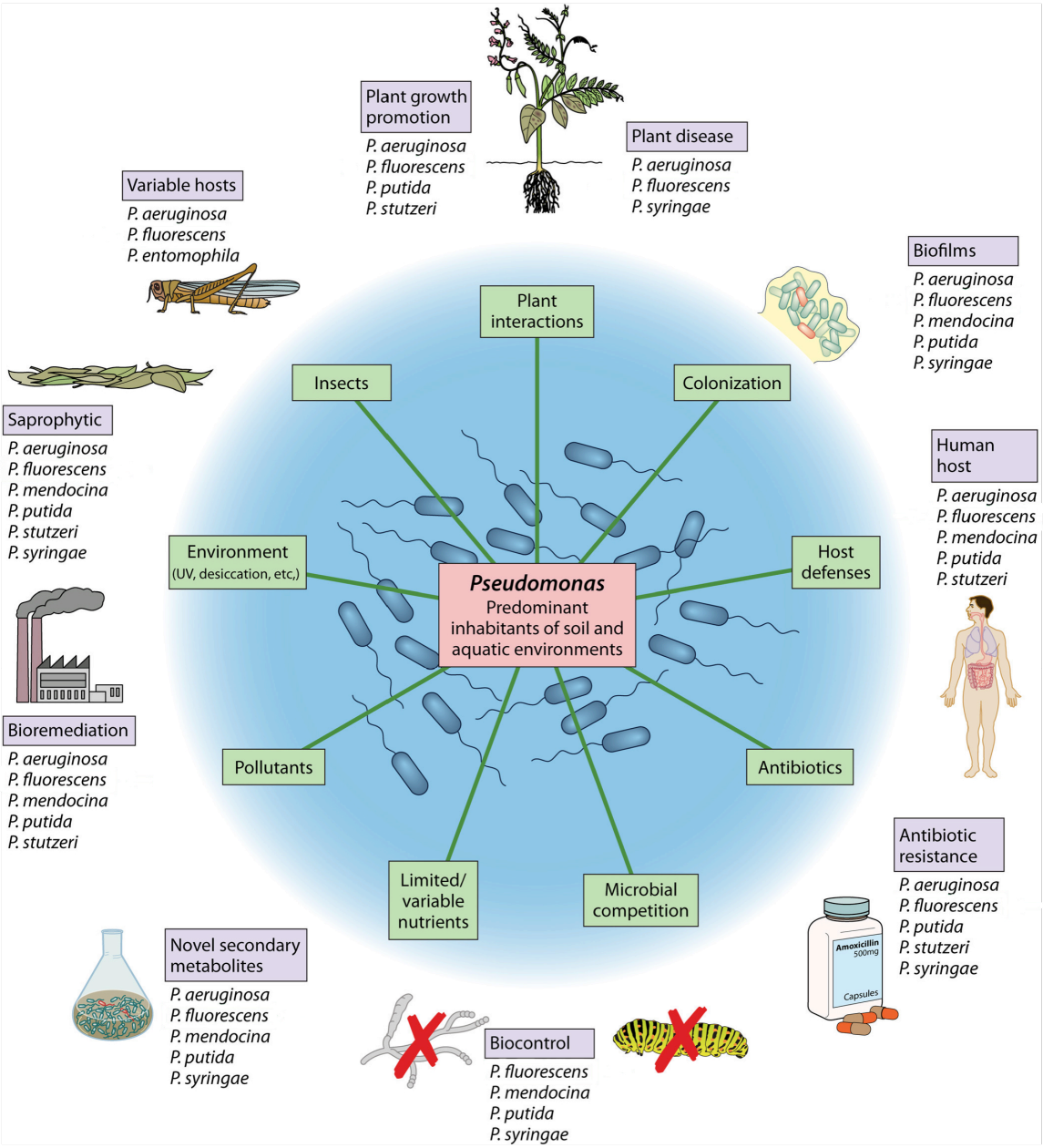
Les essais réalisés dans le cadre de la validation de méthode en portée B flexible de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse MALDI-TOF montrent des résultats satisfaisants. Les essais de robustesse n'ont pas montré d'influence du type de milieu de culture ni de l'âge des cultures sur la qualité de l'identification.

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF permet donc d'identifier les bactéries du genre *Pseudomonas* en routine au rang de groupe d'espèces.

Notre collection de souches s'est révelée relativement diverse (groupes *aeruginosa*, *oleovorans*, *putida* et *fluorescens*) avec une majorité d'espèces appartenant au groupe *oleovorans* pour les souches environnementales et au groupe *putida* pour les souches cliniques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de cette collection a montré une résistance aux antibiotiques plus fréquente pour les souches cliniques. Certains groupes d'espèces (*oleovorans*) présentaient moins de résistance aux antibiotiques que d'autres (*putida*, *fluorescens*). La majorité des phénotypes de résistance ont été attribué à un mécanisme non transmissible (efflux) d'une espèce à l'autre. Cependant, le phénotype de résistance des quatres souches suspectées d'être liée à une carbapénémase, est encore à élucider.

Annexe 1 : Caractéristiques et niches écologiques des principales espèces de *Pseudomonas* sp. [29]



Annexe 2 : Classification et lien phylogénétique des *Pseudomonas* sp. établis à partir des séquences du gène de l'ADNr 16S [28]

Proteobacteria subclass*	Previous name	Current classification or phylogenetic affiliation	Reference	Strain no.	Accession no.
(Authentic *Pseudomonas*)	***Pseudomonas aeruginosa* group**				
	Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*	Kersters *et al.* (1996)	LMG 1242^T	Z76651
	Pseudomonas alcaligenes	*Pseudomonas alcaligenes*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 12411^T	D84006
	Pseudomonas anguilliseptica	*Pseudomonas anguilliseptica*	Kersters *et al.* (1996)	NCMB 1949^T	AB021376†
	Pseudomonas citronellolis	*Pseudomonas citronellolis*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 13674^T	AB021396†
	Pseudomonas flavescens	*Pseudomonas flavescens*	Kersters *et al.* (1996)	B62^T	U01916
	Pseudomonas mendocina	*Pseudomonas mendocina*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 25411^T	M59154
	Pseudomonas nitroreducens	*Pseudomonas nitroreducens*	Anzai *et al.* (1997)	IAM 1439^T	D84021
	Pseudomonas oleovorans	*Pseudomonas oleovorans*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 1508^T	D84018
	Pseudomonas pseudoalcaligenes	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	Kersters *et al.* (1996)	JCM 5968^T	AB021379†
	Pseudomonas resinovorans	*Pseudomonas resinovorans*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 14235^T	AB021373†
	Pseudomonas straminae	*Pseudomonas straminae*	Anzai *et al.* (1997)	IAM 1598^T	D84023
	***Pseudomonas chlororaphis* group**				
	Pseudomonas aurantiaca	*Pseudomonas aurantiaca*	This study	ATCC 33663^T	AB021412†
	Pseudomonas aureofaciens	*Pseudomonas chlororaphis*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 12353^T	D84008
	Pseudomonas chlororaphis	*Pseudomonas chlororaphis*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 12354^T	D84011
	Pseudomonas fragi	*Pseudomonas fragi*	Kersters *et al.* (1996)	IFO 3458^T	AB021413‡
	Pseudomonas lundensis	*Pseudomonas lundensis*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 49968^T	AB021395†
	Pseudomonas taetrolens	*Pseudomonas taetrolens*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 1653^T	D84027
	***Pseudomonas fluorescens* group**				
	Pseudomonas azotoformans	*Pseudomonas azotoformans*	Anzai *et al.* (1997)	IAM 1603^T	D84009
	'*Pseudomonas cedrella*'	'*Pseudomonas cedrella*'	This study	CFML 96-198	AF064461
	Pseudomonas corrugata	*Pseudomonas corrugata*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 29736^T	D84012
	Pseudomonas fluorescens	*Pseudomonas fluorescens*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 12022^T	D84013
	'*Pseudomonas gessardii*'	'*Pseudomonas gessardii*'	This study	CIP 105469	AF074384
	'*Pseudomonas libaniensis*'	'*Pseudomonas libaniensis*'	This study	CIP 105460	AF057645
	'*Pseudomonas mandelii*'	'*Pseudomonas mandelii*'	This study	CIP 105273	AF058286
	Pseudomonas marginalis	*Pseudomonas marginalis*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 10844^T	AB021401†
	'*Pseudomonas migulae*'	'*Pseudomonas migulae*'	This study	CIP 105470	AF074383
	Pseudomonas mucidolens	*Pseudomonas mucidolens*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 12406^T	D84017
	'*Pseudomonas orientalis*'	'*Pseudomonas orientalis*'	This study	CFML 96-170	AF064457
	Pseudomonas rhodesiae	*Pseudomonas rhodesiae*	This study	CIP 104664^T	AB021410†
	Pseudomonas synxantha	*Pseudomonas synxantha*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 12356^T	D84025
	Pseudomonas tolaasii	*Pseudomonas tolaasii*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 33618^T	D84028
	Pseudomonas veronii	*Pseudomonas veronii*	This study	CIP 104663^T	AB021411†
	***Pseudomonas pertucinogena* group**				
	'*Pseudomonas denitrificans*'	'*Pseudomonas denitrificans*'	This study	IAM 12023^T	AB021419‡
	Pseudomonas pertucinogena	*Pseudomonas pertucinogena*	This study	IFO 14163^T	AB021380†
	***Pseudomonas putida* group**				
	'*Pseudomonas mosselii*'	'*Pseudomonas mosselii*'	This study	CIP 105259	AF072688
	Pseudomonas fulva	*Pseudomonas fulva*	Anzai *et al.* (1997)	IAM 1529^T	D84015
	Pseudomonas monteilii	*Pseudomonas monteilii*	This study	CIP 104883^T	AB021409†
	Pseudomonas oryzihabitans	*Pseudomonas oryzihabitans*	Anzai *et al.* (1997)	IAM 1568^T	D84004
	'*Pseudomonas plecoglossicida*'	'*Pseudomonas plecoglossicida*'	This study	FPC951	AB009457
	Pseudomonas putida	*Pseudomonas putida*	Kersters *et al.* (1996)	IAM 1236^T	D84020
	***Pseudomonas stutzeri* group**				
	Pseudomonas balearica	*Pseudomonas balearica*	Kersters *et al.* (1996)	SP 1402^T	U26418
	Pseudomonas luteola	*Pseudomonas luteola*	Anzai *et al.* (1997)	IAM 13000^T	D84002
	Pseudomonas stutzeri	*Pseudomonas stutzeri*	Kersters *et al.* (1996)	CCUG 11256^T	U26262
	***Pseudomonas syringae* group**				
	Pseudomonas amygdali	*Pseudomonas amygdali*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 33614^T	D84007
	Pseudomonas avellanae	*Pseudomonas avellanae*	Kersters *et al.* (1996)	P90	U49384
	Pseudomonas caricapapayae	*Pseudomonas caricapapayae*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 33615^T	D84010
	Pseudomonas cichorii	*Pseudomonas cichorii*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 10857^T	AB021398†
	Pseudomonas coronafaciens	*Pseudomonas syringae*	Kersters *et al.* (1996)	LMG 13190^T	Z76660
	Pseudomonas ficuserectae	*Pseudomonas ficuserectae*	Kersters *et al.* (1996)	JCM 2400^T	AB021378†
	Pseudomonas meliae	*Pseudomonas meliae*	Kersters *et al.* (1996)	MAFF 301463^T	AB021382†
	Pseudomonas savastanoi	*Pseudomonas savastanoi*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 13522^T	AB021402†
	Pseudomonas syringae	*Pseudomonas syringae*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 19310^T	D84026
	Pseudomonas viridiflava	*Pseudomonas viridiflava*	Kersters *et al.* (1996)	LGM 2352^T	Z76671
	Ungrouped				
	Pseudomonas agarici	*Pseudomonas agarici*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 25941^T	D84005
	Pseudomonas asplenii	*Pseudomonas asplenii*	Kersters *et al.* (1996)	ATCC 23835^T	AB021397†
	Pseudomonas fuscovaginae	*Pseudomonas fuscovaginae*	Kersters *et al.* (1996)	MAFF 301177^T	AB021381†
	'*Pseudomonas jessenii*'	'*Pseudomonas jessenii*'	This study	CIP 105274	AF068259

