



HAL
open science

Épidémiologie des infections à *Haemophilus influenzae* de 2014 à 2019 à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

Marc Monegat

► **To cite this version:**

Marc Monegat. Épidémiologie des infections à *Haemophilus influenzae* de 2014 à 2019 à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02961330

HAL Id: dumas-02961330

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02961330>

Submitted on 8 Oct 2020

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.

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du D.E.S. de Biologie Médicale

Soutenue le 25 Septembre 2020

Par M. MONEGAT Marc

Né le 06/10/1994

À Vénissieux

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS
A *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* DE 2014 A 2019
A L'ASSISTANCE PUBLIQUE
DES HOPITAUX DE MARSEILLE**

----oOo----

JURY :

Président : M. le Professeur Jean-Marc ROLAIN

Membres : M. le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER

M. le Docteur Grégory DUBOURG (Directeur de thèse)

Mme le Docteur Sophie BARON

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du D.E.S. de Biologie Médicale

Soutenue le 25 Septembre 2020

Par M. MONEGAT Marc
Né le 06/10/1994
À Vénissieux

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS
A *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* DE 2014 A 2019
A L'ASSISTANCE PUBLIQUE
DES HOPITAUX DE MARSEILLE**

----oOo----

JURY :

Président : M. le Professeur Jean-Marc ROLAIN

Membres : M. le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER

M. le Docteur Grégory DUBOURG (Directeur de thèse)

Mme le Docteur Sophie BARON

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

| | |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Doyen :</i> | Mme Françoise DIGNAT-GEORGE |
| <i>Vice-Doyens :</i> | M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT |
| <i>Chargés de Mission :</i> | Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI |
| <i>Conseiller du Doyen :</i> | M. Patrice VANELLE |
| <i>Doyens honoraires :</i> | M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE |
| <i>Professeurs émérites :</i> | M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL |
| <i>Professeurs honoraires :</i> | M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI |
| <i>Chef des Services Administratifs :</i> | Mme Florence GAUREL |
| <i>Chef de Cabinet :</i> | Mme Aurélie BELENGUER |
| <i>Responsable de la Scolarité :</i> | Mme Nathalie BESNARD |

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| BIOPHYSIQUE | M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC |
| GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE | M. Christophe DUBOIS |
| PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE | M. Philippe PICCERELLE |

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE | Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN |
| HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE | Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE |
| MICROBIOLOGIE | Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE |
| PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE | Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN |
| BIOLOGIE CELLULAIRE | Mme Anne-Catherine LOUHMEAU |

A.H.U.

| | |
|----------------------------|------------------|
| HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE | M. Maxime LOYENS |
|----------------------------|------------------|

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION | Mme Catherine BADENS |
| CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | M. Philippe GALLICE |
| CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE - CHIMIE THERAPEUTIQUE | M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET |
| CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE | M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME |
| PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE | Mme Evelyne OLLIVIER |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE | Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT |
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION | Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS |
| CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON |
| CHIMIE THERAPEUTIQUE | Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE |
| CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE | M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON |
| PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE | M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN |

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION | Mme Anne-Marie PENET-LOREC |
| CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | M. Cyril PUJOL |
| DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE | M. Marc LAMBERT |
| GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC | Mme Félicia FERRERA |

A.H.U.

| | |
|----------------------------------------------|-------------------|
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION | M. Mathieu CERINO |
|----------------------------------------------|-------------------|

ATER

| | |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| CHIMIE ANALYTIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE | M. Charles DESMACHELIER Mme Fanny MATHIAS |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------|

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| PHARMACIE CLINIQUE | Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ |
| PHARMACODYNAMIE | M. Benjamin GUILLET |
| TOXICOLOGIE GENERALE | M. Bruno LACARELLE |
| TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT | Mme Frédérique GRIMALDI |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| PHARMACODYNAMIE | M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE |
| PHYSIOLOGIE | Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL |
| TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE | M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA |
| TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE | M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE |

A.H.U.

| | |
|--------------------|---------------------|
| PHARMACIE CLINIQUE | M. Florian CORREARD |
| PHARMACOCINETIQUE | Mme Nadège NEANT |

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements

*A Monsieur le Professeur Jean-Marc Rolain,
Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon profond respect.*

*A Monsieur le Docteur Grégory Dubourg,
Pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Tes compétences et ton efficacité m'inspirent le plus grand respect. Travailler avec toi était aussi agréable qu'enrichissant, je n'oublierai pas ta gentillesse au quotidien et tes conseils précieux qui m'ont guidé tout au long de ce travail.*

*A Monsieur le Professeur Pierre-Edouard Fournier,
Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de rejoindre ce jury. Je vous en suis très reconnaissant.*

*A Madame le Docteur Sophie Baron,
Je suis ravi que tu aies accepté de juger ce travail. Je te remercie aussi pour ton accueil au sein du laboratoire de bactériologie. Merci d'avoir accepté de siéger à ce jury.*

*A Madame l'ingénieur de biologie moléculaire de bactériologie Elsa Prudent,
Ton aide dans la réalisation des PCR, tes conseils et ton expertise ont été indispensables pour réaliser ce travail. Merci pour tout le travail accompli, pour ta gentillesse et ta patience lors de mes manipulations.*

Et bien sûr...

*A Emma,
Merci pour tout l'amour que tu me donnes chaque jour et pour tout le soutien que tu m'apportes depuis ces 6 années passées à tes côtés. C'est grâce à toi que j'ai pu en arriver là, merci pour tout. Mon amour pour toi est inconditionnel.*

*A ma famille,
Mon père, ma mère et ma sœur qui me soutiennent depuis toujours. Grace à eux j'ai appris la valeur du travail. Merci de m'avoir supporté tout au long de mes études.
A mes grands-parents qui ne pourront pas être présents le jour J mais à qui je pense chaque jour et que j'aime tant.*

*A Antoine,
On se connaît depuis maintenant 8 ans et rien n'a changé. Merci de m'avoir soutenu durant ces longues études de pharmacie. A toutes ces vacances, soirées, projets qu'on a vécu ensemble. Pas de doute sur tous les bons moments qu'il nous reste à partager.*

*A Pierro,
Un ami sur lequel je peux compter à chaque moment. Une belle rencontre de faite lors de ces années pharma durant lesquelles on a bien profité de la vie.*

A Pauline,

Mon amie, binôme depuis la faculté et que je vois avec toujours autant de plaisir. Je n'oublierai jamais les vacances, les soirées, les journées passées à bosser à la BU et bien sur les TP. Je suis certain que nous aurons encore bien d'autres moments à fêter après cette thèse.

A tous mes collègues de la faculté de pharmacie,

Mes amis avec qui j'ai passé tant de bons moments et qui m'ont tellement apporté durant toutes mes années de fac et celles qui ont suivies.

Aux fils,

Merci pour toutes ces esbroufes. Merci de m'avoir accueilli lors d'un détour Madrilain notamment au mercado. Merci à Arthurito pour toutes ces vagues impressionnantes peu importe le lieu où le moment. Merci à El sangcho pour son 2% à l'AG de Paris. Merci à Yugnat dit el marsouin pour ses regards du diable et sa joie de vivre.

A Bantchi,

Une des premières rencontres durant cet internat et un réel plaisir de t'avoir rencontré. On se souviendra toujours du ski entre internes, c'était la belle vie. Sans oublier les petits repas de l'internat au bord de la piscine. Tu es une vraie amie sur qui je peux compter.

A Célio,

Un vrai poto, une voisine, malgré la trahison montpelliéraine, tu nous manques sur Marseille. Reviens plus souvent frère.

A mes co-internes Marseillais et Lyonnais,

Je n'oublierai jamais tous ces moments passés en stage avec vous ainsi que toutes ces soirées interminables au Glam.

Merci à Philippe Lavrard, mon co-interne clinicien,

Pour ton expertise clinique qui m'a été d'une très grande aide pour l'étude des dossiers patients, mais aussi pour tous ces bons moments passés au labo. Tes conseils m'ont énormément apportés pour rédiger cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de relire ce rapport. Je te souhaite beaucoup de réussite tant sur le plan professionnel que personnel.

Merci à tous mes co-internes de l'IHU présents à ce choix,

Toujours souriants malgré tous ces moments de galère de tente covid19.

Encore merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| LISTE DES TABLEAUX | 6 |
| LISTE DES FIGURES..... | 6 |
| ABREVIATIONS | 7 |
| 1. PARTIE 1 : REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE | 2 |
| 1.1. <i>Haemophilus influenzae</i> | 2 |
| 1.1.1. Caractéristiques principales | 2 |
| 1.1.2. Atteintes cliniques..... | 4 |
| 1.1.3. Mécanismes physiopathologiques & facteurs de virulence | 5 |
| 1.1.4. Méthodes diagnostiques..... | 8 |
| 1.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques | 19 |
| 1.2.1. Généralités | 19 |
| 1.2.2. Résistances et dépistage..... | 20 |
| 1.2.3. Mécanismes de résistance | 21 |
| 1.2.4. Répartition mondiale de la résistance | 23 |
| 1.2.5. Répartition en France..... | 24 |
| 1.3. Épidémiologie - vaccination et évolution de l'incidence | 26 |
| 1.3.1. Généralités | 27 |
| 1.3.2. Schéma vaccinal | 27 |
| 1.3.3. Vaccin et phénotypes..... | 28 |
| 1.3.4. Vers un vaccin anti-NTHi ? | 29 |
| 2. PARTIE 2 : L'ETUDE..... | 30 |
| 2.1. Matériel et méthodes | 30 |
| 2.2. Résultats | 34 |
| 2.3. Discussion..... | 48 |
| CONCLUSION | 51 |
| BIBLIOGRAPHIE | 52 |
| ANNEXES | 63 |

Liste des tableaux

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1. Caractères principaux d'identification des espèces humaines d' <i>Haemophilus</i> | 2 |
| Tableau 2. Sensibilité, spécificité et aire sous la courbe ROC des gènes utilisés afin de détecter les NTHi..... | 13 |
| Tableau 3. Caractéristiques des biotypes d' <i>Haemophilus influenzae</i> | 13 |
| Tableau 4. Dépistage de la résistance aux β -lactamines chez <i>Hinf</i> | 20 |
| Tableau 5. Recommandations du calendrier vaccinal chez les enfants de moins de 18 ans | 28 |
| Tableau 6. Répartition du nombre de cas par genre et par classe d'âge..... | 35 |

Liste des figures

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Arbre phylogénétique montrant les relations des séquences du gène <i>sodA</i> des 13 espèces d' <i>Haemophilus</i> et des souches types des principaux genres <i>Pasteurellaceae</i> | 3 |
| Figure 2. Examen direct d'un liquide céphalorachidien de méningite à <i>Haemophilus influenzae</i> - Coloration de Gram x1000 | 10 |
| Figure 3. Colonies d' <i>Haemophilus influenzae</i> sur gélose chocolat (PVX)..... | 11 |
| Figure 4. Schéma expliquant les étapes de validation de la database du MALDI | 15 |
| Figure 5. Répartition des mécanismes de résistance dans le monde | 24 |
| Figure 6. Cartes et graphiques de l'évolution des différents sérotypes par pays | 26 |
| Figure 7. Flowchart de sélection des patients de notre étude..... | 31 |
| Figure 8. Courbe du nombre de prélèvements positifs à <i>Hinf</i> rapporté au nombre de prélèvements positifs au laboratoire en fonction du temps..... | 35 |
| Figure 9. Histogramme du nombre de cas en fonction des années | 36 |
| Figure 10. Histogramme du nombre d'infections à <i>Hinf</i> en fonction des classes d'âge et du temps..... | 37 |
| Figure 11. Histogramme de la répartition du nombre de cas d'infections à <i>Hinf</i> en fonction du type d'atteinte | 37 |
| Figure 12. Histogramme du nombre d'infections invasives à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge.. | 38 |
| Figure 13. Histogramme du nombre de pneumopathies à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge..... | 38 |
| Figure 14. Histogramme du nombre de bactériémies à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge..... | 39 |
| Figure 15. Histogramme du nombre de méningites à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge | 39 |
| Figure 16. Histogramme du nombre d'infections non invasives à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge..... | 40 |
| Figure 17. Histogramme du nombre d'otites à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge..... | 40 |
| Figure 18. Histogramme du nombre de sinusites à <i>Hinf</i> en fonction de la classe d'âge | 41 |
| Figure 19. Histogramme du nombre de cas en fonction des portes d'entrée | 41 |
| Figure 20. Histogramme de la répartition du nombre de décès et de survie en fonction du type d'affection..... | 42 |
| Figure 21. Histogramme de la répartition du nombre de décès en fonction des classes d'âge | 42 |
| Figure 22. Histogramme de la répartition du nombre de décès en fonction des classes d'âge et des pathologies | 43 |
| Figure 23. Histogrammes du nombre d'infections à <i>Hinf</i> en fonction des mois de l'année | 45 |
| Figure 24. Histogramme de la répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines en fonction des années..... | 46 |

Abréviations

| | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| ADN : | Acide DésoxyriboNucléique |
| AP-HM : | Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille |
| ARN : | Acide RiboNucléique |
| BPCO : | BronchoPneumopathie Chronique Obstructive |
| BLAST: | <i>Basic Local Aligement Search Tool</i> |
| BLNAR : | <i>β-Lactamase Négative Ampicillin Resistant</i> |
| BLPACR : | <i>β-Lactamase Positive Amoxicillin Clavulanate Resistant</i> |
| BLPAR : | <i>β-Lactamase Positive Ampicillin Resistant</i> |
| CMI : | Concentration Minimale Inhibitrice |
| CNR : | Centre National de Référence |
| dNTPs : | désoxyriboNucléoside TriphosPate |
| ELISA : | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| Hib : | <i>Haemophilus influenzae</i> du sérotype b |
| Hinf : | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| IgA1 : | Immunoglobuline d'isotype A et de sous-classe 1 |
| IHU : | Institut Hospitalo-Universitaire |
| IOA : | Infection Ostéo-Articulaire |
| LCR : | Liquide Céphalo-Rachidien |
| LBA : | Lavage Broncho-Alvéolaire |
| LOS : | Lipooligosaccharides |
| MH-F : | Mueller Hinton <i>Fastidious</i> |
| MLST : | <i>Multi Locus Sequence Typing</i> |
| NAD : | Nicotinamide Adénine Dinucléotide |
| NADP : | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate |
| NTHi : | Non typable <i>Haemophilus influenzae</i> |
| OMA : | Otite Moyenne Aigüe |
| PCR : | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PLP3, PBP3 : | Protéine liant les Pénicillines de type 3, type 3 <i>Penicillin Binding Protein</i> |
| PRP : | PolyribosylRibitolPhosphate |
| PVX : | Polyvitex [®] |
| SAST : | <i>Side Agglutination Serotyping</i> |
| SM : | Spectrométrie de Masse |
| U.E. : | Union. Européenne. |
| UFC : | Unité Formant Colonie |
| WGS : | <i>Whole Genome Sequencing</i> |

Introduction

Haemophilus influenzae de sérotype b (*Hib*) a longtemps été le sérogroupe majoritairement responsable d'infections invasives (méningites, bactériémies, pneumonies, infections ostéo-articulaires (IOA)) et non invasives (otites, sinusites).

Dès 1989, avec l'apparition de la vaccination anti-*Hib*, l'épidémiologie au sein de l'espèce a profondément changé. On remarque une disparition presque totale du portage pharyngé et des infections invasives à *Hib* (1).

Depuis cette ère vaccinale, les *Haemophilus influenzae* non typables (NTHi) sont devenus les phénotypes prédominants en pathologie humaine. Des études montrent la pathogénicité de souches non encapsulées en cause dans des infections sévères telles que les pneumonies.

Peu d'informations récentes sont disponibles sur l'épidémiologie et la microbiologie de *Haemophilus influenzae* (*Hinf*) post-vaccinale par les vaccins conjugués anti-*Hib*. En conséquence, nous avons décidé de nous intéresser à l'épidémiologie de ce pathogène, notamment du sérogroupe b, à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM).

1. Partie 1 : Revue générale de la littérature

1.1. *Haemophilus influenzae*

1.1.1. Caractéristiques principales

Haemophilus influenzae, de son premier nom Bacille de Pfeiffer a été découvert par Richard Pfeiffer en 1892. C'est une bactérie appartenant désormais au genre *Haemophilus* après avoir notamment été associé au genre *Bacillus* ou encore *Mycobacterium*. Cette bactérie représente l'espèce type de ce genre. Le genre *Haemophilus* est en 2016 constitué de 13 espèces. Leur caractéristique principale est de nécessiter un apport exogène de facteur V (NAD) et/ou de facteur X (protohème) afin de pouvoir se multiplier (Tableau 1) (2).

| Espèce | Exigence en | | Test ALA ^a | Hémolyse bêta | Catalase | Tryptophanase (production d'indole) | Uréase | Bêta-galactosidase | Acidification à partir du | | |
|----------------------------------------------------|-------------|---|-----------------------|----------------|----------|-------------------------------------|--------|--------------------|---------------------------|---------|---------|
| | X | V | | | | | | | Sucrose | Mannose | Lactose |
| <i>H. influenzae/H. aegyptius</i> | + | + | - | - | + | d | d | - | - | - | - |
| <i>H. haemolyticus</i> | + | + | - | d ^b | + | d | + | - | - | - | - |
| <i>H. parainfluenzae</i> | - | + | + | - | + | d | d | + | + | - | - |
| <i>H. pittmaniae</i> | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - |
| <i>H. parahaemolyticus/H. paraphrohaemolyticus</i> | - | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - |
| <i>H. sputorum</i> | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| <i>H. ducreyi</i> | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

^a Test de synthèse des précurseurs de l'hème à partir de l'acide δ-aminolévulinique.
^b Caractère variable selon le biotype ou la souche.

Tableau 1. Caractères principaux d'identification des espèces humaines d'*Haemophilus*

D'un point de vue phylogénétique, le genre *Haemophilus* est un ensemble hétérogène au sein d'une même famille (Tableau 1) (3). Un remaniement taxonomique a conduit à l'individualisation du genre *Aggregatibacter*. On voit sur cet arbre phylogénétique (Figure 1) que *H.felis*, *H.haemoglobinophilus*, *H.paracuniculus* et *H.parasuis* sont des espèces retrouvées essentiellement chez l'animal. Leur appartenance au même genre que *H.influenzae* n'est pas justifiée par les données génétiques. Il est à noter que les neuf espèces retrouvées chez l'homme forment trois groupes phylogénétiques différents : le groupe *influenzae* dans lequel on retrouve *H.influenzae/aegyptius* et *H.haemolyticus* ; le groupe *parainfluenzae* dans lequel on retrouve *H.parainfluenzae* et les espèces hémolytiques *H.parahaemolyticus/paraphrohaemolyticus*, *H.pittmaniae* et *H.sputorum* ; et le groupe *H.ducreyi* (agent du chancre mou).

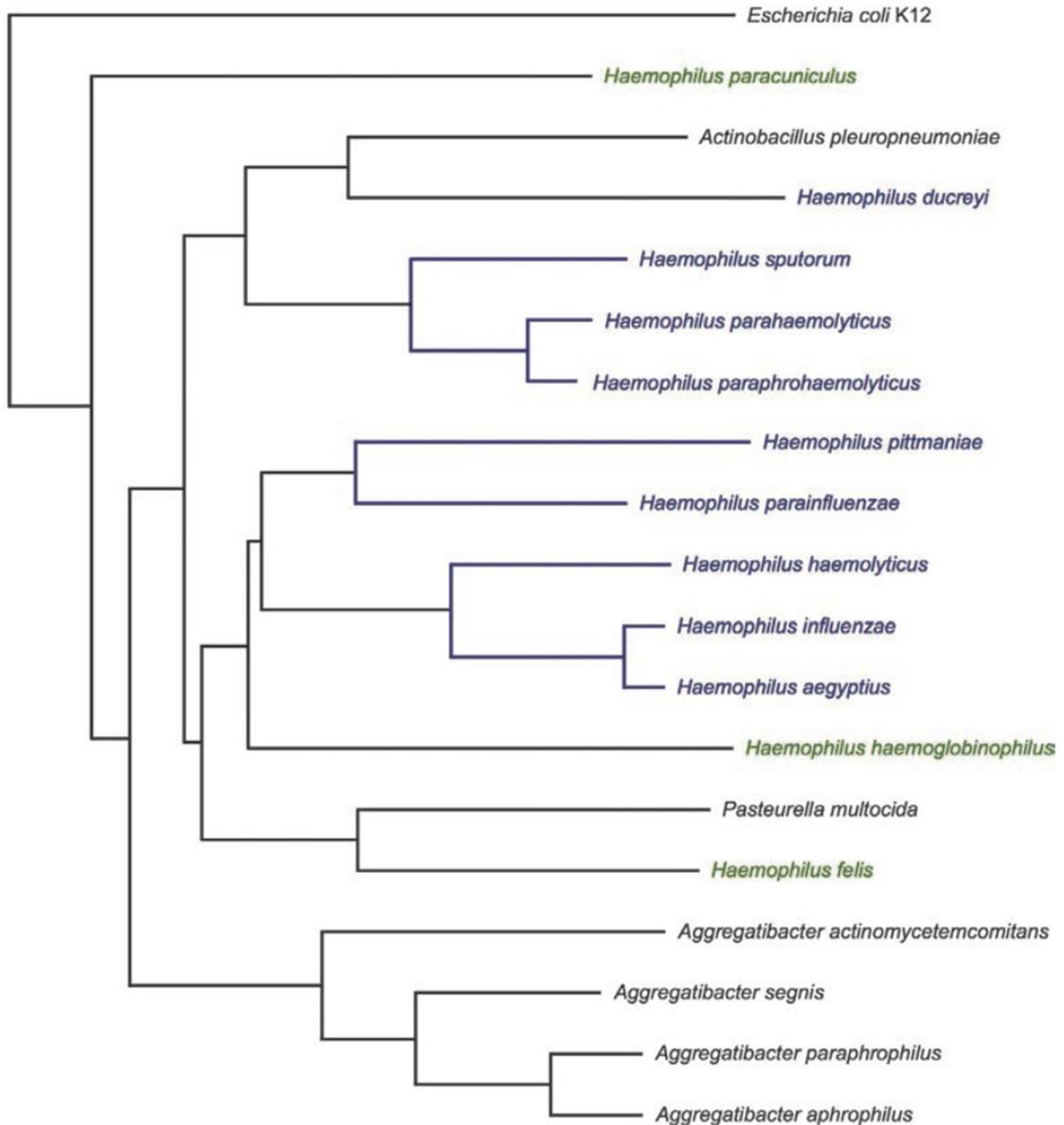


Figure 1. Arbre phylogénétique montrant les relations des séquences du gène *sodA* des 13 espèces d'*Haemophilus* et des souches types des principaux genres *Pasteurellaceae*
 En bleu, les espèces humaines ; en vert, les espèces animales
 Barre d'échelle : différence de 10% entre séquences nucléotidiques (3)

Au niveau morphologique, ce sont des petites bactéries en forme de bacille et dont l'aspect est pléomorphe : on peut aller du coccobacille (0,3 x 0,5 μm) à des formes filamenteuses de plus de 10 μm de long. Ces dernières sont gram négatives, non sporulées et elles peuvent être encapsulées. Le gène *bexA* code pour la protéine BexA, responsable de la capsulation chez toutes les souches d'*Hinf* encapsulées (4). On retrouve 6 sérotypes principaux de a à f. Cette population de souche encapsulée représente une minorité des souches d'*Hinf*. Nous reviendrons sur ce point qui aura toute son importance.

Au niveau des caractères physico-chimiques, *Hinf* est aéro-anaérobie facultatif, elle a la capacité de vivre en présence d'oxygène et survit en présence de dioxyde de carbone. La température optimale de croissance est comprise entre 35 et 37 °C.

L'Homme est l'hôte principal d'*Hinf*, il fait partie de la flore commensale des voies aériennes et de l'oropharynx. Il colonise plus de 80 % des individus. La colonisation commence dès l'enfance. Environ 20 % des nourrissons sont colonisés au cours de leurs premières années de vie. Ce chiffre augmente avec l'âge : la colonisation par cette bactérie touche plus de 50% des enfants de 5-6 ans et jusqu'à environ 75 % des adultes (5). *Hinf* adhère à l'épithélium des muqueuses via différents mécanismes que nous détaillerons ci-après.

A contrario, c'est aussi un pathogène pyogène qui va, en fonction des souches, exprimer différents facteurs de virulence. Ces derniers seront généralement absents des autres espèces du genre. Les facteurs de virulence sont les suivants : pili et adhesine situés au niveau de la membrane externe et responsables de l'adhésion à la mucine et aux épithéliums ; protéase sécrétée clivant les IgA1 des muqueuses ; lipooligosaccharide capable d'induire la formation d'un « biofilm » et dont la variabilité antigénique permet l'échappement de la réponse anticorps du système immunitaire humorale ; et enfin la capsule polysaccharidique en cause dans les infections les plus graves.

1.1.2. Atteintes cliniques

On peut catégoriser la pathogénicité d'*Hinf* en deux grandes classes : les infections invasives et non invasives. Les infections invasives d'une part regroupent les méningites, les pneumonies, les bactériémies, les arthrites et ostéomyélites (6). D'autre part, les infections non invasives regroupent les otites moyennes aiguës, les conjonctivites, les sinusites, les bronchopneumopathies et les infections du perpartum (6).

Depuis la vaccination contre *Hib*, la plupart du temps, les infections invasives ne sont plus dues à des isolats encapsulés, mais à des NTHi (7). Dans la littérature, on retrouve une souche non encapsulée R2866a provoquant des infections invasives telles que des méningites (8)(9)(10)(11)(12). Les infections non invasives, quant à elles, sont à peu près toujours dues à des isolats non capsulés NTHi.

Chez les enfants de moins de 5 ans, l'atteinte la plus fréquente est l'otite moyenne aiguë (OMA), souvent associée à une conjonctivite. Cette atteinte est un problème de santé publique. En effet, l'incidence de l'otite moyenne au cours des trois premières années de la

vie a un impact considérable sur la capacité intellectuelle, la réussite scolaire, la parole et le langage (13). Jusqu'à 100 % des enfants vivants dans des pays en développement et 62 % de ceux vivants dans des pays développés font une otite moyenne aiguë avant l'âge de 1 an (14)(15)(16). La récurrence de ces OMA est fréquente. Dans ces cas, on isole de manière récurrente les mêmes souches de NTHi : 86-028NP (17) et R2846 (18)(19). Les NTHi sont responsables d'environ 30 % des OMA (20)(21)(22). Ces souches forment un biofilm adhérent à la muqueuse de l'oreille moyenne qui a pour rôle la protection de la bactérie dans son environnement, diminuant l'efficacité de l'antibiothérapie.

Chez l'adulte, les bronchopneumopathies à *Hinf* se rencontrent chez des patients ayant des facteurs de risques tels que pathologies respiratoires obstructives, ventilation mécanique, surinfection virale respiratoire (23). Chez ces patients avec infections pulmonaires récidivantes, on voit émerger des résistances aux fluoroquinolones et aux β -lactamines. Il est à noter aussi que la transmission de ces souches peut être nosocomiale. Ces infections respiratoires sont une cause majeure de morbi-mortalité dans les pays développés (24). D'autre part, *Hinf* entraîne des sinusites, seul ou en association avec d'autres bactéries.

Hinf est aussi responsable d'infections materno-fœtales, de fréquence croissante en Europe (25)(26). La plupart surviennent en perpartum, mais il existe aussi des atteintes placentaires entraînant des avortements spontanés précoces ou une mort fœtale *in utero* (27).

1.1.3. Mécanismes physiopathologiques & facteurs de virulence

Haemophilus influenzae est divisé en deux catégories, les souches capsulées (a à f, dont le sérotype b) et les souches non encapsulées, les NTHi. Ces dernières sont définies par leur incapacité à réagir avec de l'antisérum capsulaire dirigé contre le polysaccharide. Les souches encapsulées jouent un rôle dans les infections invasives. Le mécanisme de défense principal contre l'invasion systémique est l'action du complément médié par les anticorps anti-*Hinf*. Le sérum est bactéricide pour la plupart des souches NTHi, néanmoins pour les souches encapsulées, il ne l'est pas.

Les NTHi sont plus rarement responsables de maladies invasives, mais jouent un rôle important dans les pathologies respiratoires. C'est un pathogène des muqueuses. La plupart des infections respiratoires proviennent des souches NTHi.

Pour *Hinf*, comme pour de nombreux pathogènes, il n'y a pas de production de toxines. C'est principalement la réponse immunitaire de l'hôte qui est responsable des lésions tissulaires. Les mécanismes infectieux de *Hinf* sont abordés ci-après.

Interactions mucociliaires

En pénétrant au niveau respiratoire, la bactérie doit échapper aux différents mécanismes d'élimination microbiens de l'appareil mucociliaire. La clairance mucociliaire et les molécules antibactériennes (lysozymes, lactoferrines, peptides antimicrobiens) travaillent en synergie pour éliminer les agents infectieux des voies respiratoires.

Face aux défenses de l'hôte, *Hinf* possède de nombreux mécanismes permettant de moduler leurs actions. Les protéines de membrane P2 et P5 facilitent la liaison des bactéries au mucus (28)(29). Le lipooligosaccharide (LOS) présent dans la paroi cellulaire des souches NTHi possède un effet modulateur sur la fonction ciliaire entraînant la mort des cellules ciliaires (30). Une autre protéine de membrane, la lipoprotéine D, possède des effets similaires sur la fonction ciliaire (31).

Adhérence

La capacité d'adhérence d'*Hinf* aux cellules de l'arbre respiratoire est une étape clé dans sa pathogénicité. Il existe différents mécanismes permettant aux NTHi d'adhérer aux cellules respiratoires.

Les adhésines sont des facteurs communs de virulence des *Hinf* (32). On les retrouve dans une grande proportion des souches non typables. Elles sont également la cible des anticorps anti-*Hinf* (33). De nombreuses études ont mis en avant l'importance des adhésines, notamment de deux sous-types principaux HMW1 et HMW2 (34).

Les NTHi expriment des pili à leur surface, permettant une agglutination des globules rouges ainsi que la fixation de la bactérie aux cellules épithéliales des voies respiratoires (35). Il existe cinq types de pili différents et ils ne sont présents que sur un petit groupe de NTHi (36)(37)(38).

Dans environ 25 % des cas, les souches NTHi ne possèdent pas d'adhésines, ni de pili, mais sont toujours capables de se fixer à l'épithélium respiratoire. Dans ce cas, on retrouve deux facteurs de virulence importants qui sont les protéines de membranes Hia et Hap (39).

Échappement au système immunitaire

Après l'adhésion à la muqueuse respiratoire, la bactérie module l'action du système immunitaire afin de pouvoir persister à la surface des cellules épithéliales.