Annexe 3 : Similarité et distances entre les séquences d'ADNr 16S pour les différentes espèces du genre *Pseudomonas* sp. [44]

Table 2. Similarities [%] (upper right) and evolutionary distances (lower left) between 16S rDNA sequences of species of the genus *Pseudomonas*

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 *P. aeruginosa*		96.7	97.6	97.2	97.3	95.3	97.1	97.0	96.9	94.7	94.2	93.9	94.6	94.6	94.5	93.8	94.5	93.7	94.4	94.5	94.1	95.3	95.3	95.0	83.9
2 *P. citronellolis*	.033		96.6	96.3	95.6	94.4	95.8	96.1	96.0	94.0	94.1	94.0	94.3	93.9	93.9	94.2	94.0	94.0	94.0	94.2	93.3	95.0	94.8	95.2	83.7
3 *P. alcaligenes*	.024	.035		97.7	97.1	95.2	97.7	98.0	98.0	95.7	94.8	94.4	95.1	95.2	95.2	94.4	95.0	94.1	94.9	95.0	94.6	96.6	96.6	96.0	83.4
4 *P. stutzeri*	.029	.038	.023		96.3	97.0	97.9	98.0	98.0	96.0	95.4	94.9	95.6	95.8	95.8	95.2	95.6	94.7	95.5	95.3	95.6	97.1	97.1	96.5	83.9
5 *P. resinovorans*	.027	.046	.030	.038		96.9	96.6	96.9	96.8	94.2	94.7	94.3	94.9	95.0	95.0	94.1	95.1	94.2	95.0	95.1	94.7	95.1	95.0	94.2	83.3
6 *P. balearica*	.049	.058	.05	.030	.032		95.8	95.9	95.9	93.9	95.0	94.4	95.2	94.8	94.9	94.6	95.4	94.5	95.3	95.2	95.2	95.2	95.0	94.3	83.7
7 *P. mendocina*	.029	.043	.023	.021	.035	.043		99.4	99.4	96.5	96.0	95.6	96.0	96.4	96.4	95.5	96.1	95.5	96.0	96.0	95.7	98.0	97.7	97.1	84.0
8 *P. pseudoalcaligenes*	.030	.04	.020	.020	.032	.042	.006		99.9	96.8	96.2	95.6	96.1	96.5	96.4	95.6	96.2	95.4	96.3	96.2	95.9	97.5	97.5	97.1	84.0
9 *P. oleovorans*	.031	.041	.020	.020	.032	.042	.006	.001		96.7	96.2	95.6	96.1	96.5	96.4	95.6	96.2	95.4	96.3	96.3	95.9	97.6	97.5	97.1	83.9
10 *P. flavescens*	.055	.062	.044	.041	.060	.064	.036	.033	.033		94.4	94.2	94.9	94.7	94.6	94.4	94.7	93.8	94.6	94.6	94.4	96.6	95.9	95.7	84.6
11 *P. fluorescens*	.061	.061	.054	.047	.055	.052	.041	.039	.039	.058		98.5	99.0	98.6	98.7	97.9	97.6	97.4	97.8	97.9	96.6	97.3	97.4	97.2	84.3
12 *P. marginalis*	.063	.063	.058	.053	.059	.058	.045	.046	.045	.061	.015		98.7	98.3	99.0	97.2	97.3	96.8	97.6	97.8	96.7	96.7	96.8	96.6	83.8
13 *P. tolaasii*	.056	.059	.051	.045	.053	.049	.041	.040	.040	.053	.010	.013		98.5	98.9	97.9	97.8	97.2	97.9	98.2	97.1	97.4	97.2	97.0	84.3
14 *P. chlororaphis*	.056	.064	.049	.044	.052	.053	.037	.036	.036	.055	.014	.018	.015		99.5	97.6	98.3	97.7	98.5	98.4	97.7	97.5	97.8	97.4	84.2
15 *P. aureofaciens*	.057	.064	.05	.043	.052	.053	.037	.036	.037	.056	.013	.010	.011	.005		97.7	97.9	97.3	98.1	98.1	97.4	97.4	97.7	97.4	84.2
16 *P. viridiflava*	.065	.061	.058	.049	.061	.055	.046	.046	.045	.058	.021	.029	.021	.024	.023		97.5	97.9	97.5	97.4	97.2	97.1	96.7	97.1	84.0
17 *P. syringae*	.057	.062	.052	.045	.051	.047	.040	.038	.039	.055	.025	.027	.022	.018	.021	.025		99.0	99.5	99.5	98.1	97.1	96.9	96.9	84.3
18 *P. amygdali*	.066	.062	.061	.054	.060	.057	.047	.048	.047	.064	.026	.033	.028	.024	.028	.022	.010		98.7	98.6	97.2	96.6	96.4	97.1	84.1
19 *P. coronafaciens*	.058	.063	.053	.046	.052	.049	.041	.038	.038	.056	.022	.024	.021	.015	.019	.026	.005	.013		99.5	98.3	97.2	97.1	97.1	84.3
20 *P. ficuserectae*	.058	.060	.052	.049	.051	.05	.041	.039	.038	.056	.021	.022	.019	.016	.019	.027	.005	.014	.005		98.0	97.2	97.0	97.1	84.6
21 *P. cichorii*	.061	.070	.056	.046	.055	.05	.044	.042	.042	.058	.034	.034	.029	.023	.026	.029	.019	.029	.017	.02		96.8	96.8	96.5	84.0
22 *P. putida*	.049	.051	.035	.029	.051	.05	.020	.025	.025	.035	.027	.034	.027	.025	.027	.029	.029	.035	.029	.028	.032		99.2	97.9	84.0
23 *P. asplenii*	.049	.053	.035	.029	.052	.052	.023	.026	.025	.042	.026	.033	.029	.022	.023	.034	.031	.037	.029	.030	.033	.008		98.3	83.8
24 *P. agarici*	.052	.05	.041	.036	.060	.059	.029	.029	.029	.044	.029	.034	.030	.027	.027	.029	.031	.030	.029	.03	.036	.022	.017		84.2
25 *Escherichia coli*	.181	.184	.188	.181	.189	.184	.180	.180	.181	.172	.177	.182	.176	.178	.178	.179	.176	.179	.176	.173	.180	.180	.182	.178	

Strains used for analysis: *P. aeruginosa* (LMG 1242^T), *P. agarici* (LMG 2112^T), *P. alcaligenes* (LMG 1224^T), *P. amygdali* (LMG 2123^T), *P. asplenii* (LMG 2137^T), *P. aurefaciens* (DSM 6698^T), *P. chlororaphis* (LMG 5004^T), *P. cichorii* (LMG 2162^T), *P. citronellolis* (DSM 50332^T), *P. coronafaciens* (LMG 13190^T), *P. ficuserectae* (LMG 5694^T), *P. fluorescens* (DSM 50090^T), *P. marginalis* pv. *marginalis* (LMG 2210^T), *P. mendocina* (LMG 1223^T), *P. oleovorans* (DSM 1045^T), *P. pseudoalcaligenes* (LMG 1225^T), *P. putida* (DSM 291^T), *P. resinovorans* (LMG 2274^T), *P. syringae* pv. *syringae* (LMG 1247 t_1^T), *P. tolaasii* (LMG 2342^T), *P. viridiflava* (LMG 2352^T). Sequences obtained from Genbank sequence database: *P. balearica* (DSM 6083^T): U26418; *P. flavescens* (NCPPB 3063^T): U01916; *P. stutzeri* (CCUG 11256^T): U26262

Annexe 4 : SH FORM 43 Fiche type de vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera ***une fiche par examen de biologie médicale***

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Identification des *Pseudomonas sp.* par spectrométrie de masse type MALDI-TOF
Processus simple ■ ; Processus complexe ☐ (nombre de sous-processus : …)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation[1] : ■ 1. Répétabilité ■ 2. Fidélité intermédiaire ■ 3. Variabilité inter-opérateurs ☐ 4. Justesse ☐ 5. Exactitude ■ 6. Sensibilité et spécificité analytique ☐ 7. Incertitudes ☐ 8. Etendue de mesure ■ 9. Comparaison de méthodes ☐ 10. Interférences ■ 11. Contamination ■ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☐ 13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maitriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

[1] *Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.*
Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.
L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

SOUS-PROCESSUS 1 : titre
Portée A ☐ ; Portée B ■ (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Colonie bactérienne de *Pseudomonas.*
Principe de la Méthode :	Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.
Type d'échantillon primaire :	Culture bactérienne.
Type de récipient, additifs :	NA
Prétraitement de l'échantillon :	Qualité du dépôt bactérien et du dépôt de la matrice. Propreté de la cible utilisée.
Unités :	Pas d'unité, résultat en nom de genre et/ou d'espèce
Critères d'interprétation[2] :	NA
Marquage CE (Oui/Non) :	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Spectromètre de masse type MALDI-TOF Bruker® daltonics. 2 cibles réutilisables.
Référence du réactif :	Réactifs Bruker : - matrice IVD (HCCA : acide 4-cyano-4-hydroxycinnamique) REF 8290200 - IVD Bacterial Test Standard (BTS) REF 8290190
Matériau d'étalonnage (références) :	NA
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	NA

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Personnel formé et habilité à la méthode. (5 techniciennes) cf. Habilitation techniciens
Procédure de validation/mode opératoire :	« Pôle biologie : Procédure générale de validation des méthodes analytiques » (REF GEDI 4544)
Procédure de gestion de la portée flexible :	« Pôle biologie clinique : Procédure de gestion de la portée flexible » (REF GEDI 8157)
Période d'étude :	Février-Avril 2016
Date de 1ère utilisation :	Mise en route de l'automate

L'analyse des risques et de leur maîtrise selon la méthode des 5M est centrée sur la phase analytique de l'étape d'identification des germes appartenant au genre *Pseudomonas* par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les risques globaux, pré-analytiques et post-analytiques sont traités dans d'autres procédures, communes au laboratoire.