Les immunoglobulines (Ig) sont les agents effecteurs de l'immunité humorale. Il existe différents isotypes d'Ig. L'isotype A (IgA) possède un rôle majoritaire dans la prévention des infections des muqueuses. Elles se lient aux bactéries et empêchent leurs fixations aux muqueuses, inactivent les toxines et facilitent la cytotoxicité médiée par les anticorps. La sous-classe d'IgA prédominante est l'IgA1. Les NTHi ont la capacité de sécréter des endopeptidases (type 1 et 2) qui clivent et inhibent l'effet des IgA1 (40)(41). Presque toutes les souches de NTHi expriment une de ces deux protéases à IgA.

Malgré le manque d'études sur le biofilm et les NTHi, il existe des données démontrant que les NTHi peuvent se développer sous une forme comparable au biofilm et que ce type de croissance joue un rôle dans la virulence (42)(43). Ce « biofilm » aurait la capacité d'inhiber les produits bactériostatiques sécrétés tels que la lactoferrine, les lysozymes et la fonction des anticorps. Cette formation de micro-colonies apparentées à un biofilm lui permet de se fixer à un tissu tout en diminuant l'action des antibiotiques et des mécanismes de clairance respiratoire de l'épithélium.

Variation de phase et dérive antigénique

Haemophilus influenzae est capable de modifier une partie d'un composant de sa structure cellulaire. Ce mécanisme est déjà bien documenté pour les virus tel que la grippe. Cette modification de structure est appelée variation de phase et est impliquée dans la pathogénicité de la bactérie. Les structures les plus touchées par ce mécanisme sont le LOS, les adhésines et les pili. Ce mécanisme induit une variation de sensibilité à la protéine C réactive et au complément (44).

En plus de la variation de phase, certaines souches d'*Hinf* acquièrent une dérive antigénique impliquant une mutation permanente des séquences d'acides aminés dans certaines structures impliquant une variation d'un épitope. Ce phénomène est bien décrit pour la protéine de membrane externe P2 (protéine fortement immunogène) (45). D'autres exemples de dérive antigénique sont connus pour la protéine de membrane externe P5 et les protéases à IgA1.

Hétérogénéité génétique

Les NTHi sont génétiquement très diversifiés. Cette observation résulte d'un échange génétique horizontal entre les souches. Ces dernières possèdent un large répertoire de loci codants pour les adhésines et les protéases à IgA. Dans des études, la virulence a été associée à la présence ou non de certains locus (46)(47).

En somme, plusieurs processus bactériens liés à la spécificité de l'hôte en contact seraient impliqués dans la pathogénicité des NTHi. Les souches de NTHi sont génétiquement et phénotypiquement diverses. Certains gènes codant pour des facteurs de virulence ne sont pas retrouvés dans toutes les souches responsables d'infections, ce qui met en évidence que les souches ont des mécanismes de pathogénicité différents.

Nous ne savons pas encore si les souches de NTHi diffèrent par leurs capacités à provoquer des infections muqueuses ou systémiques ou si les facteurs de l'hôte sont les principaux responsables de leurs modifications.

La présence en ligne de banque de données publique de génomes de *Hinf* facilitera l'étude de la diversité des NTHi et pourrait distinguer un NTHi candidat afin de développer un vaccin anti-NTHi responsable d'infection.

1.1.4. Méthodes diagnostiques

Prélèvements

Lors d'infections non invasives, les prélèvements seront réalisés au site local de la lésion. On retrouve le recueil de liquide de paracentèse, les expectorations induites, les ponction-aspirations du sinus maxillaire et des écouvillonnages (muqueuses conjonctivale, vaginale et urétrale). Toutes les analyses des sécrétions naso-pharyngées ne sont pas justifiées car on rappelle que *Hinf* est un commensale des voies oropharyngées.

Lors des infections invasives, il est indispensable de prélever des hémocultures en plus du site de l'infection (ponction lombaire, prélèvements pulmonaires, prélèvements chirurgicaux, liquide articulaire, etc.). La réalisation d'hémocultures est cruciale pour le diagnostic des cellulites (périorbitaire et épiglottite), des ostéomyélites et des endocardites à *Hinf*.

Pour les infections maternofoetales, différents prélèvements doivent être réalisés en fonction de l'atteinte : liquide gastrique du nouveau-né, liquide amniotique et placenta chez la mère. Pour le diagnostic des cas de mort *in utero*, les produits d'autopsie permettront de faire le diagnostic rétrospectif.

Il est important que tout prélèvement soit réalisé avant toute antibiothérapie si la situation le permet.

Transport

Tous les prélèvements doivent être acheminés sans délai et à température ambiante au laboratoire P2 en raison de la fragilité de la bactérie qui ne résiste ni au froid, ni à la dessiccation. De plus, la rapidité de transport jusqu'au laboratoire est justifiée par l'urgence diagnostique en fonction de l'atteinte clinique. Il est à noter que l'utilisation d'un milieu de transport gélatiné est possible si le délai est supérieur à 3 heures, à température ambiante.

Examen direct

L'état frais se révèle peu utile pour la mise en évidence des *Haemophilus* du fait de sa petite taille et de l'immobilité de la bactérie. La coloration de Gram quant à elle, permet d'observer toutes les espèces du genre *Haemophilus*.

Il faut dissocier deux types de prélèvements : les prélèvements polymicrobiens et les prélèvements monomicrobiens (liquide céphalo rachidien, hémocultures, etc.). Pour les prélèvements polymicrobiens, l'interprétation de l'examen direct est difficile ; tandis que pour les prélèvements monomicrobiens, l'observation de coccobacilles à Gram négatif est fortement évocatrice d'*Hinf*. La bactérie peut aussi être de forme longue voire sphéroplastes sans traitement (Figure 2). Une caractéristique intéressante est visualisable au microscope : la présence ou non d'une capsule, identifiable par un halo autour de la bactérie. Néanmoins, cet aspect de halo n'est pas spécifique de la présence d'une capsule. Ce phénomène artefactuel peut s'expliquer par une couche épaisse de protéine recouvrant la membrane externe.

Si le prélèvement est réalisé après le début de l'antibiothérapie, la lecture sera plus délicate et la confusion avec d'autres germes est possible (pneumocoque décoloré).

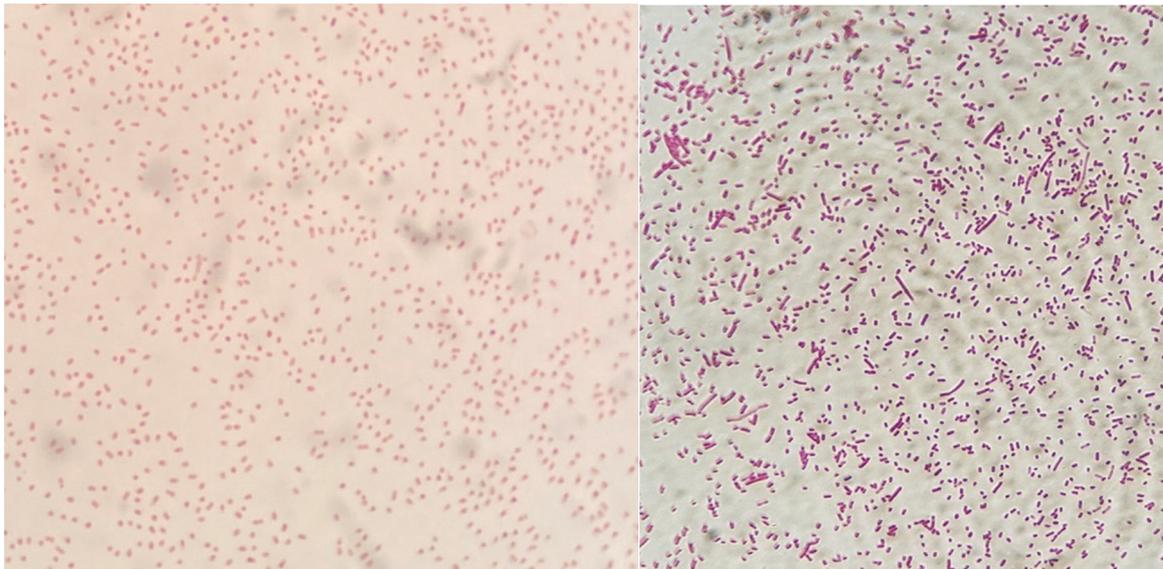


Figure 2. Examen direct d'un liquide céphalorachidien de méningite à *Haemophilus influenzae* - Coloration de Gram x 1000 (48)

Culture

La pousse en culture du genre *Haemophilus* n'est pas possible sur une gélose ordinaire, elle nécessite obligatoirement une gélose supplémentée en facteurs V (β -NAD ou NADP) et/ou une source d'hème (hémine, hématine, facteur X). En routine au laboratoire, le milieu usuel est le milieu « chocolat » ou PVX (Polyvitex®). Ce milieu gélosé à l'hémoglobine cuite est supplémenté en polyvitamines contenant la β -NAD. Une autre gélose sur laquelle la bactérie est capable de se développer est le milieu MH-F ou gélose au sang supplémentée en β -NAD (MH-F : gélose Mueller-Hinton + 5 % de sang défibriné de cheval et 20 mg/L de β -NAD). L'hème étant apporté dans ce cas par l'hémoglobine de la petite portion d'hématies lysées lors de la préparation.

De manière générale, *Hinf* ne requiert pas de gaz carbonique pour sa pousse. Cependant, à partir des prélèvements microbiologiques, les géloses sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5 % de CO₂ et d'une humidité importante en raison de la sensibilité à la dessiccation de la bactérie.

Le temps d'incubation moyen est de 18 à 24 heures à 35-37°C. Après ce délai d'incubation, si les étapes de prélèvements et d'incubation ont bien été respectées et si l'inoculum est assez important, on pourra observer une croissance au sein de la gélose. Les colonies sur gélose chocolat ont de manière générale les caractéristiques suivantes : une taille de 1 à 1,5 mm, d'aspect lisse, légèrement convexes, incolores à chamois, à bord régulier. Les colonies des isolats capsulés sont brillantes et irisées. On retrouve un phénotype hypermuqueux caractéristique des isolats du sérotype e et de certains isolats du sérotype f.



Figure 3. Colonies d'*Haemophilus influenzae* sur géluse chocolat (PVX)

Une alternative au laboratoire de microbiologie est d'utiliser les antibiotiques pour lesquels les bactéries possèdent une résistance naturelle afin d'isoler ces dernières au sein d'une flore polymicrobienne. Pour *Hinf*, on peut utiliser cette méthode avec des milieux sélectifs contenant un ou plusieurs de ces antibiotiques (glycopeptides, lincosamides, bacitracine) qui inhibent la plupart des autres bactéries du tractus respiratoire, par exemple la bacitracine contre les *Neisseria*.

Les flacons d'hémocultures ne sont de base pas supplémentés en facteurs X et V. Le prélèvement de sang à partir de flacons d'hémocultures permet l'apport en facteurs X et V *via* la lyse des hématies pour assurer la viabilité d'*Hinf*. *A contrario*, le prélèvement en flacon d'hémoculture d'un liquide non hématique (liquide céphalo-rachidien, liquide articulaire, liquide ascite, etc.) n'est pas recommandé pour *Hinf*.

Éléments d'orientation

Hinf, ainsi que toutes les espèces retrouvées chez l'homme du genre *Haemophilus*, synthétisent une catalase (à l'exception de *H.ducreyi*) et une oxydase. Ces deux tests permettent une orientation rapide afin d'identifier une pousse sur géluse.

La plupart des isolats cliniques de *H.influenzae* (biotypes I, II, V et VII) produisent de l'indole à partir du tryptophane, conférant une odeur caractéristique aux cultures (champignons de Paris).

L'exigence en facteurs X et/ou V peut aussi être utilisée en tant que méthode d'orientation. Cette méthode est appelée test de satellitisme. Elle permet de mettre en évidence la pousse de certaines espèces d'*Haemophilus* (Tableau 1) (49)(50).

Pour cibler trois espèces du genre *Haemophilus*, on peut utiliser une alternative qui démontre l'incapacité des espèces « X-dépendantes » à synthétiser les porphyrines, précurseurs de l'hème. Si le test revient négatif, il nous oriente vers les trois espèces suivantes : *H.influenzae*, *H.haemolyticus* et *H.ducreyi* (49)(50).

De nos jours, ces méthodes sont utilisées uniquement à titre de recherche car elles sont trop longues par rapport aux nouveaux outils d'identification d'espèce.

Identification d'espèce

L'utilisation des caractères biochimiques et métaboliques des bactéries afin d'identifier une espèce est une méthode beaucoup trop longue et fastidieuse. Malheureusement, à l'heure actuelle, ces méthodes sont peu compatibles avec les exigences d'accréditation des laboratoires.

Au laboratoire, la technique la plus utilisée et la plus fiable pour identifier une espèce est la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight, cf. annexe « MALDI-TOF MS ») (51). Le spectre obtenu est comparé avec la base de données disponible au laboratoire. Cette technique permet de différencier *Hinf* des 70 % d'isolats non hémolytiques d'*H.haemolyticus* ; cette distinction ne pouvant pas être réalisée par méthode métabolique ou par analyse des séquences des gènes 16S.

D'autre part, la Polymerase Chain Reaction (PCR, cf. annexe « La PCR ») est utilisée pour identifier l'espèce d'*Haemophilus* (52). Cependant, la similitude génétique entre les NTHi et *Haemophilus haemolyticus* limite le haut pouvoir discriminant de la PCR. Actuellement, il n'existe pas de gène unique capable de différencier spécifiquement les NTHi de *H.haemolyticus* (52). Le candidat le plus prometteur à ce jour est le gène *hpd#3*, codant pour la protéine D (53)(52). C'est ce dernier qui possède la meilleure sensibilité (88,9 %) et spécificité (91,7 %) pour les NTHi par rapport à sept autres gènes testés (*ompP2*, *ompP6*, *lgtC*, *hpd#1*, *16S*, *fucK*, *iga*) (Tableau 2). La détection d'*Hinf* encapsulé peut se faire à l'aide d'une PCR détectant le gène *bexA* (54).

| n=60 | <i>omp P2</i> | <i>omp P6</i> | <i>omp P6</i> HRM | <i>lgtC</i> | <i>hpd#1</i> | <i>hpd#3</i> | 16S | <i>fucK</i> | <i>iga</i> |
|-------------|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Sensitivity | 80.6 | 94.4 | 94.4 | 80.6 | 88.9 | 88.9 | 69.4 | 75 | 88.9 |
| Specificity | 91.7 | 62.5 | 66.7 | 94.8 | 91.7 | 91.7 | 87.5 | 75 | 91.7 |
| ROC area | 0.86 | 0.78 | 0.81 | 0.88 | 0.90 | 0.90 | 0.78 | 0.75 | 0.90 |
| [95% CI] | [0.77; 0.94] | [0.68; 0.89] | [0.70; 0.91] | [0.80; 0.96] | [0.83; 0.98] | [0.83; 0.98] | [0.68; 0.89] | [0.63; 0.86] | [0.83; 0.98] |

Tableau 2. Sensibilité, spécificité et aire sous la courbe ROC des gènes utilisés afin de détecter les NTHi (52)

Une autre méthode utilisant le séquençage de gènes conservés permet d'identifier la plupart des espèces sans les différencier (*Hinf*, *H.aegyptus*, *H.parahaemolyticus*, *H.paraphrohaemolyticus*). Il est possible d'utiliser une approche multigénique (*Multi locus Sequence Typing*, MLST) afin d'étudier certaines souches proches à la fois d'*H.influenzae* et d'*H.haemolyticus* (55)(56). Cette approche est trop longue et fastidieuse pour être utilisée en routine au laboratoire.

Typage

Le biotypage d'*Hinf* se base sur des caractéristiques biochimiques telles que l'ornithine-décarboxylase, l'uréase et la production d'indole (32)(2). A partir de ces trois paramètres, on peut définir 8 biotypes (Tableau 3). Les isolats responsables des atteintes cliniques chez l'homme sont retrouvés dans les biotypes I, II, III et IV (57). Au sein des biotypes I et II, on retrouve la quasi-totalité des *Hib* (isolats encapsulées d'*Hinf* de type b) (57). Les isolats conjonctivaux font généralement partie du biotype III et les isolats urogénitaux du biotype IV (32).

| Biotype | Production d'indole | Uréase | Ornithine décarboxylase |
|---------|---------------------|--------|----------------------------|
| I | + | + | + |
| II | + | + | - |
| III | - | + | - |
| IV | - | + | + |
| V | + | - | + |
| VI | - | - | + |
| VII | + | - | - |
| VIII | - | - | - |

Tableau 3. Caractéristiques des biotypes d'*Haemophilus influenzae* (58)

Cependant, le typage essentiel est celui des souches encapsulées. C'est en 1931 que Margaret Pittman a défini les 6 sérotypes (a à f). La technique utilisée pour mettre en évidence ces sérotypes est l'agglutination à partir de sérums spécifiques. Cependant, la sensibilité de ces tests reste faible (59), il est donc indispensable d'utiliser une technique de PCR afin de confirmer le résultat.

La PCR se base sur trois régions fonctionnelles codant pour la capsule (locus I, II, III) nommées cap. Dans la région I, on retrouve le gène commun de capsule (*bexA*). Dans la région II, on a les gènes spécifiques aux capsules (*acs*, *bcs*, *ccs*, *dcs*, *ecs*, *fccs*) permettant de définir le sérotype spécifique (54)(60). Dans la région III, les gènes *hcsA* et *hcsB* sont impliqués dans l'exportation de polysaccharides en capsules (61).

Néanmoins, il existe des discordances entre ces deux méthodes (agglutination/PCR) pouvant classer à tort les encapsulés en non encapsulés. Ceci est dû à une délétion partielle au niveau du gène *bexA*, le rendant indétectable par PCR alors qu'il est toujours actif avec l'agglutination positive. Une seconde méthode basée sur le gène *bexB* permet de différencier les vraies souches NTHi des souches typables. Ce gène se situe dans la région I et à la différence de *bexA*, il n'a jamais été décrit de mutations au niveau de *bexB* (60). Pour typer la bactérie, il est également possible d'utiliser une PCR en temps réel ciblant les gènes spécifiques de capsule (*acs*, *bcs*, *ccs*, *dcs*, *ecs*, *fccs*). Cette méthode est utilisée en routine dans certains laboratoires (62).

Lors d'études épidémiologiques, c'est la méthode MLST (MultiLocus Sequence Typing) qui est utilisée afin de réaliser la comparaison des différents isolats d'*Hinf* (63). Généralement l'analyse de séquence de sept gènes concaténés, dit gènes domestiques, est utilisée. Les résultats sont ensuite comparés en ligne sur des banques de données.

Bien qu'aisé, le typage d'*Hinf* par agglutination manque de pouvoir discriminant. Le typage moléculaire possède une meilleure sensibilité et spécificité que la méthode par agglutination. Cependant, cette méthode n'est pas disponible dans tous les laboratoires et ne peut pas détecter les suppressions complètes de capsule par délétion. Le biotypage a l'avantage de pouvoir associer la souche à une atteinte clinique spécifique ou à un groupe de sérotype. Cette méthode reste peu reproductible. A l'inverse, le MLST est une méthode précise, reproductible et robuste malgré le fait qu'elle soit fastidieuse, onéreuse et requiert un haut niveau d'expertise (60).

A l'avenir la spectrométrie de masse MALDI-TOF pourrait être un outil de typage capsulaire rapide et intéressant. Elle a démontré sa sensibilité et sa spécificité dans une étude de *Mansson et al, 2018* (64). Ils ont constitué leur propre base de données à partir de 258 souches d'*Hinf* de différents laboratoires du monde entier. Chacune d'entre elles a été typée au préalable par MLST. Les isolats ont été sélectionnés pour représenter l'ensemble des types de capsules (a-f), des NTHi et des souches avec des variants capsulaires.

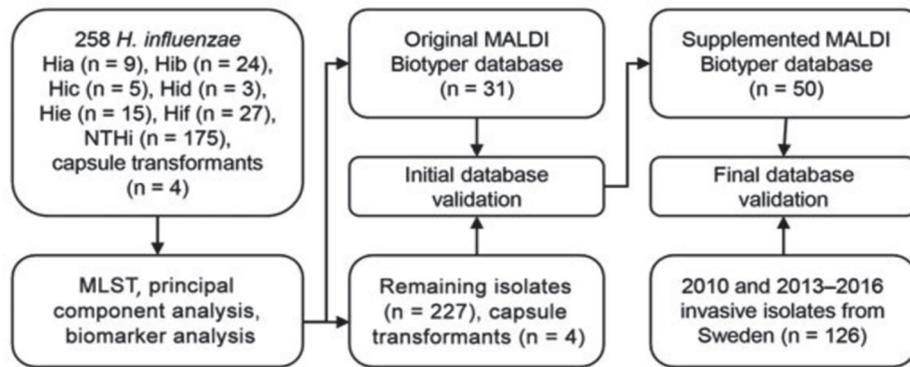


Figure 4. Schéma expliquant les étapes de validation de la database du MALDI

Les analyses des composants principaux et des biomarqueurs des spectres de masse ont montré des regroupements et des pics de masse corrélés avec des lignées génétiques spécifiques au type de capsule. Les spectres bruts de tous les isolats (n=258) ont été prétraités et analysés via le logiciel d'analyse intégré MALDIquant via R. Un lissage et une correction de la ligne de base ont également été effectués. Les spectres avec une allure aberrante (absence ou pic supplémentaire) et une mauvaise qualité (pic en dehors d'une plage de 500 ppm) étaient retirés. Si après le contrôle, moins de 20 spectres étaient retrouvés, de nouveaux spectres pour cet isolat spécifique étaient obtenus. Le but étant de créer des spectres principaux ou spectres de références.

Puis 31 isolats ont été sélectionnés pour construire une base de données de typage des capsules. Afin d'obtenir des spectres de masse, chaque isolat a été spotté deux fois et trois analyses ont été effectuées sur chaque spot, ce qui a donné 6 spectres/isolats. Les isolats de la base de données de référence ont été déposés sur 8 spots, ce qui a donné 24 spectres, avant d'être ajoutés à la base de données.

Pour valider cette base de données, les *Hinf* non utilisés comme référence ont été choisis (n=227). Comme tous les isolats étaient des *Hinf*, des valeurs de score élevées étaient attendues (>2,0). Chaque spectre a été classé en fonction du spectre de référence de la nouvelle base de données le plus proche. Pour la classification des isolats, $\geq 5/6$ spectres classés au même type (a-f ou NTHi) étaient nécessaires. Si $\leq 4/6$ spectres étaient classés au même type, l'isolat était classé comme non concluant. Pour améliorer la spécificité de la méthode de typage, compte tenu de l'hétérogénéité connue de NTHi, la base de données de typage des capsules a été complétée avec des isolats de NTHi qui n'avaient pas été correctement classés lors de la validation initiale, jusqu'à ce que tous les isolats de l'ensemble de l'évaluation non inclus dans la base de données soient correctement classés sur chaque

spectre. La validation avec les autres isolats (n=227) a montré une sensibilité de 100 % et une spécificité de 92,2 % pour les souches encapsulées (a-f ; n=61).

Par la suite, la nouvelle base de données complétée (n=50) a été validée en aveugle en utilisant la classification par spectrométrie de masse MALDI-TOF d'une seconde collection de 126 souches d'*Hinf* provenant de prélèvements invasifs (sang et LCR). La sensibilité et la spécificité ont été calculées en utilisant le typage par PCR comme norme. La sensibilité et la spécificité sont toutes les deux de 100 % pour les souches encapsulées (b, e et f ; n=28). La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une méthode précise pour le typage des capsules de *Hinf*.

Après une validation à grande échelle, cette méthode a le potentiel pour une utilisation clinique et de recherche. Le niveau d'expertise nécessaire conjugué aux modifications des paramètres du spectromètre de masse requises rendent, malgré tout, son utilisation en routine complexe dans la majorité des laboratoires.

En outre, l'analyse génomique a révélé un degré plus élevé de diversité génétique parmi les NTHi par rapport aux *Hinf* typables. La méthode de sérotypage du Whole Genom Sequencing (WGS) prédit avec précision le type de capsule *Hinf* et peut servir de méthode alternative pour le sérotypage des *Hinf* (61).

Dans cette étude, 395 isolats typables et 293 isolats NTHi ont été caractérisés par le WGS. L'analyse phylogénétique et le typage de séquences multilocus ont été utilisés pour caractériser la diversité génétique globale. Des comparaisons par paires ont permis d'évaluer les loci de la capsule. Une méthode de sérotypage WGS a été développée pour sérotyper *Hinf*. Les résultats du sérotypage WGS ont été comparés au sérotypage par agglutination sur lame (SAST) ou par PCR en temps réel (RT-PCR).

Les isolats de chaque sérotype *Hinf* sont regroupés en un ou deux sous-clades, chaque sous-clade étant associé à un type de séquence (ST) distinct. Les isolats de NTHi étaient génétiquement divers, avec sept sous-clades et 125 ST détectés. Les régions I et III du locus de la capsule ont été conservées parmi les six sérotypes ($\geq 82\%$ identité nucléotidique). En revanche, les gènes de la région II étaient moins bien conservés, avec seulement six paires de gènes de tous les sérotypes présentant une identité nucléotidique de $\geq 56\%$. La méthode de sérotypage du WGS était conforme à 99.9 % à la SAST et à 100 % à la RT-PCR pour déterminer le sérotype *Hinf*.

Le typage par la méthode du WGS est actuellement peu utilisé, mais représente une perspective d'avenir en regard de la démocratisation progressive des méthodes de séquençage haut débit.

Diagnostic direct sur échantillon

Dans certaines situations urgentes, le délai diagnostic d'une culture peut-être jugé trop long. C'est pour cela que différentes méthodes diagnostiques peuvent-être réalisées directement sur les prélèvements. Les prélèvements ciblés sont le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sang. Trois méthodes peuvent être utilisées :

- la recherche d'antigènes solubles capsulaires b peut-être réalisée par agglutination latex ou immuno-chromatographie sur LCR ou sérum. La sensibilité et la spécificité de ce test restent faibles, ce qui nécessite un contrôle par méthode de biologie moléculaire.
- la mise en évidence d'acides nucléiques d'*Hinf* dans le LCR et le génotypage capsulaire par PCR. Cette méthode permet un gain de temps précieux sur le diagnostic des méningites bactériennes communautaires. Certains automates permettent la détection de pathogènes viraux, bactériens et parasitaires à partir d'un panel unique (Biofire®, cf. annexe « Le Biofire »). D'autre part, ces méthodes de PCR syndromique multiplex s'utilisent de plus en plus dans les prélèvements respiratoires notamment en réanimation. Elles permettent une adaptation rapide de l'antibiothérapie.
- le séquençage de nouvelle génération permet, *via* une amplification du gène 16S, d'obtenir de nombreux amplicons qui seront ensuite séquencés (65). Après obtention de la séquence d'intérêt, un *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de cette dernière permet de mettre en évidence *Hinf* ou une autre espèce. Ce type de détection peut être réalisé sur des prélèvements invasifs de type LCR ou sang, mais il peut aussi être utilisé pour des prélèvements polymicrobiens tels que les prélèvements respiratoires (66). Les agents pathogènes respiratoires peuvent être identifiés directement à partir des expectorations en comparant le rapport relatif des lectures alignées (reads) des séquences générées avec chaque bactérie, sans qu'il soit nécessaire de procéder à un examen microscopique ou à une bronchoscopie. Toutefois, des études supplémentaires portant sur un plus grand nombre de cas sont nécessaires pour établir des critères diagnostics fiables pour les agents pathogènes respiratoires, basés sur l'abondance relative de lecture par rapport aux bactéries commensales. Pour ce faire, le MinION (séquençage de nanopore 16S, cf. annexe « LeMinION ») est un séquenceur à haut débit de petite taille. Avec ce séquenceur, les lectures générées peuvent être analysées en temps réel, ce qui rend cette approche prometteuse (67). Le délai d'exécution du séquençage de MinION 16S est d'environ 10 heures. L'approche diagnostique basée sur le séquençage de l'amplicon 16S peut être plus sensible que les tests conventionnels et serait particulièrement utile pour identifier les bactéries non cultivables ou détecter les bactéries dans les échantillons collectés après

exposition aux antibiotiques. Par conséquent, cette méthode pourrait permettre de détecter des agents pathogènes qui n'ont pas été détectés par les tests conventionnels.

Diagnostic indirect

L'utilisation de la sérologie afin de détecter les anticorps dirigés contre *Haemophilus influenzae* n'est pas utilisée comme méthode diagnostique (cf. annexe « Sérologie *Haemophilus influenzae* b »). Cette sérologie permet d'évaluer la présence d'anticorps protecteurs post-vaccination. Ce test est recommandé pour les patients immunodéprimés (transplanté, maladie auto-immune, splénectomisé, etc.).

1.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

1.2.1. Généralités

In vitro, *Hinf* sauvage est naturellement sensible aux β -lactamines (sauf vis à vis des isoxazolyl-pénicillines et de la cefsulodine), quinolones, cyclines, rifampicine, sulfamides, triméthoprim, phénicolés, fosfomycine, aminosides, nitrofuranes et à la mupirocine. Les macrolides et les streptogramines sont actifs *in vitro* pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 1 à 4 mg/L, mais *in vivo* leur efficacité se révèle nulle (68).

D'autre part, *Hinf* possède des résistances naturelles aux lincosamides, glycopeptides, nitro-imidazolés, oxazolidinones, à l'acide fusidique et à la bacitracine.

En pratique, les molécules les plus utilisées sont les β -lactamines (69)(70), les fluoroquinolones, le cotrimoxazole (triméthoprim-sulfaméthoxazole), la doxycycline et la rifampicine. Parmi les β -lactamines, les plus utilisées sont l'amoxicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ceftriaxone et le cefotaxime (C3G les plus actives).

La sensibilité inconstante aux β -lactamines et au cotrimoxazole ainsi que l'émergence de souches résistantes aux quinolones rendent la réalisation d'un antibiogramme nécessaire dans la plupart des situations cliniques.

Au laboratoire, on utilise des méthodes par diffusion en milieu solide (gélose MH-F) sur lesquels on dépose des disques imprégnés par des doses définies d'antibiotique ou bien à l'aide de bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique (epsilométrie). On ensemence la boîte au préalable avec un inoculum de notre bactérie quantifié à 0,5 McFarland. L'incubation se fait à 20 ± 4 heures sous 5% de CO_2 et à une température de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. La liste standard d'antibiotiques à tester est la suivante : pénicilline G, ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, doxycycline, cotrimoxazole et acide nalidixique.

En fonction de l'écologie du patient et du service, les souches habituellement retrouvées peuvent avoir des mécanismes de résistance acquis, c'est pour cela qu'une liste complémentaire d'antibiotiques est proposée : céfixime, céfotaxime, méropénème, chloramphénicol, rifampicine, fluoroquinolones, gentamicine. Cette liste doit être adaptée en fonction des pathologies. Ces règles sont fixées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). La réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide est peu fiable.