[2] Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge…

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité[3]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Nature et volume de l'échantillon	4 (4*3*2*0,7)	Spécimen issu des échantillons en quantité insuffisante. (nombre de colonies) Pureté de la colonie bactérienne. Qualité du dépôt bactérien sur la cible et du dépôt de la matrice.	Formation et habilitation du personnel. Protocole de préparation par dépôt. (REF 20 681)
	Délai et température avant traitement analytique	3 (2*3*1*0,5)	Gestion logistique.	
	Prétraitement : centrifugation, …	12,6 (2*3*3*0,7)	Propreté de la cible utilisée. Extraction simple et complexe.	Formation et habilitation du personnel. Protocole fournisseur de nettoyage des cibles réutilisables. (REF 20 685) Protocole d'extraction.
	Interférences	12,6 (2*3*3*0,7)	Résultat incohérent en lien avec la qualité du prélèvement: contamination.	Essai de contamination. Formation et habilitation du personnel.
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, …)	4,2 (1*3*2*0,7)	Suivi des températures des pièces techniques. Utilisation des réactifs recommandés par le fournisseur Bruker®. Respect des conditions de conservations. Gestion des stocks.	Instructions de conservation Enregistrements métrologiques Réactifs stockés et utilisés selon les recommandations du fournisseur.
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, …)	5,6 (1*4*2)		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1,4 (1*2*1*0,7)	Conditions environnementales (statiques et/ou dynamiques dans le temps) Température (15-30°), humidité, empoussièrement. Eclairage suffisant de la zone de travail. Conditions garantissant la sécurité du personnel.	Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur Enregistrements des conditions environnementales. Climatisation de la pièce.
Matériel (équipements)	Surveillance des dérives	2,8 (1*2*2*0,7)	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, …)	Enregistrements des maintenances Traçabilité métrologique, CIQ/EEQ

[3] A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	**Points critiques**	**Echelle de criticité[3]**	**Eléments à maîtriser**	**Moyens de maitrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, …) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, …) avec les références du SMQ du laboratoire**
	Informatique embarquée	6,3 (1*3*3*0,7)	Utilisation maîtrisée du logiciel IV MALDI Biotyper. Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données, …	Sauvegarde des données sur l'automate/Maintenance/Fiche de vie du logiciel Version actualisée, information par le fournisseur lors d'une modification.
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	2 (1*2*2*0,5)	Température de stockage, intégrité des réactifs. Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Fiches fournisseur Traçabilité métrologique
	Gestion des stocks	3 (1*3*2*0,5)	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks : condition de stockage et d'utilisation.	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison) Logiciel de gestion des stocks (SAPANET)
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	3 (1*3*2*0,5)	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, …)	4 (1**4*2*0,5)	Critères de choix de la méthode. Vérification ou validation de la méthode sur site.	Voir SH GTA 04 §9.6.1.7 Procédure générale de validation des méthodes GEDI 4544. Formulaire de calculs pour la vérification/validation d'une méthode modèle Gedi n°110. Veille documentaire / Données bibliographiques/ Passage systématique du BTS (contrôle interne fourni par Bruker®) Suivi des CIQ et EEQ. Passage quotidien d'une souche ATCC de L.pneumophilia.
	Causes d'incertitude de mesure	NA	Calcul des incertitudes de mesure (non quantifiable pour les méthodes qualitatives)	Voir SH GTA 04 §9.6.1.5
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	2,5	Formation et évaluation des compétences du personnel. Habilitation du personnel. Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure.	Formation et habilitation du personnel. Fiche de poste Lecture des boîtes et identification. (REF 11 848) Fiche : Identification Maldi-Tof (REF 16 918) Traçabilité de l'occupation des postes de travail. Livret d'accueil

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, …) : colonie bactérienne

REPETABILITE Applicable ■ ; non applicable (à justifier) ☐										
Souches ATCC	**Scores (colonies de 18h sur gélose au sang)**									
Pseudomonas aeruginosa	2,4	2,34	2,47	2,46	2,5	2,44	2,46	2,31	2,44	2,44
Sphingomonas paucimobilis	2,32	2,26	2,38	2,43	2,34	2,38	2,29	2,3	2,31	2,31
Stenotrophomonas maltophilia	2,37	2,36	2,44	2,44	2,52	2,52	2,53	2,46	2,48	0
Pseudomonas fluorescens	2,38	2,34	2,42	0	2,41	2,36	2,18	2,26	2,42	2,44
Pseudomonas putida	2,53	0	2,6	2,6	2,53	2,55	2,5	2,57	2,59	2,58
Pseudomonas syringae	2,12	2,02**	2,15*	2,12	1,98**	1,99**	2,1	0	2,05**	1,96**
Pseudomonas stutzeri	2,22	2,16	2,37	0	2,26	2,3	2,32	2,31	2,29	0

* savastanoi ** caricapapaye

Argumentaire de la conclusion : 10 fois le dépôt des 7 souches ATCC dans les conditions standard recommandées par le fournisseur (culture de 18h sur gélose au sang) le même jour par le même utilisateur (n=70) sur la même cible.

Identification correcte dans 92% des cas.

Méthode vérifiée pour la répétabilité.

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable ■ ; non applicable (à justifier) ☐				
Milieu	**Souches ATCC**	**24 H**	**48 H**	**72 H**
Gélose au sang	*Pseudomonas aeruginosa*	2,39	2,38	2,3
	Sphingomonas paucimobilis	2,39	2,46	2,46
	Stenotrophomonas maltophilia	2,38	2,41	2,25
	Pseudomonas fluorescens	2,33	2,45	2,37
	Pseudomonas putida	2,52	2,42	2,52
	Pseudomonas syringae	2,07	2,24	2,33
	Pseudomonas stutzeri	2,33	2,35	2,24
CFC	*Pseudomonas aeruginosa*	2,29	2,44	2,44
	Sphingomonas paucimobilis	2,5	2,49	2,47
	Stenotrophomonas maltophilia	2,32	2,36	2,35
	Pseudomonas fluorescens	2,33	2,45	2,4
	Pseudomonas putida	2,49	2,53	2,62

	Pseudomonas syringae	2,14	2,13	2,13
	Pseudomonas stutzeri	2,15	2,21	2,24
Cétrimide	*Pseudomonas aeruginosa*	2,39	2,33	2,42
	Sphingomonas paucimobilis	2,4	2,43	2,48
	Stenotrophomonas maltophilia	2,29	2,35	2,32
	Pseudomonas fluorescens	2,21	2,39	2,34
	Pseudomonas putida	2,5	2,47	2,46
	Pseudomonas syringae	2,1-1,8	1,82-1,92	1,9-1,96
	Pseudomonas stutzeri	2,18	1,97-2,17	2,21
TSA	*Pseudomonas aeruginosa*	2,45	2,48	2,48
	Sphingomonas paucimobilis	2,53	2,37	2,4
	Stenotrophomonas maltophilia	2,43	2,38	2,15
	Pseudomonas fluorescens	2,38	2,46	2,24
	Pseudomonas putida	2,62	2,59	2,49
	Pseudomonas syringae	2,11	2,15	2,21
	Pseudomonas stutzeri	2,22	2,42	2,37

Argumentaire de la conclusion : Les 7 souches ATCC ont été déposées en double 5 jours différents, sur 5 cibles différentes et par des opérateurs différents (n=70). Les opérateurs sont 5 personnes habilitées au dépôt sur cible MALDI.
Méthode vérifiée pour la reproductibilité.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS **Applicable ■ ; non applicable ☐**	
Opérateur évalué 1 **Opérateur évalué 2** **…**	La variabilité inter-opérateurs a été testée dans la fidelité intermédiaire (Reproductibilité)

Argumentaire de la conclusion : La variabilité inter-opérateurs est prise en compte dans les essais de Fidélité intermédiaire.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) **Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ■**								
Echantillons	**Nombre de valeurs** (N)	**Valeurs Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Biais** (%) **/groupe de pairs**	**Moyenne générale (toutes techniques)**	**Biais** (%) **/ moyenne générale**	**Biais** (%) **Limite**[4]	**Conclusion**[5]
Echantillon CIQ niveau 1								

Argumentaire de la conclusion : Non applicable.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) **Contrôles quantitatifs ☐ ; Contrôles qualitatifs ☐**							
Echantillons	**Valeur Labo**	**Cible (groupe de pairs)**	**Cible** (toutes techniques)	**Biais** (%) **/ groupe de pairs**	**Biais** (%) **/ toute technique**	**Biais** (%) **limite**[4]	**Conclusion**[5]
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion : Non applicable.

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ■ ; non applicable (à justifier) ☐	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP Analyse bibliographique.
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion : Dans le cas de la validation de méthode d'une identification microbienne, la notion de concordance au genre et à l'espèce est préférable. Elle est prise en compte dans la comparaison de méthode avec la méthode de référence.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ■ ; calcul ☐		
	Incertitudes calculées	**Exigence de performances**
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : **Etude de l'incertitude par analyse de risques**

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☐ ; non applicable ■	
Limite de détection :	LD trouvée ou référence bibliographique

Argumentaire de la conclusion : La limite de détection ne concerne pas notre validation de méthode.