1.2.2. Résistances et dépistage

Pour dépister la résistance d'*Hinf* aux β -lactamines et aux fluoroquinolones, il existe un algorithme.

Pour les β -lactamines, un disque de pénicilline G est chargé à 1 UI. Si le diamètre d'inhibition est ≥ 12 mm, la souche est sensible à toutes les β -lactamines. Si le diamètre d'inhibition est < 12 mm, la réalisation d'un test phénotypique mettant en évidence ou non une β -lactamase (test Céfinaise, cf. annexe « Test à la Céfinaise ») est indispensable afin d'orienter le mécanisme de résistance.

Si le test à la céfinaise se révèle négatif, il faut mesurer la CMI des β -lactamines de façon systématique afin de les utiliser chez le patient.

Si le test à la céfinaise est positif, cela indique une résistance de la souche à l'ampicilline, l'amoxicilline et la pipéracilline ; les souches ayant un diamètre critique les rendant sensibles à l'amoxicilline-acide clavulanique et aux autres β -lactamines peuvent être utilisés chez le patient. Mais si les souches sont résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique, il faut obligatoirement mesurer la CMI des molécules d'intérêt.

| Pénicilline G disque à 1 UI Diamètres de la zone d'inhibition | Bêta-lactamase | Tests complémentaires et/ou interprétation |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ≥ 12 mm | Ne pas tester | Rendre «sensible» à toutes les bêta-lactamines pour lesquelles des concentrations et diamètres critiques sont indiqués (y compris ceux comportant une «Note»). Le céfuroxime oral doit être rendu intermédiaire. |
| < 12 mm | Bêta-lactamase négative | Mesurer la CMI des bêta-lactamines destinées à l'usage clinique. |
| | Bêta-lactamase positive | Pour l'ampicilline, l'amoxicilline et la pipéracilline, rendre «résistant». Pour les autres bêta-lactamines et pour les souches sensibles à l'amoxicilline-acide clavulanique, il est possible d'utiliser les diamètres critiques des molécules destinées à l'usage clinique. Pour les souches résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique, mesurer la CMI des molécules destinées à l'usage clinique. |

Tableau 4. Dépistage de la résistance aux β -lactamines chez *Hinf*

Pour les fluoroquinolones, un disque d'acide nalidixique est chargé à 30 μ g. Si le diamètre d'inhibition est ≥ 23 mm, la souche peut être rendue sensible aux fluoroquinolones (lévofloxacine, moxifloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine). Si le diamètre est < 23 mm, la sensibilité des différentes fluoroquinolones d'usage clinique devra être déterminée.

1.2.3. Mécanismes de résistance

Il existe différents types de mécanismes de résistance : enzymatique (enzyme inactivant les antibiotiques), diminution de la perméabilité (pompe à efflux), modification de la cible (méthylation de l'ARN 23S par exemple), génétique (substitution, délétion, insertion).

Pour *Hinf*, la résistance aux β -lactamines peut être causée par deux mécanismes (71)(72)(1):

- Le premier mécanisme de résistance est enzymatique avec la production d'une β -lactamase (TEM-1 ou ROB). On appelle ces souches les BLPAR : *β -lactamase positive ampicillin resistant*. Cette enzyme inactive les molécules citées ci-dessus c'est à dire l'ampicilline, l'amoxicilline, la pipéracilline. L'utilisation d'acide clavulanique en association avec l'amoxicilline permet de saturer cette enzyme par analogie de structure (substrat suicide). Ce mécanisme de résistance est retrouvé pour 15 % des isolats. Il est donc indispensable de réaliser le test à la Céfinase lorsque l'on isole ce germe dans un prélèvement d'intérêt clinique.

Le premier signalement de résistance à l'ampicilline a été réalisé en 1972 (73). Le mode de transmission de ce mécanisme se fait par l'acquisition de plasmide. Les premiers à avoir été mis en évidence sont les plasmides contenant les gènes codant pour des β -lactamases *blaTEM1/2* et *blaROB1*, *blaTEM1* étant le plus répandu. Il est mobile grâce à son association au transposon Tn2/3 déjà présent sur un plasmide cryptique de *Hinf*. Ce dernier peut aussi s'intégrer au chromosome, apportant d'autres types de résistances (68)(74). Une étude a démontré *in vivo* que des plasmides conjugués contenant ces gènes codants pour des β -lactamases pouvaient être transférés à l'espèce *Escherichia coli*, ce qui indique la possibilité d'une propagation inter-espèce de la résistance (75).

- Le deuxième mécanisme de résistance est dû à une modification de la cible de l'antibiotique. *Hinf* possède différents gènes codants pour quatre PLP (protéine liant les pénicillines) mais plusieurs études ont démontré qu'il n'y avait pas de liens entre les résistances et les mutations des PLP1, 2 et 4 (76)(77). Cette mutation intrinsèque touche la principale protéine liant les protéines, la PLP3. Cette dernière est codée par le gène *ftsI*. Il existe plusieurs mutations autour des zones fonctionnelles de la protéine. Ces différentes mutations permettent de classer la PLP3 en quatre classes. Les principales mutations conférant une résistance se trouvent dans l'un des deux sites fonctionnels perturbant le motif Lys-Thr-Gly (KTG) ou Ser-Ser-Asn (SSN), conduisant à une diminution de la liaison de l'ampicilline à la PLP3 (78)(77). On appelle ces souches les BLNAR : *β -lactamase négative*

ampicillin resistant. Cette variation entraîne une résistance variable de la souche à l'ampicilline, l'amoxicilline, la pipéracilline, mais aussi à l'amoxicilline-acide clavulanique et aux céphalosporines de 3^{ème} générations (79)(78). Pour l'utilisation de ces molécules, il est donc indispensable de réaliser les CMI des molécules d'intérêt clinique.

Ces deux mécanismes de résistance peuvent se retrouver seuls ou combinés dans 2 à 5 % des cas. Ces souches sont nommées BLPACR (*β-lactamase positive amoxicillin clavulanate resistant*). La conséquence d'une association de ces deux mécanismes entraîne une résistance plus élevée à l'amoxicilline (que dans le phénotype BLNAR).

Donc, avec ces deux mécanismes de résistance, il est indispensable suite à l'isolement de souches issues de prélèvements d'intérêts cliniques, de réaliser l'antibiogramme ainsi que le test à la céfinase.

Pour *Hinf*, la résistance *via* une modification de la cible peut toucher d'autres antibiotiques. Comme pour la résistance à l'ampicilline, *Hinf* peut modifier la cible des macrolides, l'ARN ribosomal 50S ainsi que les protéines de liaison aux ribosomes. Ces modifications entraînent un haut niveau de résistance (80)(81). On note la présence constante d'une pompe à efflux AcrB qui, par définition, entraîne une sensibilité réduite aux macrolides (82).

Pour les quinolones, le mécanisme de résistance est lui aussi une modification de la cible par mutation des gènes *gyrA* et *gyrB* codant pour l'ADN gyrase et des gènes *parC* et *parE* codant pour la topoisomérase de classe IV (83)(84)(85)(86).

Le NTHi peut persister dans un hôte pendant plusieurs années, entraînant des remaniements génétiques. Durant ce temps, l'exposition aux antibiotiques est un facteur de risque de développement de résistances aux antibiotiques par acquisition ou propagation de matériel génétique. La recombinaison génétique est un mécanisme très fréquent chez *Hinf*. Il possède une capacité naturelle permettant l'absorption d'ADN par une machinerie située au niveau de l'enveloppe cellulaire. Ce mécanisme favorise le passage de courtes séquences d'ADN qui s'intègrent par la suite au génome de la bactérie. Ce phénomène permet une recombinaison accrue entre différentes souches (87)(88)(89). L'échange de mécanismes de résistance est facilité par ce mécanisme notamment pour le transfert du gène *ftsI* (90)(91).

On sait que *Hinf* fait partie du microbiote respiratoire, au sein duquel on retrouve aussi le *Streptococcus pneumoniae* et la *Moraxella catarrhalis*. Ces agents sont responsables des surinfections de BPCO et des OMA.

Le pneumocoque a, lui aussi, vu son épidémiologie changer suite à la mise en place d'une vaccination. Les sérotypes non ciblés par le vaccin ont augmenté (92)(93)(94).

Lors de portages ou d'infections polymicrobiennes, le risque d'échange multilatéral, sans transfert de gène, de mécanismes de résistance est présent. *Moraxella catarrhalis* sécrète des vésicules de membranes externes (OMV) contenant des β -lactamases qui hydrolysent les β -lactamines. Ce mécanisme protège les souches de pneumocoque et de *Hinf* sensibles à ces antibiotiques (95).

De plus, ces OMV contiennent des facteurs de résistance au complément, protégeant les souches de l'immunité de l'hôte (96). Un mécanisme similaire a été observé avec des OMV provenant de *Hinf* commensaux (NTHI). Ces OMV contiennent également des β -lactamases protégeant les *Streptococcus* du groupe A de l'action de l'amoxicilline (97).

1.2.4. Répartition mondiale de la résistance

Au niveau mondial, on note une augmentation des résistances BLPAR et BLNAR (1). Les données de la figure 5 ont été extraites à partir de différentes études (78)(98)(99)(100)(101)(102)(103). Ces deux mécanismes incluent aussi les souches avec une résistance aux céphalosporines.

Dans ces études récentes, la plupart des souches étudiées étaient des NTHi. Initialement, les BLNAR étaient principalement retrouvées au Japon, où la vaccination anti-*Hib* n'a été introduite qu'en 2009. On voit qu'au cours de ces vingt dernières années, les BLNAR se sont propagées dans le monde entier. Le Japon est le pays répertorié avec le plus haut taux de BLNAR, plus de 50 % des souches isolées.

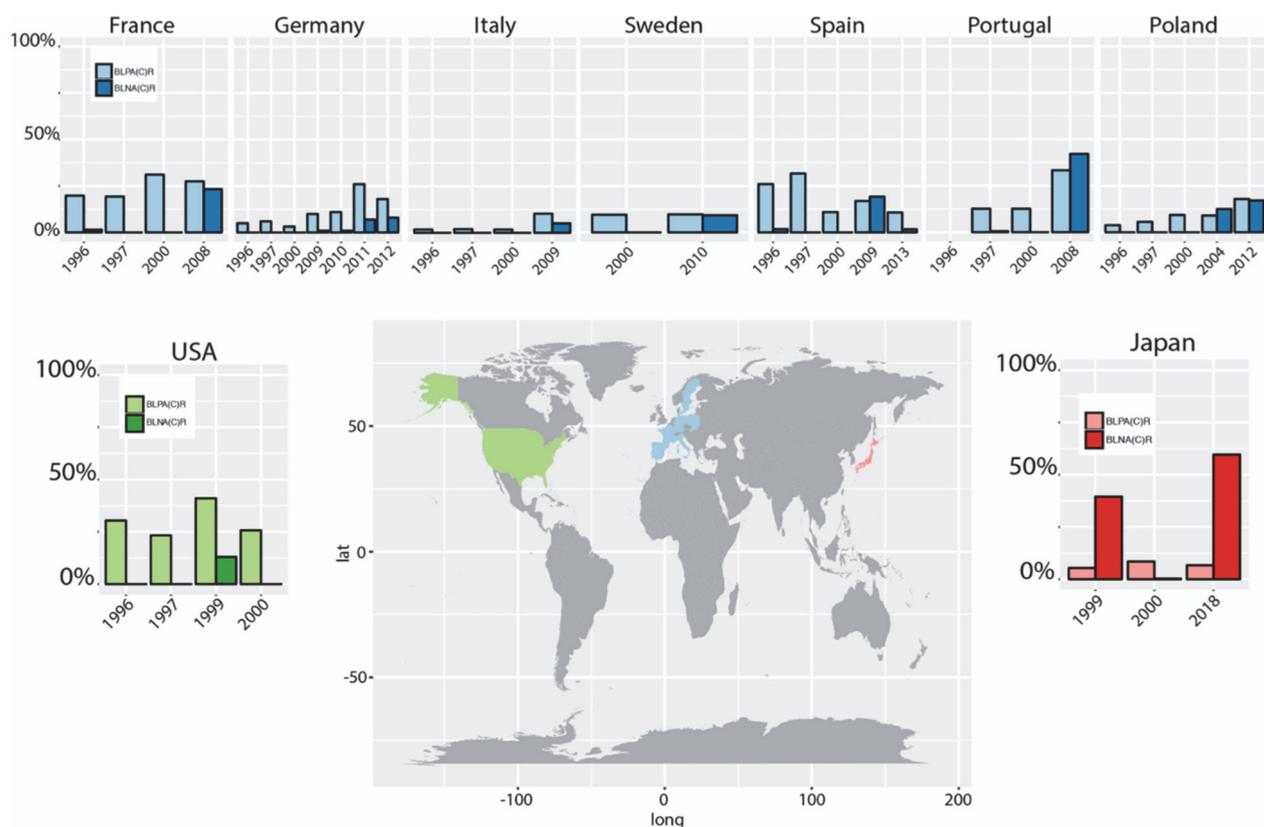


Figure 5. Répartition des mécanismes de résistance dans le monde (1)

Donc, avec l'augmentation du nombre de cas de résistances des NTHi, et compte tenu du nombre limité de données de surveillance de la résistance aux antibiotiques pour NTHi, il est indispensable de documenter la résistance aux antibiotiques des NTHi *via* la réalisation d'un antibiogramme et de biologie moléculaire afin d'en comprendre leurs mécanismes.

1.2.5. Répartition en France

Tous les ans en France, le Centre National de Référence (CNR) *Hinf* caractérise les résistances aux antibiotiques. Ces données se basent sur un réseau de plus de 700 laboratoires de bactériologie.

En 2017, les isolats invasifs (n=138, issus de liquide céphalo-rachidien, d'hémoculture, biopsie osseuse, liquide articulaire, liquide pleural) ont représenté 57 % des isolats reçus au CNR. Parmi les isolats non-invasifs (n=100), 17 % avaient été responsables d'infections génitales ou materno-fœtales, 11 % d'otites moyennes aiguës du jeune enfant et 72 % d'infections respiratoires (104). La plupart des isolats non invasifs étaient non typables (99 %) et cette proportion était significativement moindre parmi les isolats invasifs (75 %).

Le sérotype f était le plus fréquemment observé, mais les sérotypes b et a étaient également présents parmi les isolats invasifs.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont indiqué que 24 % des isolats invasifs étaient résistants à l'ampicilline, mais ce pourcentage était significativement plus élevé (51 %, $p < 0,001$) parmi les isolats non invasifs.

D'après leurs données, on observe un pourcentage de BLPAR de 21 % en 2017. Au sein de ces BLPAR, on ne note pas de différence statistiquement significative entre les isolats invasifs et non invasifs.

De plus, 15 % des souches isolées en 2017 sont de type BLNAR. Au sein de ce groupe, on observe une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) entre la proportion d'isolats invasifs (7 % de BLNAR) et la proportion des isolats non-invasifs (24 % BLNAR). La majorité de ces isolats sont également résistants aux céphalosporines de troisième génération ($\text{CMI} > 0,125 \text{ mg/L}$). Les isolats BLNAR étaient liés à une modification du gène *ftsI* codant pour la protéine de liaison à la pénicilline 3 (PLP3). En particulier, les allèles *ftsI* qui hébergeaient les mutations D350N, S357N, M377I et S385T étaient résistants à l'ampicilline et aux céphalosporines de troisième génération. Ces isolats étaient plus fréquents parmi les isolats non invasifs. La forte proportion de résistance à l'ampicilline par mutation dans le *ftsI* parmi les isolats non invasifs peut suggérer un coût biologique de ces mutations sur la fonction de PLP3 qui peut conduire à une invasion bactérienne plus faible.

Les données pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole montrent un taux de résistance constant d'environ 20 % alors qu'il est de seulement 2 % pour les tétracyclines et les fluoroquinolones. Cependant en 2017, les souches résistantes à la ciprofloxacine étaient toutes isolées dans un contexte d'infections non invasives.

Les souches résistantes à l'amoxicilline et à l'ampicilline représentent donc une proportion importante des souches. Cette proportion est significativement plus importante parmi les souches non invasives.

L'émergence des isolats résistants aux céphalosporines de troisième génération est notable (11 % en France en 2017) et a été signalée dans d'autres pays européens. Ces résultats soulignent la nécessité de maintenir une surveillance et de renforcer le séquençage du gène *ftsI* codant pour la PLP3.

1.3. Épidémiologie - vaccination et évolution de l'incidence

Jusqu'à la fin du XX^{ème} siècle, plus de 95 % des infections invasives étaient causées par les souches *Hinf* encapsulées du sérotype b (Figure 6b). En 1993, la mise en place de la vaccination systématique anti-*Hib* des nourrissons a drastiquement réduit l'incidence des méningites, épiglottites et pneumonies.

Suite à cette vaccination massive et mondiale, l'isolement des souches *Hib* est très rare et on voit l'émergence de nouvelles souches invasives de *Hinf* non encapsulées dites non typables (NTHi) (1). En France, l'incidence des méningites à *Hinf* est passée de 0,6 à 0,08 pour 100 000 habitants/an entre les années 1993 et 2010.

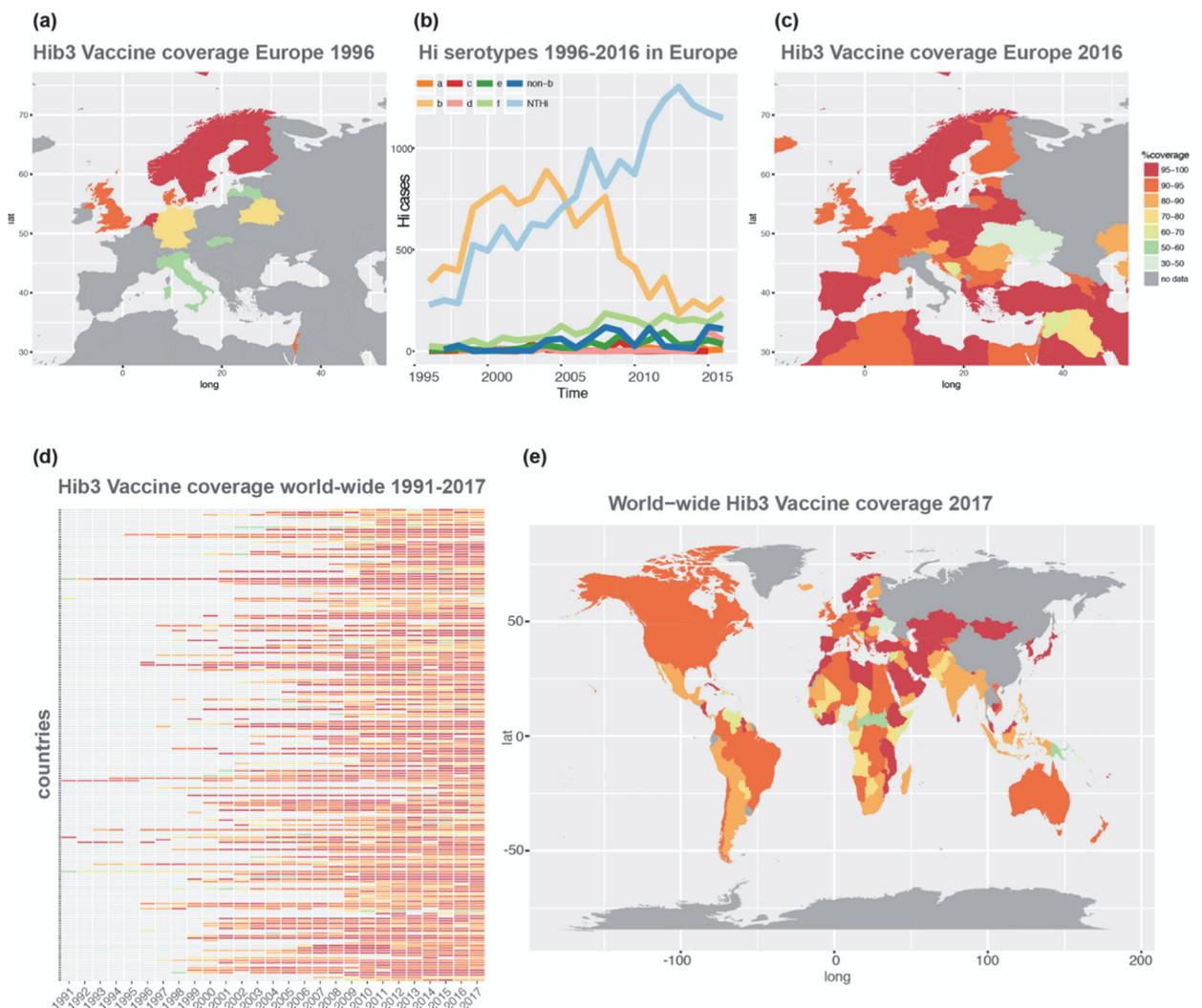


Figure 6. Cartes et graphiques de l'évolution des différents sérotypes par pays (1)
(a) On voit sur cette carte que la couverture vaccinale en 1996 est faible. (b) On note un changement de sérotype au sein des différents pays européens. En 1996 prédominance de *Hib*, en 2016 une majorité de NTHi est isolée. (d) Évolution de la couverture vaccinale mondiale entre 1991 et 2017. (e) La couverture vaccinale mondiale en 2017 est quasi-complète. On peut donc supposer que la quasi-totalité des souches *Hi* isolées sont des NTHi comme le démontrent de nombreuses études.

1.3.1. Généralités

La vaccination est un processus qui consiste à induire une réponse immunitaire adaptative contre des microorganismes. La primo-vaccination peut être complétée par des injections de rappel afin d'obtenir une immunité plus efficace contre l'agent pathogène ciblé.

Le vaccin contre *Hib* est un vaccin conjugué de type inactivé : on retrouve dans sa composition la présence d'antigènes capsulaires polysaccharidiques de *Hib*. Ces antigènes capsulaires entraînent une réponse thymo-indépendante. Ils ne stimulent donc qu'une réponse primaire IgM. De plus, il n'y a pas de réponse chez l'enfant de moins de deux ans. Afin de pallier ce problème, il a été conjugué à l'antigène polysaccharidique une protéine telle que l'anatoxine tétanique. Ce vaccin conjugué permet d'initier une réponse immunitaire thymo-dépendante permettant une immunité dès le plus jeune âge et une mémoire immunitaire prolongée. La réponse IgG protège contre les deux pathogènes.

Donc le vaccin anti-*Haemophilus influenzae* de groupe b est de type conjugué et combiné. On le retrouve dans les vaccins combinés suivants : Infanrix quenta® /Pentavac® (Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Poliomyélite, *Hib*), Infanrix Hexa®/Hexyon®/Vaxelis® (mêmes pathogènes associés à l'hépatite B). Un vaccin monovalent existe, Act-*Hib*®.

1.3.2. Schéma vaccinal

L'article L. 3111-1 du code de la santé publique (CSP) dispose que « la politique de vaccination est élaborée par le ministre chargé de la santé qui fixe les conditions d'immunisation, énonce les recommandations nécessaires et rend public le calendrier des vaccinations après avis de la Haute autorité de santé ».

Les recommandations vaccinales françaises ont été modifiées et depuis le 1^{er} janvier 2018 certains vaccins dont les vaccins contre la coqueluche, les infections invasives à *Haemophilus* de type b, les infections à pneumocoque, l'hépatite B, les infections invasives à méningocoque de séro groupe C, les oreillons, la rubéole et la rougeole sont passés du statut de vaccins recommandés à obligatoires.

Sauf contre-indications, ces vaccins doivent être réalisés dans les 18 premiers mois de la vie tout en respectant le calendrier vaccinal (105). Les enfants ne suivant pas ces recommandations ne pourront pas rentrer en collectivité. On a une réelle prise de conscience collective grandissante de la gravité que peuvent représenter ces pathogènes.

| Vaccins contre : | | Naissance | 2 mois | 4 mois | 5 mois | 11 mois | 12 mois | 16-18 mois | 6 ans | 11 - 13 ans | 15 ans | 16-18 ans |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|--------|--------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------|
| Recommandations générales | Diphtérie (D), Tétanos (T), coqueluche acellulaire (Ca), Poliomyélite (P) ¹ | | DTCaP | DTCaP | | DTCaP | | | DTCaP | | | |
| | <i>Haemophilus influenzae</i> b (Hib) | | Hib | Hib | | Hib | | | | | | |
| | Hépatite B (Hep B) | | Hep B | Hep B | | Hep B | | | | | | |
| | Pneumocoque (PnC) ² | | PnC | PnC | | PnC | | | | | | |
| | Méningocoque C (vaccin conjugué MnC) ³ | | | | MnC | | MnC | | | | | |
| | Rougeole (R), Oreillons (O), Rubéole (R) | | | | | | ROR 1 | ROR 2 | | | | |
| | diphtérie (d), Tétanos (T), coqueluche acellulaire (ca), Poliomyélite (P) ⁴ | | | | | | | | | dTcaP | | |
| Papillomavirus humains (HPV) chez jeunes filles | | | | | | | | | 2 doses (0, 6 mois) : vaccin quadrivalent ou vaccin bivalent ou vaccin neufvalent (11/14 ans) | | | |
| Rattrapage | Hépatite B | | | | | | | 3 doses selon le schéma 0, 1, 6 mois ou, de 11 à 15 ans révolus, 2 doses selon le schéma 0, 6 mois ⁵ | | | | |
| | Méningocoque C (vaccin conjugué) | | | | | | | 1 dose jusqu'à 24 ans ⁶ | | | | |
| | Papillomavirus humains (HPV) chez jeunes filles | | | | | | | | | 3 doses selon le schéma 0, 1, 6 mois ou 0, 2, 6 mois (jeunes filles de 14 ou 15 à 19 ans révolus) selon le vaccin utilisé | | |
| | Rougeole (R), Oreillons (O), Rubéole (R) | | | | | | | | 2 doses à au moins 1 mois d'intervalle si pas de vaccin antérieur ; 1 dose si une seule dose vaccinale antérieure | | | |

Tableau 5. Recommandations du calendrier vaccinal chez les enfants de moins de 18 ans
Les vaccins sur fond bleus sont obligatoires pour les enfants à partir de janvier 2018. Les encadrés verts indiquent une co-administration possible (105)

Le schéma vaccinal contre *Hib* est composé d'une première vaccination à l'aide de deux injections, l'une au 2^{ème} mois et l'autre au 4^{ème} mois de vie. Puis un rappel vaccinal au 11^{ème} mois de vie (105). Cette vaccination s'effectue en combinaison avec les autres vaccins obligatoires.

Il existe de rares échecs de vaccination, notamment dus à des schémas vaccinaux incomplets ou des déficits immuns. Pour les enfants non vaccinés et en contact avec un patient affecté par *Hib*, une chimioprophylaxie est indispensable. La molécule de choix est la rifampicine (10mg/kg/j en une prise par jour pendant 4 jours).

1.3.3. Vaccin et phénotypes

Les souches capsulées principalement restantes sont de sérotypes f et e (106). Bien que maintenant rare, Hib reste le plus délétère des sérotypes chez le jeune enfant (6 mois à 2 ans). Le sérotype a (*Hia*) possède une virulence proche de *Hib* (107) et est à l'origine d'infections ayant une gravité quasi-similaire. Il est rarement retrouvé en France métropolitaine, mais sa prévalence n'est pas à négliger dans certaines populations autochtones (Amérique du Nord, Australie, Amérique amazonienne, Océan Indien).

A contrario, les sérotypes c et d ne sont quasiment jamais isolés y compris en portage (108). Il a été décrit au Brésil entre les années 1984 et 1993 l'apparition d'un clone d'*Hinf*

non capsulé (*Hinf* du biogroupe *aegyptus*). Cette souche à la virulence considérable est responsable de tableaux de *purpura fulminans* à point de départ conjonctival, sans atteintes méningées, et une mortalité atteignant 70 % chez le jeune enfant.

Dans l'ère post-vaccinale, NTHi est la souche la plus fréquente causant des infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, des otites ainsi que des surinfections de BPCO (109)(110).

1.3.4. Vers un vaccin anti-NTHi ?

La réalisation d'un vaccin permettrait de diminuer la prévalence des infections respiratoires causées par les NTHi (11). La prévention des infections respiratoires aiguës à NTHi peut être réalisée, d'une part, par modulation de l'adhésion, de l'invasion et de la prolifération bactérienne. D'autre part, le traitement d'une infection chronique exige une stratégie de modulation de la réponse immunitaire (111).

La prévention des infections à NTHi est basée sur des mécanismes humoraux et cellulaires de l'immunité innée. Ces facteurs ont été traités pour certains dans la partie sur les facteurs de virulences. Ces mécanismes semblent être des pistes fiables afin d'étudier leurs modulations et la potentielle création d'un vaccin anti-NTHi (111).

Des essais randomisés ont été réalisés chez des patients adultes ayant des infections chroniques des voies respiratoires supérieures. L'objectif était d'induire une immunité post-vaccinale permettant de diminuer la fréquence des bronchites chroniques à partir d'un vaccin anti-NTHi vivant, atténué, administré par voie orale (112)(113)(114)(115). Ces études ont montré une protection partielle contre la bronchite. Le critère de jugement de l'étude était la diminution de la quantité de portage de NTHi.

Une protection contre les infections aiguës a été démontrée au cours des trois mois suivant la vaccination (112)(115). Cependant, à l'exception d'une étude (114), la surveillance des patients n'a pas été prolongée plus de trois mois. Dans cette étude de Lehmann *et al*, on a observé une efficacité protectrice durant les neuf mois de surveillance post-vaccination. Devant ces résultats, il est indispensable que d'autres études soient réalisées afin de déterminer l'efficacité réelle de la protection respiratoire à long terme de cette vaccination orale.

La recherche de ce vaccin anti-NTHi reste encore un long chemin car il ne faut pas oublier que cette bactérie fait partie du microbiote de voies respiratoires supérieures. Ainsi, les conséquences d'une modulation de ce dernier sont peu connues.