COMPARAISON DE METHODES : Applicable ■ ; non applicable (à justifier) ☐	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,…) :	Références méthodes
Autre méthode utilisée dans le laboratoire : méthode de référence	Identification par biologie moléculaire : PCR-séquençage de l'ADNr 16S et du gène *rpoD*.
Nombre de mesures :	85 souches : 74 souches environnementales et 11 souches cliniques
Description de l'échantillon étudié.	Les souches utilisées sont des *Pseudomonas sp.* Isolées de prélèvements environnementaux et cliniques représentatives des espèces potentiellement rencontrées au laboratoire.
Méthode d'exploitation des résultats :	Etude des concordances.
Résultats et interprétations des discordances	Pour les 85 souches, on retrouve 100% de concordance d'identification au genre, 100% d'identification au groupe. mais des résultats non satisfaisants de corrélation au rang de l'espèce (27,3%) principalement pour les groupes *aeruginosa, putida et fluorescens*
Conclusions et dispositions :	L'identification est fiable au rang du groupe bactérien.

Argumentaire de la conclusion :

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, …) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ■		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)

Argumentaire de la conclusion : L'étendue de mesure ne concerne pas notre validation de méthodes.

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, … - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ■	
…	

Argumentaire de la conclusion : L'étude d'interférence ne concerne pas notre validation de méthode.

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ■ ; non applicable (à justifier) ☐	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles	Alternance de puits matrice + bactérie (n=6) et matrice seule (n=6)
Inter réactif si nécessaire	NA

Argumentaire de la conclusion : Absence de contamination dans les puits matrice seule. Résultat : Aucun pic détecté.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ■ ; non applicable (à justifier) ☐	
Paramètres sensibles testés	Voir Robustesse.
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, …	Données fournisseurs (Bruker®)

Argumentaire de la conclusion : 7 souches ATCC passées en double après culture sur des milieux différents (gélose au sang, gélose cétrimide, gélose CFC, gélose TSA), à la même température d'incubation (30°C) en atmosphère aérobie et après différents temps de culture cohérents avec la pratique du laboratoire d'hygiène (24h, 48h, 72h) (n=168).

Souches ATCC

Scores Gélose au sang 18H

	Pseudomonas aeruginosa	*Sphingomonas paucimobilis*	*Stenotrophomonas maltophilia*	*Pseudomonas fluorescens*	*Pseudomonas putida*	*Pseudomonas syringae*	*Pseudomonas stutzeri*
Opérateur 1	2,4	2,32	2,37	2,38	2,53	2,12	2,22
	2,34	2,26	2,36	2,34	2,6	2,12	2,16
Opérateur 2	2,25	2,44	2,48	2,38	2,52	2,09*	2,16
	2,21	2,55	2,54	2,39	0	2,2	2,2
Opérateur 3	2,52	2,43	2,39	2,29	2,6	2,11	2,22
	2,62	2,47	2,46	2,41	2,52	1,92**	2,22
Opérateur 4	2,55	2,42	2,2	2,49	2,53	2,24	2,19
	2,43	2,41	2,27	2,46	2,57	2,25	2,18
Opérateur 5	2,42	2,44	2,38	2,41	2,61	2,2	2,27
	2,37	2,41	2,23	2,48	2,57	2,16	2,3

**savastanoi **caricapapaye*

Tests satisfaisants pour tous les milieux. Excepté l'identification de *P. syringae* sur milieu cétrimide. (culture faible sur ce milieu rendant difficile l'indentification) peu importe le délai d'incubation.

Conclusion : Pas d'influence du type de milieu de culture, ni de l'âge des cultures sur la qualité de l'indentification. L'identification d'un *P. syringae* sur milieu cétrimide nécessite l'obtention d'une culture significative. La méthode peut donc être qualifiée de robuste
Les réactifs sont utilisés en suivant les recommandations du fournisseur.

Commentaires : voir Annexe Logigramme de validation des identifications de *Pseudomonas sp.* par MALDI-TOF au CHU de Rouen

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : La méthode d'identification de germes par méthode automatisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF des *Pseudomonas sp*. est conforme à nos attentes. Autorisée par : Le Signature

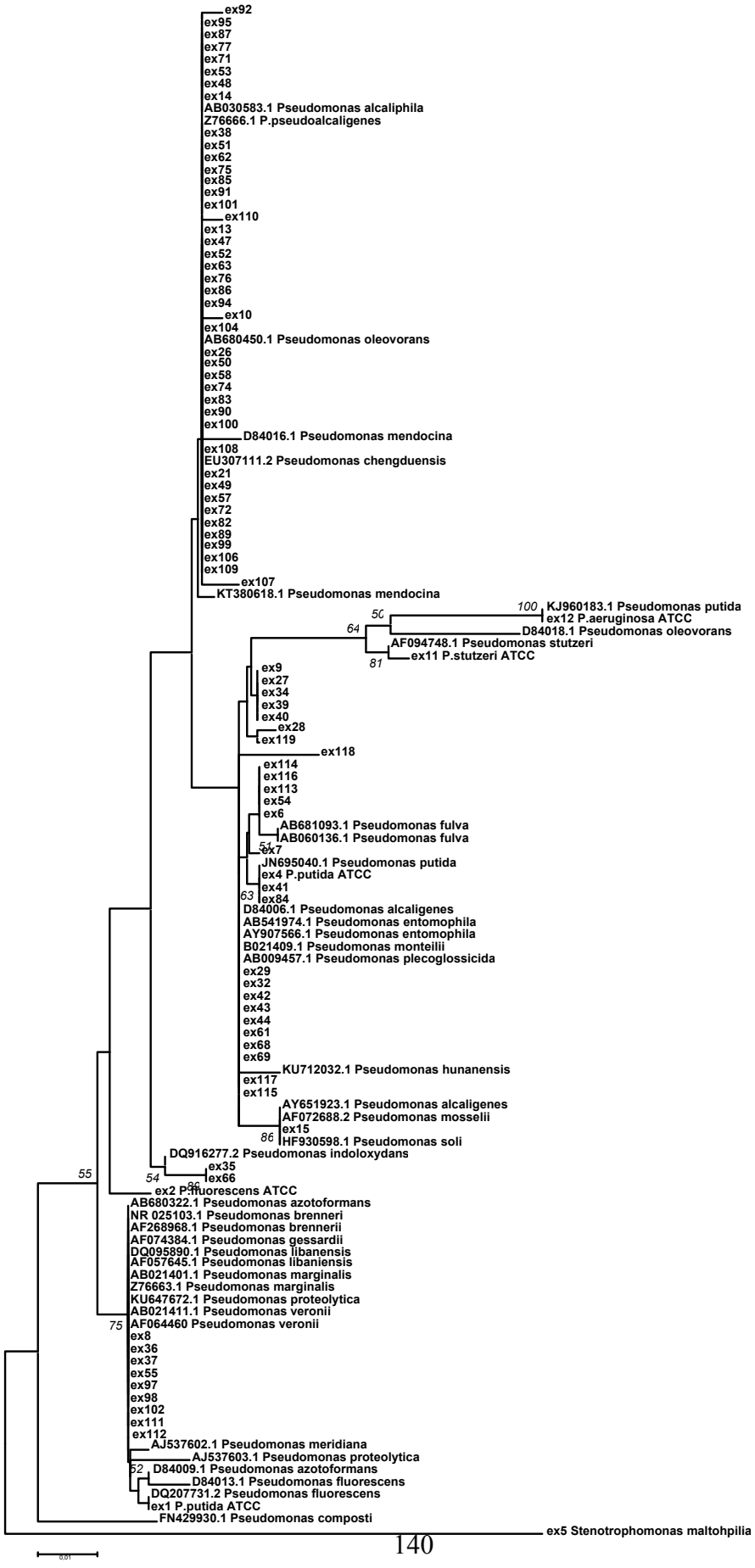
Annexe 5 : Identification des 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp. par séquençage des fragments de l'ADNr 16S et de *rpoD*