2. Partie 2 : L'étude

2.1. Matériel et méthodes

Notre étude s'intéresse à l'épidémiologie des *Haemophilus influenzae* isolés à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM). La base de données utilisée pour l'extraction des données est celle du laboratoire de microbiologie de l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection. Les critères d'infections à *Hinf* décrits par l'Union Européenne (U.E.) ont été utilisés pour définir nos cas (116) :

- Une infection invasive à *Hinf* (méningite, bactériémie, IOA) est confirmée par l'isolement de la bactérie au laboratoire à partir d'un site normalement stérile. La méthode utilisée dans notre étude est l'isolement de la bactérie par culture. Selon les critères de l'U.E., une méthode de détection d'acides nucléiques à partir d'un site stérile est utilisable.
- Pour les pneumopathies à *Hinf*, qui sont elles aussi des infections invasives, les critères sont les suivants : culture quantitative positive à partir d'un prélèvement respiratoire bas (Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA) $\geq 10^4$ UFC, aspiration bronchique et brosse bronchique $\geq 10^4$ UFC, crachat $\geq 10^7$ UFC, liquide pleural avec culture positive). Pour l'ensemble de ces patients, nous avons retrouvé au moins un signe clinique et/ou radiologique : toux, dyspnée, tachypnée, fièvre, expectorations purulentes, lésion pulmonaire à la radio ou au scanner. Ces données ont été extraites du logiciel patient aXigate[®].
- Une infection ostéo-articulaire (IOA) à *Hinf* est définie selon les critères de l'U.E. par l'isolement de la bactérie en culture à partir d'un prélèvement d'os ou de liquide articulaire.
- Les otites à *Hinf* sont définies selon les critères de l'U.E. par l'isolement de la bactérie à partir d'un prélèvement local (otite externe : drainage purulent du conduit auditif ; otite moyenne : liquide de paracentèse). L'isolement de la bactérie doit être associé à de la fièvre et/ou une otalgie.
- Les sinusites à *Hinf*, quant à elles, sont définies par l'isolement de la bactérie à partir d'un prélèvement purulent issu d'une cavité sinusienne.

L'identification de l'espèce bactérienne à partir des colonies est réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (117).

Sélection et préparation des datas

Nous avons analysé de façon transversale les données traitant des infections invasives et non invasives à *Haemophilus influenzae* à l'AP-HM du 1^{er} janvier 2014 au 31 décembre 2019 inclus. Les données ont été extraites sous forme de tableaux à partir du logiciel NexLabs® (logiciel de validation et d'extraction de données du laboratoire).

Ces données de base regroupaient l'ensemble des *Hinf* isolés en culture à l'IHU à partir de tous types de prélèvements (n=4116). Les doublons ont été supprimés en se basant sur le numéro de séjour du patient à l'hôpital (n=1053). Nous avons retiré un patient pour lequel le type de prélèvement n'était pas précisé.

De plus, nous avons exclu les patients pour lesquels la bactérie était retrouvée dans des prélèvements non pertinents pour notre étude (n=1439) : abcès, tissus mous, prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, écouvillons, cornées, ganglions, gastriques, liquides de drains, matériels, pharynx, placentas, prélèvements urétraux, prélèvement organes génitaux internes, spermes, urines, prélèvements vaginaux.

Nous avons analysé 1623 patients pour lesquels *Hinf* a été retrouvé dans un prélèvement d'intérêt : hémocultures, LCR, LBA, aspirations bronchiques, crachats, liquides pleuraux, liquides articulaires, os, conduits auditifs externes, liquides de paracentèses, biopsies de sinus.

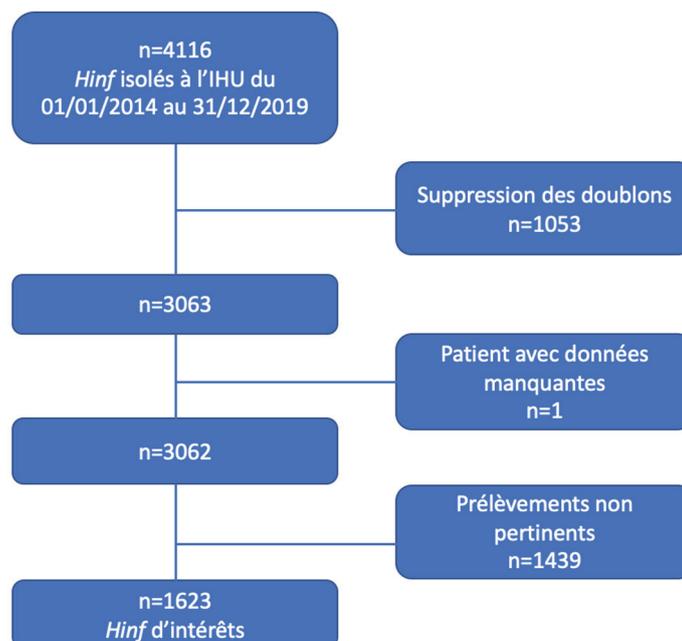


Figure 7. Flowchart de sélection des patients de notre étude

Nous avons extrait les données suivantes : âge, sexe, source de l'infection (type de prélèvement), nombre de cas par année, sensibilité aux antibiotiques, porte d'entrée des bactériémies, des méningites et des IOA, mortalité à 2 semaines des infections invasives.

Les prélèvements ont été regroupés afin d'obtenir deux groupes, les infections invasives et les infections non invasives. Dans les infections invasives, on regroupe les bactériémies (hémocultures) ; les méningites comprenant les LCR ; les pneumopathies comprenant les LBA, aspirations bronchiques, crachats, liquides pleuraux ; et les IOA comprenant les liquides articulaires et les os. Dans les infections non invasives, on regroupe les sinusites comprenant les biopsies de sinus ; les otites comprenant les prélèvements de conduits auditifs externes et les liquides de paracentèses.

Nous avons regroupé les patients par classes d'âge : < 1 an, 1-4 ans, 5-19 ans, 20-39 ans, 40-59 ans et > 60 ans. Ces classes d'âge ont été déterminées par rapport à l'épidémiologie rencontrée vis-à-vis de ce pathogène. De plus, nous avons typé les souches d'*Hinf* afin de définir l'appartenance au sérotype b ou non de ces dernières.

L'analyse des données

Nous nous sommes intéressés au nombre de cas par années et par classe d'âge, à la répartition homme/femme en fonction des classes d'âge et aux types d'atteintes en fonction des classes d'âges. Nous nous sommes également intéressés aux infections à *Hinf* en fonction du temps, aux différentes portes d'entrées des bactériémies, méningites et IOA et à la mortalité des infections invasives à *Hinf*. De plus, nous avons déterminé le sérotype de nos souches par PCR (*Hib* ou non). Les tests du Khi-Deux ont été réalisés lorsqu'appropriés à l'aide de la plateforme Openepi (118). Le risque α est fixé à 0,05.

Typage

Les souches d'intérêts, après ensemencement sur gélose, ont été identifiées comme *Hinf* par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Après chaque identification, les souches sont conservées à l'aide de cryovials stockés dans des biobanques à -80° C. Une partie de notre travail a été de rassembler rétrospectivement toutes ces souches ; 310 des 1623 souches ont été retrouvées, soit 19 %. Ce pourcentage s'explique par une mise en place non systématique de la cryobanque des souches au laboratoire, qui diffère en fonction de la nature des échantillons. Les prélèvements respiratoires représentaient 82,3 % des souches retrouvées ; les hémocultures représentaient 16,1 % ; et les LCR 1,6 %.

Une fois rassemblées, les 310 souches ont été analysées par PCR en temps réel afin d'identifier si elles étaient de type b ou non. Pour ce faire, deux étapes ont été mises en place.

Tout d'abord, une étape d'extraction de l'ADN est mise en œuvre à partir des cryotubes car les souches remises en culture n'étaient pas viables. Cette phase d'extraction a été réalisée à l'aide de l'automate King Fischer et du kit NucleoMag® Pathogen. Ce dernier est conçu pour l'isolement de l'ADN bactérien à partir de fluides non cellulaires (150 µL). La technique utilisée est basée sur l'adsorption réversible d'acides nucléiques sur des billes magnétiques dans des conditions tampons adaptées. La lyse de l'échantillon est réalisée par incubation avec un tampon de lyse NPL1 (150 µL) contenant des ions chaotropiques et soutenus par la digestion à la protéinase K (15 µL). Pour la liaison des acides nucléiques aux billes magnétiques, le tampon de liaison NPB2 et les billes sont ajoutés au lysat. Après la séparation magnétique, les billes sont lavées pour éliminer les contaminants et les sels à l'aide de tampons de lavage NPW3, NPW4, et 80 % d'éthanol. L'éthanol résiduel provenant des étapes de lavage précédentes est éliminé par séchage à l'air. Enfin, l'ADN pur est élué avec une zone tampon à faible teneur en sel. A la fin de l'extraction, on obtient 80 µL d'ADN purifié.

Par la suite, nous avons réalisé différentes PCR en temps réel (qPCR) : PCR *Haemophilus influenzae* b, *Haemophilus influenzae*, T4. Les deux PCR ciblant *Hinf* et T4 ont servi de témoins d'extraction de l'ADN. La PCR *Hinf* cible le gène *ompP* et permet de confirmer le résultat du MALDI-TOF (119).

Notre PCR d'intérêt, *Hinf* b, cible le gène *bcs3* (62). Nous avons utilisé une souche de type b analysée par le Centre National de Référence (CNR) des *Hinf* comme témoin positif (T+). Cette dernière a été diluée au 1/1000^{ème} afin de ne pas contaminer les plaques de PCR. Les réactions d'amplification d'acides nucléiques ont toutes été réalisées sur le LightCycler® 480 Instrument de Roche.

Test de Sensibilité aux antibiotiques

Nous avons évalué la sensibilité des antibiotiques suivants : amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ceftriaxone, gentamicine et l'acide nalidixique. Pour ce faire, un antibiogramme a été réalisé pour chacune de nos souches. La méthode utilisée est la diffusion en milieu solide sur gélose MH-F. La production de β-lactamase a été déterminée par le test à la Céfinase. Pour toutes les souches ayant une détection de résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique *via* le diamètre d'inhibition, une CMI amoxicilline-acide

clavulanique par bandelette a été réalisée. Le but de ces tests est d'analyser les mécanismes de résistance aux β -lactamines.

Concernant les bêta-lactamines, les phénotypes de résistance ont été classés comme suit :

- Sauvage : amoxicilline sensible, amoxicilline-acide clavulanique sensible et céfinase négative
- BLPAR : amoxicilline résistante, amoxicilline-acide clavulanique sensible, céfinase positive
- BLNAR : amoxicilline et amoxicilline-acide clavulanique résistants, céfinase négative
- BLPACR : amoxicilline et amoxicilline-acide clavulanique résistants, céfinase positive

Nous avons exclu 2 de nos 1623 souches car l'antibiogramme n'a pas été réalisé. Nous avons donc analysé 1621 souches.

2.2. Résultats

De 2014 à 2019, on observe 1623 infections d'intérêts à *Hinf* à l'AP-HM.

Age et sexe

Sur nos 1623 cas, 646 (39,8 %) ont > 60 ans, 433 (26,7 %) ont entre 40-59 ans, 183 (11,3 %) ont entre 20-39 ans, 142 (8,7 %) ont entre 5-19 ans, 139 (8,6 %) ont entre 1-4 ans et 80 (4,9 %) ont < 1 an (Tableau 6).

Pour tous types d'infections confondues, les deux classes d'âge les plus touchées sont les 40-59 ans et les > 60 ans en opposition aux < 1 an qui sont les moins touchés. Nous remarquons que le nombre de cas est supérieur chez les adultes (> 20 ans) (Khi-Deux, $p=0,0005455$; $\alpha=0,05$).

Les hommes représentent 1042 cas (64,2 %) et les femmes 581 (35,8 %). Le sex-ratio H/F est de 1,37 pour les < 1 an, 1,24 pour les 1-4 ans, 1,33 pour les 5-19 ans, 1,29 pour les 20-39 ans, 1,88 pour les 40-59 ans, 2,37 pour les > 60 ans et 1,8 pour l'ensemble de nos cas.

Il existe une liaison statistiquement significative entre le genre et les classes d'âge (Khi-Deux, $p\text{-value}= 0,0001794$; $\alpha=0,05$). Nous remarquons alors que dans le groupe des > 60 ans, un homme est plus à risque d'avoir une infection invasive à *Hinf* qu'une femme (Khi-Deux, $p= 0,00005200$; $\alpha=0,05$).

| Classes d'âge (en année) | Féminin | Masculin | Total général |
|-----------------------------|------------|-------------|---------------|
| < 1 | 34 | 46 | 80 |
| 1 - 4 | 62 | 77 | 139 |
| 5 - 19 | 61 | 81 | 142 |
| 20 - 39 | 80 | 103 | 183 |
| 40 - 59 | 151 | 282 | 433 |
| > 60 | 193 | 453 | 646 |
| Total général | 581 | 1042 | 1623 |

Tableau 6. Répartition du nombre de cas par genre et par classe d'âge

Incidence

En 2014, on observe 0,45 % de prélèvements positifs à *Hinf* contre 0,57 % en 2019. On note une augmentation du pourcentage de prélèvements positifs à *Hinf* statistiquement significative entre 2014 et 2019 (Khi-Deux, p-value=0,004818 ; $\alpha=0,05$).

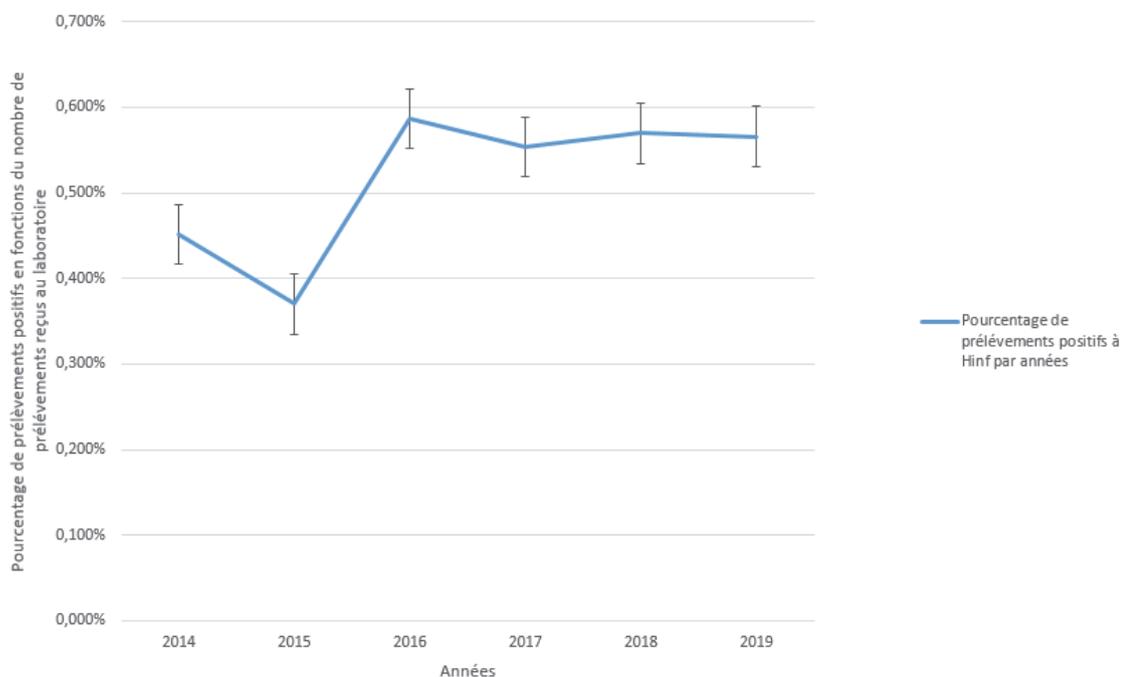


Figure 8. Courbe du nombre de prélèvements positifs à *Hinf* rapporté au nombre de prélèvements positifs au laboratoire en fonction du temps

Si on regarde le nombre de prélèvements positifs à *Hinf* en fonction des années et du type de pathologies, nous observons que l'augmentation de l'incidence n'est pas la même en fonction des entités cliniques. En effet, entre 2014 et 2019, elle est de + 38 % pour les pneumopathies, + 300 % pour les méningites, + 114 % pour les bactériémies et de + 135 % pour les sinusites.

Pour les otites, nous notons une diminution de 36 % entre 2014 et 2019. Pour les IOA, nous n'avons pas eu assez de cas pour noter une différence significative.