N° souche	Identification MALDI-TOF	Identification 16S BIBI	Identification 16S MLSA	Identification 16S GenBank	Identification rpoD GenBank	Identification rpoD MLSA	Identification finale
6	***P. monteilii***	*P. putida*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*/ *P. monteilii*	groupe *putida*	groupe *putida*	*Pseudomonas* sp. / groupe *putida*	**groupe *putida***
7	***P. azotoformans***	*Pseudomonas* sp.	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens*	groupe *fluorescens*	*Pseudomonas* sp. / groupe *fluorescens*	***P. migulae***
8	***P. marginalis***	*P. migulae*	*P. fluorescens*	*groupe fluorescens*	ND	ND	***P. migulae***
9	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaligenes*/ *P. putida*	*P. monteilii*/ *P. putida*/ *P. denitrificans*	*P. alcaligenes*/ *P. taiwanensis*	*P. resinovorans*	*P. resinovorans*	**groupe *aeruginosa***
10	***P. oleovorans***	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
13	***P. oleovorans***	*Pseudomonas* sp./ groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	*Pseudomonas* sp./ *P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. indoloxydans*/ *P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
14	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. indoloxydans*/ *P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
15	***P. mosselii***	*P. mosselii*/ *P. alcaligenes*	*P. putida*/ *P. monteilii*	*P. soli*/ *P. mosselii*/ *P. putida*	*Pseudomonas* sp./ *P. mosselii*	*P. entomophila*	***P. mosselii***
19	***P. oleovorans***	ND	ND	ND	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***oleovorans***
21	***P. oleovorans***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. indoloxydans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
26	***P. mendocina***	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*Pseudomonas* sp./ *mendocina*	*P. mendocina*	***P. mendocina***
27	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaligenes*/ *P. putida*	*P. denitrificans*/ *P. putida*	*P. alcaligenes*	*P. resinovorans*	*P. resinovorans*	**groupe *aeruginosa***
28	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaligenes*/ *P. nitroreducens*	*P. denitrificans*/ *P. monteilii*	*P. alcaligenes*	*P. resinovorans*	*P. resinovorans*	**groupe *aeruginosa***
29	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida*/ *P. entomophila*	*P. putida*/ *P. plecoglossicida*	*P. hunanensis*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*/ *P. monteilii*	**groupe *putida***
32	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida*/ *P. entomophila*	groupe *putida*	*P. hunanensis*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	**groupe *putida***
34	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaligenes*/ *P. putida*	*P. monteilii*/ *P. putida*	*P. alcaligenes*/ *P. taiwanensis*	*P. resinovorans*	*P. resinovorans*	**groupe *aeruginosa***
35	***P. pseudoalcaligenes***	groupe *fluorescens*	groupe *oleovorans*	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
36	***P. libanensis***	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	*Pseudomonas* sp. / *P. veronii*	*P. fluorescens*/ *P. extremaustralis*	***P. fluorescens***
37	***P. libanensis***	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens*/ *P. extremaustralis*	sp./ *P. veronii*/ *P. extremaustralis*	***P. fluorescens***
38	***P. oleovorans***	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. alcaliphila* / *P. mendocina*	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
39	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaligenes*/ *P. putida*	*Pseudomonas* sp.	*P. alcaligenes*	*P. resinovorans*	*P. resinovorans*	**groupe *aeruginosa***
40	***P. alcaligenes***	*P. alcaligenes*/ *P. putida*	*Pseudomonas* sp.	*P. alcaligenes*/ *P. taiwanensis*	*Pseudomonas* sp.	*P. resinovorans*	**groupe *aeruginosa***
41	***P. putida***	*P. putida*/ *P. taiwanensis*	*P. putida*/ *P. monteilii*	*P. entomophila*	*P. entomophila*	*Pseudomonas* sp. / groupe *putida*	**groupe *putida***
42	***P. plecoglossicida***	groupe *putida*	*P. putida*/ *P. entomophila*	*P. putida*/ *P. monteilii*	*P. plecoglossicida*/ *P. putida*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	**groupe *putida***
43	***P. plecoglossicida***	groupe *putida*	*P. putida*/ *P. entomophila*	*P. putida*/ *P. monteilii*	groupe *putida*	*Pseudomonas* sp. / groupe *putida*	**groupe *putida***
44	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida*/ *P. monteilii*	*P. taiwanensis*	*P. entomophila*	*P. entomophila*	**groupe *putida***
46	***P. monteilii***	ND	ND	ND	*P. mosselii*/ *P. soli*	*P. entomophila*/ *P. putida*	***P. soli***
47	***P. pseudoalcaligenes***	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans*/ *P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
48	***P. oleovorans***	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans*/ *P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
49	***P. oleovorans***	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. indoloxydans*/ *P. pseudoalcaligenes*/ *P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
50	***P. oleovorans***	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
51	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
52	***P. oleovorans***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
53	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
54	***P. monteilii***	*P. putida*	*P. putida*	groupe *putida*	*Pseudomonas* sp. / groupe *putida*	*Pseudomonas* sp. / groupe *putida*	**groupe *putida***
55	***P. gessardii***	groupe *fluorescens*	*P. synxantha*/ *P. fluorescens*	*P. gessardii*	*P. gessardii*/ *P. fluorescens*	*Pseudomonas* sp. / groupe *fluorescens*	***P. gessardii***
57	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
58	***P. proteolytica***	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*/ *P. brenneri*	*P. proteolytica*	*Pseudomonas* sp. / groupe *fluorescens*	***P. proteolytica***
61	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida*/ *P. entomophila*	groupe *putida*	*P. humanensis*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	**groupe *putida***
62	***P. oleovorans***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
63	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*/ *P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
66	***P. oleovorans***	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. alcaliphila*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
68	***P. putida***	groupe *putida*	*P. monteilii*/ *P. putida*	groupe *putida*	*P. entomophila*	*P. entomophila*	**groupe *putida***
69	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. monteilii*/ *P. putida*	*P. tawainensis*/ *P. monteilii*	*P. entomophila*	*P. entomophila*	**groupe *putida***
71	***P. alcaliphila***	groupe *oleovorans*	*P. alcaliphila*/ *P. mendocina*	*P. mendocina*/*P. alcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. chengduensis*	*P. alcaliphila*	**groupe *oleovorans***
72	***P. alcaliphila***	groupe *oleovorans*	*P. alcaliphila*/ *P. mendocina*	*P. mendocina*/*P. alcaligenes*	*P. oleovorans*/ *P. chengduensis*	*P. alcaliphila*	**groupe *oleovorans***

Annexe 5-bis: Identification des 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp. par séquençage des fragments de l'ADNr 16S et de *rpoD*

N° souche	Identification MALDI-TOF	Identification 16S BIBI	Identification 16S MLSA	Identification 16S GenBank	Identification rpoD GenBank	Identification rpoD MLSA	Identification finale
74	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
75	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. indoloxydans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
76	***P. oleovorans***	*Pseudomonas* sp.	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
77	***P. oleovorans***	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
82	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. chengduensis*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
83	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
84	***P. putida***	groupe *putida*	*P. fuscovaginae/ P. putida*	groupe *putida*	groupe *putida*	*P. entomophila*	**groupe *putida***
85	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. alcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
86	***P. alcaliphila***	groupe *oleovorans*	*P. alcaliphila/ P. mendocina*	groupe *oleovorans*	*P. oleovorans/ P. chengduensis*	*P. alcaliphila*	**groupe *oleovorans***
87	***P. alcaliphila***	groupe *oleovorans*	*P. alcaliphila/ P. mendocina*	groupe *oleovorans*	*P. oleovorans/ P. chengduensis*	*P. alcaliphila*	**groupe *oleovorans***
89	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
90	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
91	***P. oleovorans***	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. mendocina/ P. pseudoacaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
92	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
94	***P. pseudoalcaligenes***	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
95	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
96	***P. azotoformans***	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens/ azotoformans*	*P. fluorescens/ P. extremaustralis*	*Pseudomonas* sp. / *P. veronii/ P. extremaustralis*	***P. fluorescens***
97	***P. azotoformans***	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens/ azotoformans*	*P. fluorescens/ P. extremaustralis*	*Pseudomonas* sp. / *P. veronii*	***P. fluorescens***
98	***P. libanensis***	*veronii/ extremaustralis*	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens/ P. proteolytica*	*P. fluorescens*	*Pseudomonas* sp. / groupe *fluorescens*	***P. fluorescens***
99	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligene/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
100	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligene/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
101	***P. alcaliphila***	groupe *oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. oleovorans/ P. chengduensis*	*P. alcaliphila*	**groupe *oleovorans***
102	***P. libaniensis***	*P. veronii/ P. extremaustralis*	*P. fluorescens/ P. extremaustralis*	*P. fluorescens/ P. proteolytica*	*P. fluorescens*	*Pseudomonas* sp. / groupe *fluorescens*	***P. fluorescens***
104	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
105	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
106	***P. oleovorans***	*P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
107	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
108	***P. oleovorans***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. indoloxydans/ P. pseudoalcaligenes/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. indoloxydans***
109	***P. pseudoalcaligenes***	*P. oleovorans/ P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligene/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
110	***P. pseudoalcaligenes***	*P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes/ P. mendocina*	*P. pseudoalcaligenes*	*P. pseudoalcaligene/ P. oleovorans*	*P. pseudoalcaligenes*	***P. oleovorans***
111	***P. brenneri***	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	*P. meridiana*	*Pseudomonas* sp. / groupe *fluorescens*	***P. meridiana***
112	***P. gessardi***	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	groupe *fluorescens*	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*	***P. fluorescens***
113	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida/ P. monteilii*	*P. parafulva/ P. putida/ P. fulva*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	*Pseudomonas* sp./ groupe *putida*	**groupe *putida***
114	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida/ P. monteilii*	*P. parafulva/ P. putida/ P. fulva*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	*Pseudomonas* sp./ groupe *putida*	**groupe *putida***
115	***P. plecoglossicida***	groupe *putida*	*P. putida/ P. entomophila/ P. monteilii*	groupe *putida*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	**groupe *putida***
116	***P. monteilii***	groupe *putida*	*P. putida/ P. monteili*	*P. parafulva/ P. putida/ P. fulva*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	**groupe *putida***
117	***P. mosselii***	groupe *putida*	*P. putida/ P. entomophila/ P. monteilii*	*P. putida/ P. plecoglossicida*	*P. humanensis*	*Pseudomonas* sp./ *P. putida*	**groupe *putida***
118	***Pseudomonas* sp.**	*P. fulva/ P. xanthomarina*	groupe *putida*	*P. agarici/ P. pseudoalcaligenes*	groupe *putida*	*Pseudomonas* sp./ groupe *putida*	**groupe *putida***
119	***P. putida***	groupe *putida*	*P. putida/ P. monteili*	*P. tawainensis/ putida*	*P. entomophila*	*P. entomophila/ P. putida*	**groupe *putida***

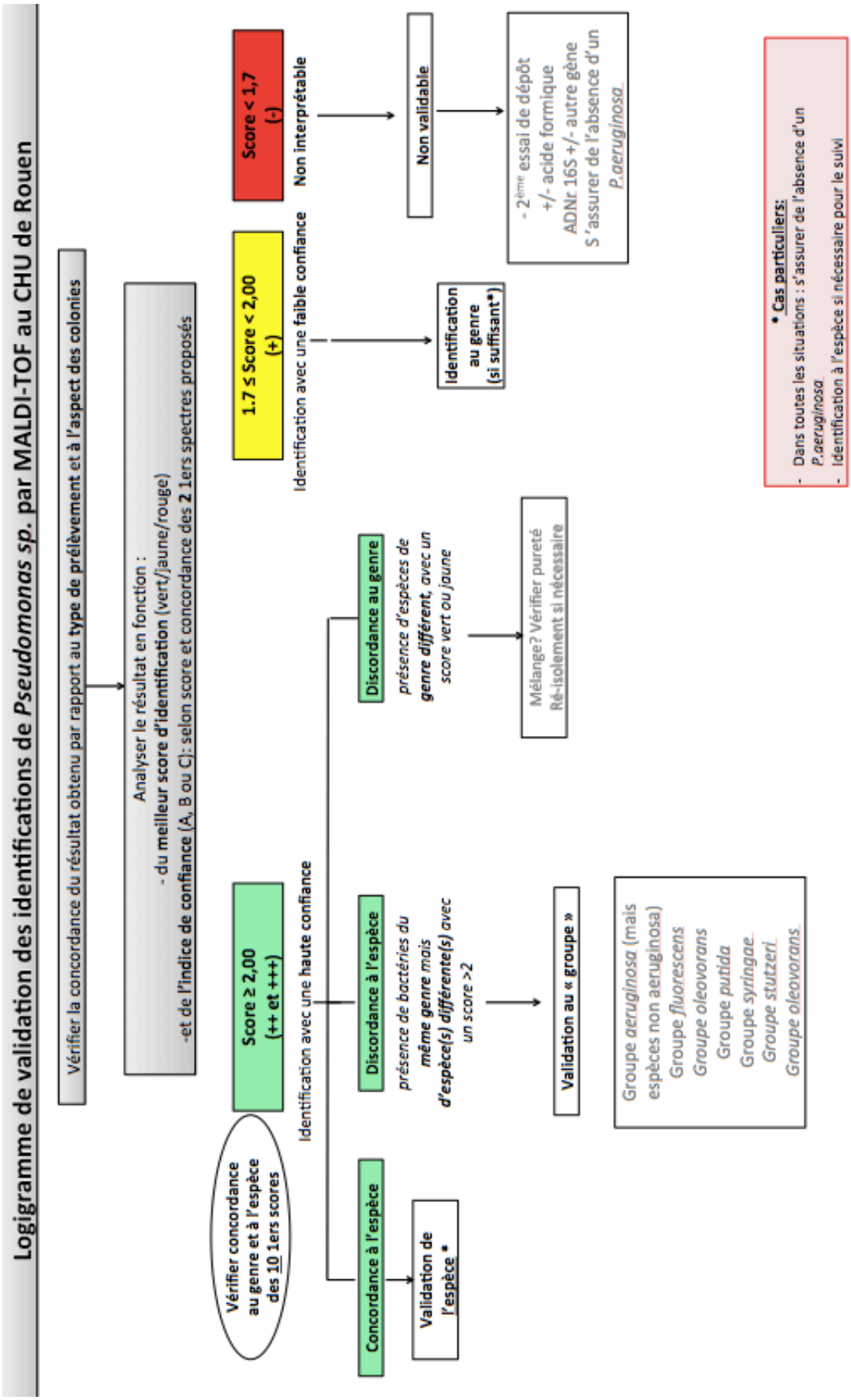
Annexe 6 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'un fragment du gène ADNr 16S pour les 81 des 85 souches étudiées et enraciné de séquences-types



Annexe 7 : Identification des 74 souches environnementales et 11 souches cliniques de *Pseudomonas* sp par technique phénotypique classique et par spectrométrie de masse MALDI-TOF

N° souche	Identification phénotypique classique	Identification MALDI-TOF	Classement	Score obtenu	N° souche	Identification phénotypique classique	Identification MALDI-TOF	Classement	Score obtenu
6	**ND**	*P. monteilii*	A++	2,22	69	***Pseudomonas* sp.**	*P. monteilii*	B+	1,86
7	**ND**	*P. azotoformans*	B+	1,9	71	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaliphila*	B++	2,21
8	**ND**	*P. marginalis*	B+	1,93	72	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaliphila*	B++	2,1
9	***P. putida***	*Pseudomonas* sp.	B+ (AF)	1,74	74	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,2
10	**ND**	*P. oleovorans*	B++	2,19	75	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,19
13	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,2	76	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,23
14	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,14	77	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,23
15	***Pseudomonas* sp.**	*P. mosselii*	A++	2,15	82	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,24
19	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,04	83	***P. stutzeri***	*P. oleovorans*	B++	2,22
21	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B+++	2,34	84	***P. putida***	*P. putida*	A++	2,02
26	**ND**	*P. mendocina*	A++	2,29	85	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B+	1,99
27	***Pseudomonas* sp.**	*Pseudomonas* sp.	C-	1,58	86	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaliphila*	B++	2,14
28	***Pseudomonas* sp.**	*Pseudomonas* sp.	C-	1,53	87	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaliphila*	B++	2,19
29	***Pseudomonas* sp.**	*P. monteilii*	B+	1,94	89	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,27
32	***P. putida***	*P. monteilii*	A++	2,06	90	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,17
34	***P. putida***	*Pseudomonas* sp.	B+	1,73	91	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,14
35	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,18	92	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,22
36	***Pseudomonas* sp.**	*P. libanensis*	B++	2,17	94	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,12
37	***Pseudomonas* sp.**	*P. libanensis*	B++	2,16	95	***P. putida***	*P. oleovorans*	B++	2,13
38	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B+++	2,3	96	***Pseudomonas* sp.**	*P. azotoformans*	B++	2,03
39	***Pseudomonas* sp.**	*Pseudomonas* sp.	B+	1,78	97	***Pseudomonas* sp.**	*P. azotoformans*	B++	2,01
40	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaligenes*	C-	1,55	98	***Pseudomonas* sp.**	*P. libanensis*	B++	2,21
41	***P. putida***	*P. putida*	A++	2,18	99	***P. stutzeri***	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,27
42	***P. putida***	*P. plecoglossicida*	A++	2,26	100	***P. stutzeri***	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,25
43	***P. putida***	*P. plecoglossicida*	A++	2,27	101	***Pseudomonas* sp.**	*P. alcaliphila*	B++	2,11
44	***P. putida***	*P. monteilii*	B+	1,95	102	***P. fluorescens***	*P. libanensis*	B++	2,18
46	***P. putida***	*P. monteilii*	B+	1,9	104	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,25
47	**ND**	*P. pseudoalcaligenes*	A++	2,073	105	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	A++	2,06
48	**ND**	*P. oleovorans*	B++	2,1	106	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,13
49	**ND**	*P. oleovorans*	B++	2,14	107	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,2
50	**ND**	*P. oleovorans*	B++	2,12	108	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,26
51	**ND**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,09	109	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++ (AF)	2,26
52	**ND**	*P. oleovorans*	B++	2,02	110	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,21
53	**ND**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,14	111	***P. fluorescens***	*P. brenneri*	B++	2,11
54	**ND**	*P. monteilii*	B++	2,15	112	***P. fluorescens***	*P. gessardi*	B++	2,1
55	***P. fluorescens***	*P. gessardii*	B+++	2,34	113	***P. putida***	*P. monteilii*	B++	2,21
57	**ND**	*P. pseudoalcaligenes*	B++	2,19	114	***P. putida***	*P. monteilii*	A++	2,29
58	**ND**	*P. proteolytica*	A+++	2,376	115	***P. putida***	*P. plecoglossicida*	A++	2,12
61	***P. putida***	*P. monteilii*	B+	1,96	116	***Pseudomonas* sp.**	*P. monteilii*	B++	2,23
62	***Pseudomonas* sp.**	*P. oleovorans*	B++	2,25	117	***P. putida***	*P. mosselii*	B+	1,71
63	***Pseudomonas* sp.**	*P. pseudoalcaligenes*	B+++	2,31	118	***Pseudomonas* sp.**	*Pseudomonas* sp.	A++	2,06
66	***P. alcaligenes***	*P. oleovorans*	B++	2,25	119	***P. putida***	*P. putida*	A++	2,02
68	***Pseudomonas* sp.**	*P. putida*	B+	1,95					

Annexe 8 : Logigramme de validation des identifications de *Pseudomonas sp.* par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Rouen



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arrêté du 14 mars 2007 relatif aux critères de qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique. www.legifrance.gouv.fr, consulté le 21 avril 2016.

2. Rapport ANSES : évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de *Pseudomonades* dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées) 2010.

3. Guide de l'eau dans les établissements de santé. Ministère de la santé et des solidarités. 2005.

4. http://microbes-edu.org, consulté le 24 août 2016

5. http://www.emlab.com consulté le 24 août 2016

6. Freney J, Renaud F, Leclercq R et Riegel P. *Bactériologie clinique.* 2ème édition, Editions ESKA, 2007.

7. Fiche technique API20NE REF 20 050. Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. 2003.

8. Varejckova S. Biochemical identification of *Pseudomonas aeruginosa* with API 20NE. http://www.microbiologyinpictures.com, consulté le 27 août 2016

9. Nocon C. Evaluation des performances du spectromètre de masse MALDI TOF Microflex LT Brucker comparées à celles du spectromètre Vitek MS Biomérieux et démarche d'accréditation. Th D Med. Lille 2. 2013.

10. Marinach-Patrice C, Pionneau C, Mazier D. (2011) Spectrométrie de masse en biologie médicale : principes et applications. *Biotribune Mag*, 40.

11. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain J-M, Raoult D. (2009) Ongoing revolution in bacteriology : routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4):543-51

12. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry : a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 26 (3) : 547-603.

13. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stingu CS, Schellenberger W, Rodloff AC, Eschrich K. (2012) A step towards the discrimination of

beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit*, 18(9) : 71-7.

14. IVD Maldi Biotyper 2.3. Manuel utilisateur. Révision 1. Septembre 2012.

15. Blondiaux N,Gaillot O, Courcol RJ. (2010) Identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : évaluation au CHU de Lille. *Pathologie Biologie*, 58 : 55-57.

16. Kliem M, Sauer S. (2012) The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol,* 15(3):397-402

17. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. (2010) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*, 44, 104-109.

18. Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. (2011) Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 49(3):887-892.

19. IV Maldi Biotyper 2.3 Manuel utilisateur Révision 1 (Septembre 2012)

20. 17. Manuel de formation simplifié MBT Compass IVD. Septembre 2015. MALDI Biotyper. Bruker.

21. Batut B. 2016. Séquençage, http://bebatut- edu.github.io/metagenomique_cm/sequencage.html, consulté le 28 août 2016.

22. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. Partie I. 4ème édition, Garland Science, 2002.

23. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 69(2) : 330-9.

24. Clarridge III J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17 (4) : 840-62.

25. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Chae GT, Cha CY, Kook YH, Kim BJ. (2005). Differenciation of Mycobacterium species by analysis of the heat shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 1649-1656.

26. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. & Garrity, G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *Volume two The Proteobacteria*, 2ème édition, Springer-Verlag, 2005.

27. LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature, http://www.bacterio.net, consulté le 22 août 2016

28. Anzai Y., Kim H., Park J-Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol,* 50, 1563-1589.

29. Scales BS, Dickson RP, LIPuma JJ, Huffnagle GB. (2014) Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, ans unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev*. 27 (4) : 927-48.

30. Palleroni N. (2010) The Pseudomonas story. *Environ Microbiol*, 12 (6) : 1377-1383.

31. Gomila M, Pena A, Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdés E. (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol.* 18 ; 6 : 214.

32. http///bacterioweb.univ-fcomte.fr, consulté le 27 août 2016

33. Mulet M, Gomila M, Lemaitre B, Lalucat J, Garcia-Valdés E. 2012. Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp.nov. *Syst. Appl. Microbiol*, 35 : 145-9.

34. Fernandez M, Porcel M, de la Torre J, Molina-Henares M.A., Daddaoua A, Llamas M.A., Roca A, Carriel V, Garzon I, Ramos J.L., Alaminos M, Duque E. (2015) Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Front Microbiol*, 6 : 871.

35. Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychotropes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét.* 151 (11) : 1003-10.

36. Ercolini, Russo F, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. (2007) Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P.lundensis* and *P.putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the carA gene. *Appl Environ Microbiol*, 73(7) : 2354-9.

37. Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. (2013) Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium *Pseudomonas alcaligenes* that causes bloodstream infection. *Genome Announc*, 1(5).

38. O'Mahony MM, Dobson AD, Barnes JD, Singleton I. (2006). The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated sol. *Chemosphere*, 63 (2): 307-14.

39. Zylstra GJ, McCombie WR, Gibson DT, Finette BA. (1988) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1 : genetic organization of the tod operon. *Appl Environ Microbiol*, 54 (6) : 1498-1503.

40. Keys TF, Melton LJ 3rd, Maker MD, Illstrup DM. (1983) A suspected hospital outbreak of pseudobacteremia due to *Pseudomonas stutzeri*. *J Infect Dis*, 147(3) :489-93.

41. Izumi S, Yamamoto M, Suzuki K, Shimizu A, Aranishi F. 2007. Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the gyrB region. *Journal of Fish Diseases*, 30 : 391-7.

42. Wang HR, Hu YH, Zhang WW, Sun L. (2009) Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. *Vaccine*, 27 (30) : 4047-55.

43. Sun Y-Y. Sun L. *Pseudomonas fluorescens*: iron-responsive proteins and their involvement in host infection. *Vet Microbiol*, 176 (3-4) : 309-20.

44. Moore E. R. B., Mua M., Arnscheidt A., Böttger E. C., Hutson R. A., Collins M. D., Van De Peer Y, De Wachter R, Timmis K.N. (1996). The determination and comparison of the 16S rDNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Syst. Appl. Microbiol*, 19 : 476–492.

45. Ramos-Gonzalez MI, Ben-Bassat A, Campos M-J, Ramos J-L. (2003) Genetic engineering of a highly solvent tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to p-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol*, 69 (9): 5120-5127.

46. Sabina L.R, Pivnick H. (1956) Oxidation of soluble oil emulsions and emuslfiers by *Pseudomonas oleovorans* and *Pseudomonas formicans*. *Appl Microbiol*, 4(4): 171-5.

47. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcia-Valdes E, Palleroni NJ. (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70 (2): 510-47.

48. Lepoivre P. *Phytopathologie.* Edition De Boeck Supérieur. 2003.

49. 21. Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3e Edition Ellipses, 2000.

50. Noble RC, Overman SB. (1994) *Pseudomonas stutzeri* infection : a review of hospital isolates a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 19 :51-56.

51. Jacquier H, Carbonnelle E, Corvec S, Illiaquer M, Le Monnier A, Bille E, Zahar J.R, Beretti J.L, Jauréguy F, Fihman V, Tankovic J, Cattoir V. (2011) Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 30 : 1579-1586.

52. Tayabali AF, Coleman G, Nguyen KC. (2015). Virulence Attributes and Host Response Assays for Determining Pathogenic Potential of *Pseudomonas* Strains Used in Biotechnology. *PloS One*, 10 (11) :e0143604. doi: 10.1371/journal.pone.0143604

53. Biaggini K, Barbey C, Borrel V, Feuilloley M, Déchelotte P, Connil N. (2015). The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. *Arch Microbiol*, 197(8) : 983-90.
54. O'Toole GA, Kolter R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways : a genetic analysis. *Mol Microbiol,* 28 : 449-61.
55. Leneveu-Jenvrin C, Madi A, Bouffartigues E, Biaggini K, Feuilloley M, Chevalier S, Connil N. 2013. Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. *BMC Microbiol*, 13 (123).
56. Govan J.R.W, Fyfe J.A.M, Jarman T.R. (1981). Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. *J Gen Microbiol,* 125 :217-20.
57. Wong V, Levi K, Baddal B, Turton J, Boswell TC. (2011) Spread of *Pseudomonas fluorescens* due to contaminated drinking water in a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*, 49 (6) : 2093-2096.
58. Taber TE, Hegeman TF, York SM, Kinney RA, Webbb DH. (1991) Treatment of *Pseudomonas* infections in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*, 11(3) : 213-216.
59. Hsueh P-R, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Sun CC, Ho SW, Luh KT. (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J Clin Microbiol*, 36 (10): 2914-7.
60. Benito N, Mirelis B, Luz Galvez M, Vila M, Lopez-Contreras J, Cotura A, Pomar V, March F, Navarro F, Coll P, Gurgui M. Outbrek of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection in a coronary care unit. 2012. *J Hosp Infect*, 82 : 286-9.
61. Lindholm DA, Murray CK, Akers KS, O'Brien SD, Alderete JF, Vento TJ. (2013). Novel *Pseudomonas fluorescens* septic sacroiliitis in a healthy soldier. *Mil Med*, 178 (8).
62. Bennett JW, Herrera ML, Lewis JS 2nd, Wickes BW, Jorgensen JH. (2009) KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(1) : 292-4.
63. Aumeran C, Paillard C, Robin F, Kanold J, Baud O, Bonnet R, Souweine B, Traore O. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology paediatric unit. J *Hosp Infect,* 65(1): 47-53.
64. Zuberbuhler B, Carifi G. (2012). *Pseudomonas putida* infection of the conjunctiva. *Infection*. 40(5):579-80.

65. Mert A. Yilmaz M, Ozaras R, Kocak F, Dagsali S. (2007) Native valve endocarditis due to *Pseudomonas mendocina* in a patient with mental retardation and a review of literature. *Scand J Infect Dis*, 39 : 615-649.
66. Suel P, Martin P, Berthelot G, Robaday S, Etienne M, Chibani A. (2011) Une endocardite à *Pseudomonas mendocina*. *Médecine et maladies infectieuses*, 41 : 109-110.
67. Chi C-Y, Lai CH, Fung CP, Wang JH. (2005) *Pseudomonas mendocina* spondylodiscitis : a case report and litterature review. *Scand J Infect Dis*. 37 (11-12) : 950-3.
68. Nseir W et al. (2011) *Pseudomonas mendocina* sepsis in a healthy man. IMAJ. 13 : 375-376.
69. Clark LL, Dajcs JJ, McLean CH, Bartell JG, Stroman DW. (2006). *Pseudomonas otitidis* sp. nov. isolated from patients with otic infections. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56 : 709-14.
70. McLellan E, Partridge D. (2009) Prosthetic valve endocarditis caused by *Pseudomonas mosselii*. *J Med Microbiol*. 58 : 114-5.
71. Scotta C, Mulet M, Sanchez D, Gomila M, Ramirez A, Bennasar A, Garcia-Valdes E, Holmes B, Lalucat J. (2012). Identification and genomovar assignation of clinical strains of *Pseudomonas stutzeri*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31 : 2133-9.
72. Sader HS, Jones RN. (2005). Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 25(2) : 95-109.
73. Reisler RB, Blumberg H. (1999) Community-acquired *Pseudomonas stutzeri* vertebral osteomyelitis in a previously healthy patient : case report and review. *Clin Infect Dis*, 29 (3):667-9.
74. Boland BS, Dulai PS, Chang M, Sandborn WJ, Levesque BG. (2015). *Pseudomonas meningitis* during vedolizumab therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol,* 110 : 1631-2.
75. Gautam L, Ramanpreet K, Kumar S, Bansal A, Gautanm V, Singh M and Ray P. (2015) *Pseudomonas oleovorans* sepsis in a child : the first reported case in India. *Jpn J Infect Dis,* 68 : 254-255.
76. Hage JE, Schoch PE, Cunha BA. (2013). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* peritoneal dialysis-associated peritonitis. *Perit Dial Int*, 33(2) :223-4.
77. Endimiani A, Luzzaro F, Tamborini A, Lombardi G, Elia V, Belloni R, Toniolo A. (2002) Identification and antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of non-

fermenting gram negative bacteria by the Phoenix Automated Microbiology System. *New microbial*, 25(3): 323-9.

78. Fiche technique Oxydase regeant : détection de l'enzyme cytochrome oxydase. Ref 55635. bioMérieux®.

79. Jin W-Y, Jang S-J, Lee M-J, Park G, Kim M-J, Kook J-K, Kim D-M, Moon D-S, Park Y-J. (2011) Evaluation of vitek2, Microscan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 70 (4) : 442-7.

80. Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Böddinghaus B, Altwegg M, Böttger EC. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 44 (4) : 1359-66.

81. Almuzara M, Barberis C, Traglia G, Famiglietti A, Ramirez MS, Vay C. (2015) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for species identification of Nonfermenting Gram-negative bacilli. *J Microbiol Methods*. 112 : 24-27.

82. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, Howard W, Pruessner J, Safwat N, Cockerill FR, Bossler AD, Patel R, Richter SS. (2012) Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry Systems for Identification Of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cultures from Cystic Fibrosis Patients. J *Clin Microbiol*. 50 (6): 2034-2039.

83. Fernandez-Olmos A, Garcia-Castillo M, Morosini MI, Lamas A, Maiz L, Canton R. (2012) MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 11(1): 59-62..

84. Widmer F, Seidler R, Gillevet P, Watrud L, and Di Giovanni G. (1998) A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 64 : 2545-53.

85. Bodilis J., Hedde M., Orange N., Barray S. (2006) *Opr*F polymorphism as a marker of ecological niche in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*, 8 (9), 1544-1551.

86. Freulet-Marrière MA, El Hamel C, Chevalier S, Dé E, Molle G, Orange N. (2000) Evidence for association of lipopolysaccharide with *Pseudomonas fluorescens* strain MF0 porin OprF. *Res Microbiol*, 151 (10) : 873-6.

87. Bodilis J., Calbrix R., Guérillon J., Mérieau A., Pawlak B., Orange N., Barray S. (2004) Phylogénétic relationships between environmental and clinical isolates of

Pseudomonas fluorescens and related species deduced from 16rRNA gene and *oprF* protein sequences. *System Appl Microbiol,* 27, 93-108.
88. Bodilis J., Nsigue Meilo S., Cornelis P., De vos P., Barray S. (2011) A long-branch attraction artifact reveals an adaptive radiation in *Pseudomonas*. *Mol. Biol. Evol*, 28 (10), 2723-2726.
89. Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, García-Valdés E. (2009) An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol Cell Probes*, 23(3-4), 140-147.
90. (http://microbiologia.uib.es/bioinformatica/Welcome.html, dernière consultation le 6 août 2016.)
91. Sanchez D, Matthijs S, Gomila M, Tricot C, Mulet M, García-Valdés E, Lalucat J. (2014) *rpoD* gene pyrosequencing for the assessment of Pseudomonas diversity in a water sample from the Woluwe river. *Appl Environ Microbiol,* 80(15) : 4738-44.
92. Ribeiro AF, Bodilis J, Alonso L, Buquet S, Feuilloley M, Dupont J-P, Pawlak B. (2014) Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *Sci Total Environ,* 490, 370-378.
93. Ait Tayeb L, Ageron E, Grimont F, Grimont PA. (2005) Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol*, 156 : 763-73.
94. De Vos D, Lim A Jr, De Vos P, Sarniguet A, Kersters K, Cornelis P. (1993) Detection of the outer-membrane lipoprotein I and its gene in fluorescent and non-fluorescent pseudomonads : implications for taxonomy and diagnosis. *J Gen Microbiol*, 139 : 2215-23.
95. De Vos D, Bouton C, Sarniguet A, De Vos P, Vauterin M, Cornelis P. (1998) Sequence diversity of the oprI gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I *Pseudomonas*. *J Bacteriol*, 180 : 6551-6.
96. Yamamoto S. and Harayama S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol*, 61 : 1104-9.
97. Chevalier S, Bodilis J, Jaouen T, Barray S, Feuilloley M, Orange N. (2007) Sequence diversity of the oprD protein of environmental *Pseudomonas* strains. *Environ Microbiol*, 9 (3): 824-35.
98. Bizzini A, Greub G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*, 16 (11) : 1614-9.

99. Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigner U, Fahr AM, He Y, Ilina EN, Krostrzewa M, Maier T, Mancinelli L, Moussaoui W, Prévost G, Putignani L, seachord CL, Tang YW, Harmsen D. (2009) High interlaboratory reproductibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*. 47 (11) : 3732-3734.

100. http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi/cgi, dernière consultation le 6 août 2016.

101. Devulder G, Perrière G, Baty F, Flandrois JP. (2003) BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. J Clin Microbiol, 41 (4) : 1785-7.

102. Yamamoto S and Harayama S. (1998) Phylogenetic relaitonships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol*. 48 : 813-9.

103. Vaz-Moreira, Nunes OC, Manaia CM. (2012) Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci Total Environ*. 426 : 366-74.

104. Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W, Tarasewicz K, Fudala-Ksiazek S. (2015) Antimicrobial resistance of Pseudomonas spp. Isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22 (24) : 19823-34.

105. Angeletti S, Ceccarelli G, Vita S, Dicuonzo G, Lopalco M, Dedj E, Blasi A, Antonelli F, Conti A, De Cesaris M, Farchi F, Lo Presto A, Ciccozi M. (2016) Unusual microorganisms and antimicrobial resistances in a group of Syrian migrants : Sentinel surveillance data from an asylum seekers centre in Italy. *Travel Med Infect Dis*, 14 (2) : 115-22.

106. Borgianni L, De Luca F, Thaller MC, Chong Y, Rossolini GM, Docquier JD. (2015) Biochemical characterization of the POM-1 Metallo-betéa-lactamase from *Pseudomonas otitidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59 : 1755-1758.

107. Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. (2013) A subclass B3 metallo-beta-lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. *J Antimicrob Chemother*, 69 (5) : 1430-2.

108. Docquier J-D, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM. (2003) IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 47 : 1522-1528.

109. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. (2002) Nosocomial infections caused by multidrug-resistant

isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol*, 40 (11): 4051-4055.

110. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. (1996) PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad spectrum beta-lactam. *J Clin Microbiol*, 34 : 2909-2913.

111. Juan C., Zamorano L., Mena A., Albertí S., Pérez JL., Oliver A. (2010) Metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemother*, 65, 474-478.)

112. Horii T, Muramatsu H, Iinuma Y. et *al*. (2005) Mechanisms of resistance to fluoroquinolones and carbapenems in *Pseudomonas putida. J Antimicrob Chemother*. 56 (4) 643-7.

113. Viedma E, Estepa V, Juan C, Castillo-Vera J, Rojo-Bezares B, Seral C, Castillo FJ, Saenz Y, Torres C, Chaves F, Oliver A. (2014) Comparison of local features from two Spanish hospitals reveals common and specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas spp*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58 (8) : 4992.

114. Almuzara M, Radice M, de Garate N, Kossman A, Cuirolo A, Santella G, Famiglietti A, Gutkind G, Vay V. (2007) VIM-2 producing *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. *Emerg Infect Dis.* 13 (4) : 668-9.

115. Bogaerts P, Bouchahrouf W, Lissoir B, Denis O, Glupczynski Y. (2011) IMP-13-producing *Pseudomonas monteilii* recovered in a hospital environment. *J Antimicrob Chemother*. 66 : 2434-2440.

116. Bennett JW, Herrera ML, Lewis JS 2nd, Wickes BW, Jorgensen JH. (2009) KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 53 (1) : 292-4.

117. Poole K. (2001) Multidrug efflux pumps and antimirobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.,* 3(2) : 255-264)

118. Fukumori F, Hirayama H, Takami H, Inoue A, Horikoshi K.. (1998) Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles*, 2(4):395-400

119. Chantefort A, Druilles J, Huet M. 1990. Résistance de certains *Pseudomonas* aux antiseptiques et désinfectants. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 20 : 234-40.

120. *Laboratory Biosafety Manual, Part IV Good Microbiological Techniques* (2004). (Third Edition ed.). Geneva : World Health Organization.

121. Nagai K, Murata T, Ohta S, Zenda H, Ohnishi M, Hayashi T. (2003) Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Microbiol Immunol*, 47 (10) 709-15.

122. Mahzounieh M, Khoshnood S, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoubian M. (2014). Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. Isolated from burn patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 9 (2).

123. Norme internationale NF EN ISO 15189. (2012)

124. COFRAC. SH GTA 04. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 01. (2015)

125. COFRAC. SH REF 08. Expression et évaluation des portées d'accréditation. Révision 03.

126. Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD. (1998) A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol,* 64(7) : 2545-53.

127. Société française de microbiologie. QUAMIC Comité qualité de la société française de microbiologie. 2014.

128. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch, dernière consultation le 7 septembre 2016.

129. Bennasar A, Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdés E. (2010) PseudoMLSA : a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiology.* 10 : 118.

130. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2016.
http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016_V1_0_FEV.pdf, consulté le 25 avril 2016)

131. Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cvallo J-D, Jeannot K. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 435 : 49-62.

132. DSMZ (http://www.dsmz.de/), dernière consultation le 03 septembre 2016

133. Saha R, Spröer C, Beck B, Bagley S. (2010) *Pseudomonas oleovorans* subsp. *lubricantis* nov., and reclassification of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ATCC 17440 as later synonym of *Pseudomonas oleovorans* ATCC 8062. *Curr Microbiol*, 60 : 294-300.

UNIVERSITÉ DE ROUEN

UNIVERSITE de ROUEN
Faculté de Médecine et de Pharmacie

SERMENT DE GALIEN

Je jure 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.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

TOURNUS Céline

Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques

Th. D. Pharm., Rouen, 2016, 155 p.

RESUME

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont décrites selon les espèces comme des dépolluants, pathogènes des végétaux, poissons, insectes, et humains potentiellement, mais aussi des contaminants des denrées alimentaires et des eaux hospitalières, voire comme des réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques. L'identification au rang d'espèce des *Pseudomonas* sp. constitue donc un défi pour le laboratoire d'hygiène hospitalière.

Nous avons procédé à la validation de méthode en portée B flexible de l'identification bactérienne des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF (Bruker®) en utilisant comme méthode de référence l'identification moléculaire par séquençage des fragments de l'ADNr16S et *rpoD* à partir d'une collection de souches environnementales et cliniques.

Le séquençage de l'ADNr 16S et de *rpo* a permis dans 65% des cas l'identification des souches au rang de l'espèce.

Les essais de robustesse de la SM n'ont pas montré d'influence du type de milieu de culture (géloses au sang, gélose cétrimide, CFC et TSA) ni de l'âge des cultures sur la qualité de l'identification. La comparaison de méthodes a permis de mettre en évidence une bonne corrélation de l'identification au rang du genre (100%), du groupe d'espèces (100%) mais des résultats non satisfaisants de corrélation au rang de l'espèce (27,3%) pour les groupes *putida*, *aeruginosa* et *fluorescens*.

Les souches cliniques étaient plus fréquemment résistantes aux antibiotiques que les souches environnementales, et des différences entre les groupes d'espèces ont été observées. Les souches environnementales appartenaient principalement au groupe *oleovorans* (espèces *oleovorans* et *indoloxydans*) tandis que les groupes *putida* et *fluorescens* étaient les plus représentés parmi les souches cliniques.

L'identification des *Pseudomonas* sp. au rang de l'espèce reste difficile du fait de leur évolution taxonomique, la proximité phylogénétique entre les espèces et la faiblesse des bases de données existantes mais la spectrométrie de masse permet de les identifier en routine au rang de groupe d'espèces.

MOTS CLES : *Pseudomonas* sp. – MALDI-TOF – Validation de méthode – Séquençage – Résistance aux antibiotiques –

JURY

Président : Mme PESTEL-CARON Martine, PU-PH Pharmacie

Membres : M. LEMEE Ludovic, Docteur en Pharmacie
Mme MERLE Véronique, PU-PH Médecine
Mme NOUVELLON Michèle, Docteur en Pharmacie
Mme ROCHON-EDOUARD Stéphanie, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE : 27 septembre 2016