En résumé, toutes les infections impliquant *Hinf* ont vu leurs fréquences augmenter entre 2014 et 2019 hormis les otites qui ont vu leurs fréquences diminuer.

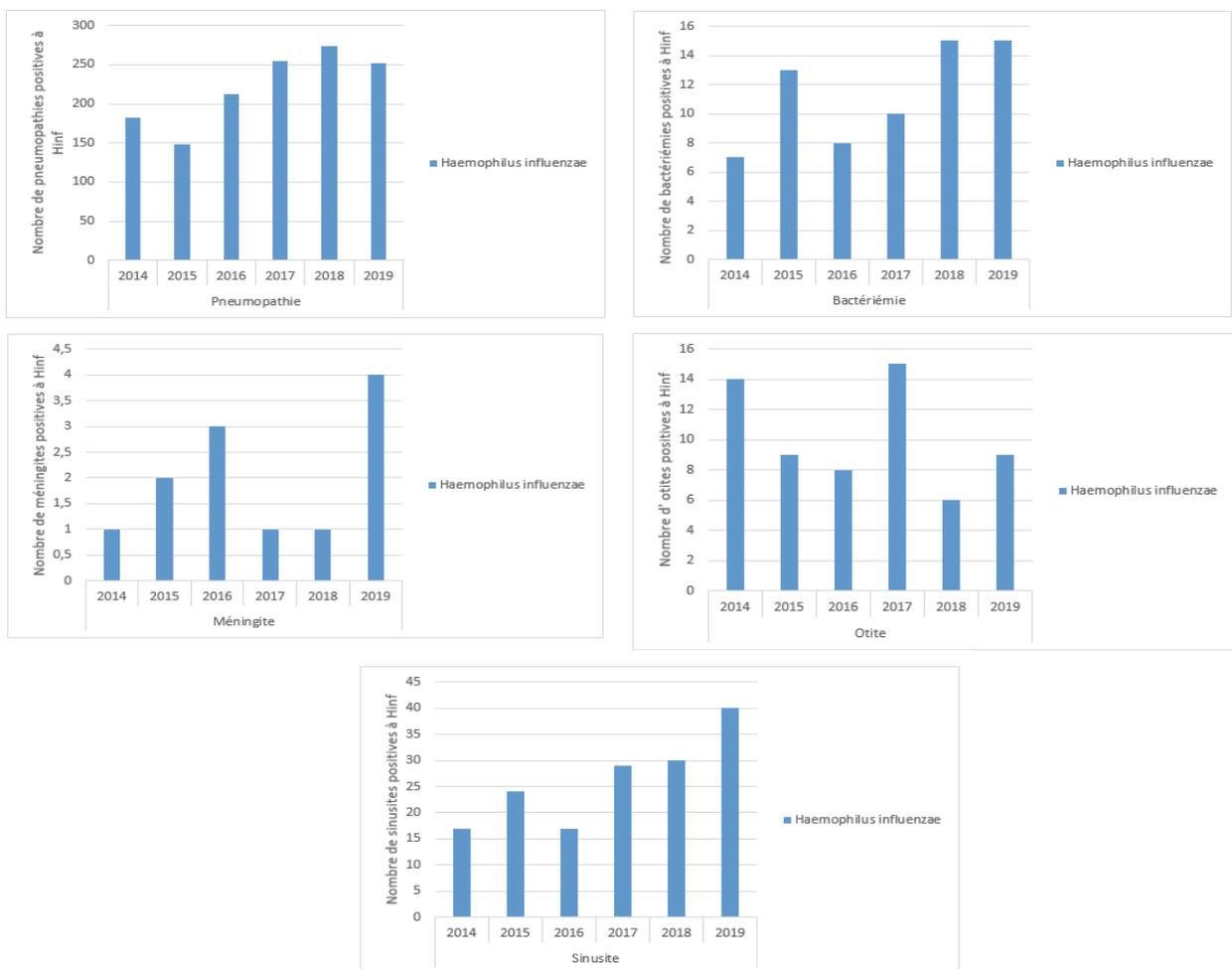


Figure 9. Histogramme du nombre de cas en fonction des années

Comme évoqué plus haut, les deux classes d'âge les plus touchées sont les 40-59 ans et les > 60 ans. Au cours du temps, au sein d'une même classe d'âge, on ne note pas de différence du nombre de cas, hormis dans la classe d'âge des > 60 ans pour laquelle on observe une augmentation des cas entre 2014 et 2019 (Figure 10).

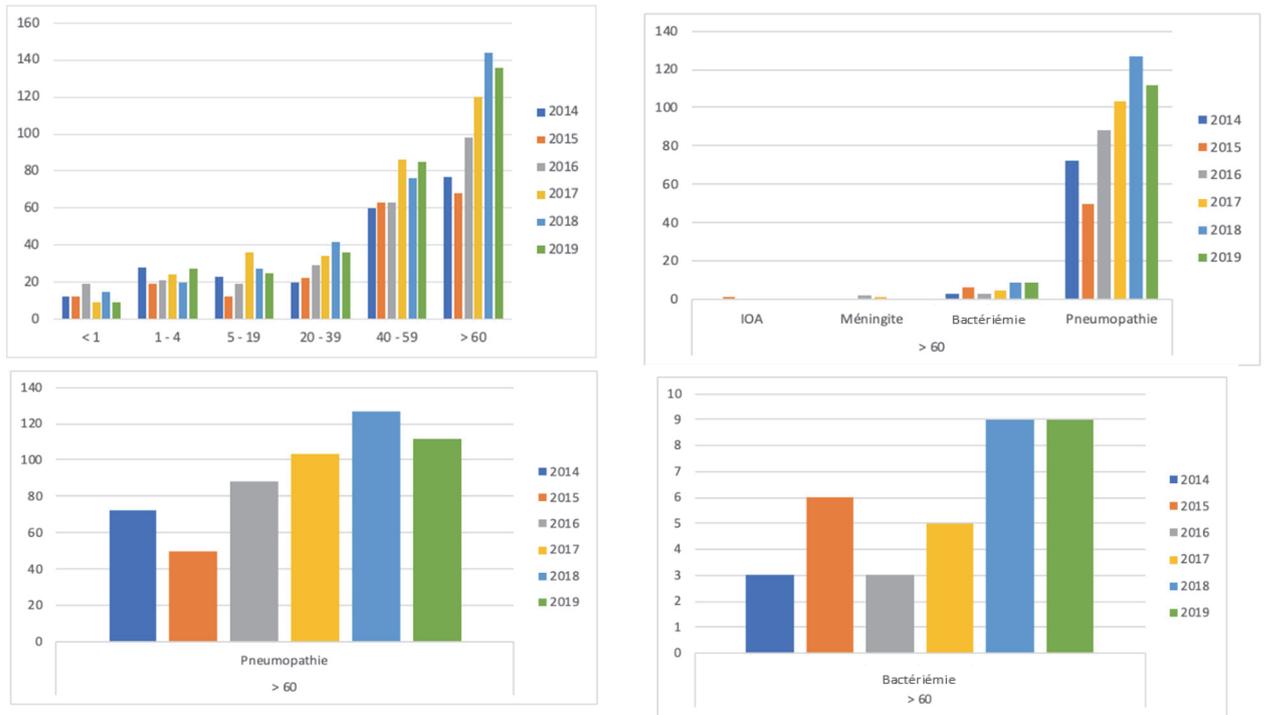


Figure 10. Histogramme du nombre d'infections à *Hinf* en fonction des classes d'âge et du temps

Cette augmentation du nombre de cas d'infections invasives chez le > 60 ans est due à l'augmentation du nombre de pneumopathies.

Présentation clinique

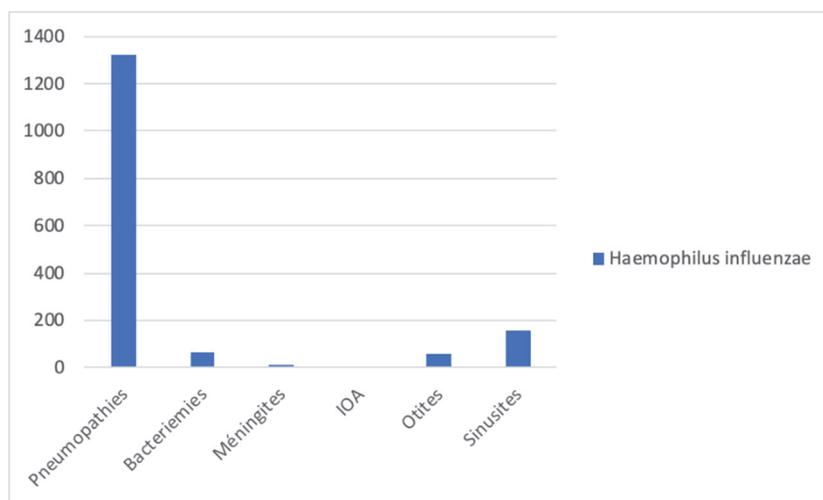


Figure 11. Histogramme de la répartition du nombre de cas d'infections à *Hinf* en fonction du type d'atteinte

La présentation clinique est connue pour l'ensemble de nos 1623 patients. La répartition des atteintes cliniques est la suivante : pneumopathies (81,4 %), sinusites (9,7 %), bactériémies (4,2 %), otites (3,8 %), méningites (0,7 %) et les IOA (0,2 %). La pneumopathie est la présentation clinique la plus fréquente dans toutes les classes d'âge (120)(121).

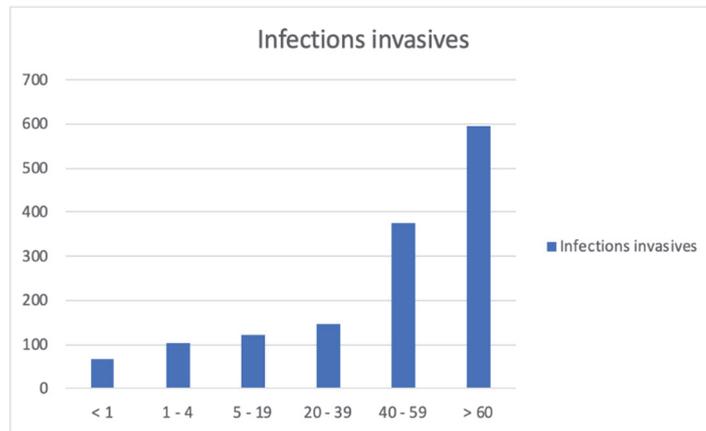


Figure 12. Histogramme du nombre d'infections invasives à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

Dans le groupe des infections invasives, nous voyons une augmentation croissante du nombre de cas en fonction de la classe d'âge. Le groupe des < 1 an représente 4,7 % des infections invasives, les 1-4 ans représentent 7,4 %, les 5-19 ans représentent 8,6 %, les 20-39 ans représentent 10,4 %, les 40-59 ans représentent 26,6 % et les > 60 ans représentent 42,3 %. Nous notons alors une différence de 800 % entre le groupe > 60 ans et < 1 an.

Nous mettons en évidence une cassure dans la courbe à partir de la classe 40-59 ans. Nous observons que le nombre de cas d'infections invasives à *Hinf* est plus élevé à partir de 60 ans par rapport aux autres classes d'âge (Khi-Deux, p-value= 0,00000023 ; $\alpha=0,05$).

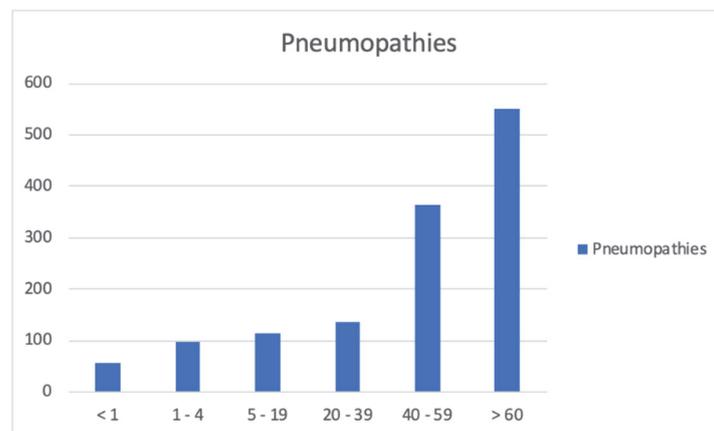


Figure 13. Histogramme du nombre de pneumopathies à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

Au sein des pneumopathies, on retrouve cette même cassure. Pour cette atteinte, la classe d'âge la plus touchée est celle des > 60 ans (Khi-Deux, p-value= 0,0007599 ; $\alpha=0,05$). Cette dernière représente 41,8 % des pneumopathies de notre étude. En parallèle, c'est ce groupe-là qui est aussi le plus touché dans les bactériémies et les méningites représentant respectivement 51,5 % et 41,7 %.

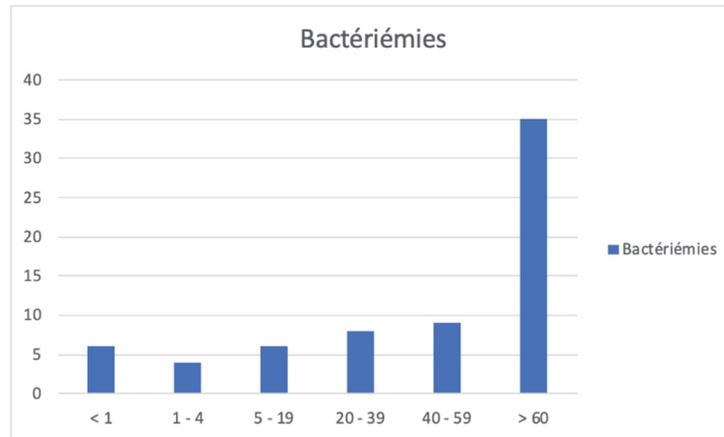


Figure 14. Histogramme du nombre de bactériémies à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

Néanmoins, pour le groupe des bactériémies, la cassure est plus tardive. Le nombre de cas augmente uniquement dans la classe d'âge des > 60 ans (Khi-Deux, p-value= 0.04463; $\alpha=0.05$).

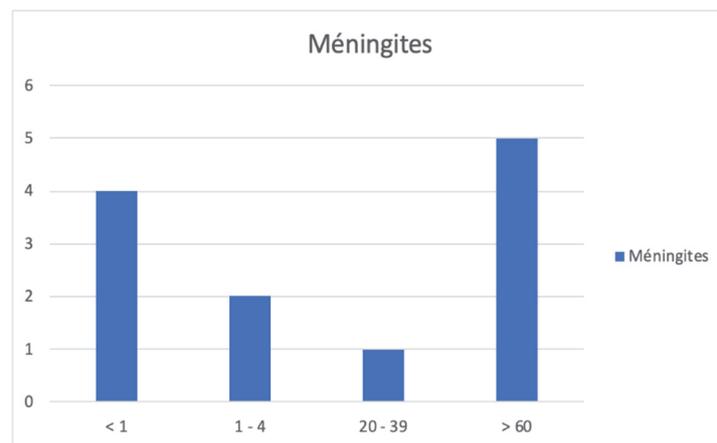


Figure 15. Histogramme du nombre de méningites à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

Pour le groupe des méningites, on observe une courbe en V avec un regroupement des cas aux âges extrêmes de la vie : < 4 ans et > 60 ans. Nous ne notons pas de différence entre la classe d'âge des 1-4 ans et celle des > 60 ans. Il n'a pas été répertorié de cas dans les classes des 5-19 ans et 40-59 ans.

Pour le groupe des IOA, nous retrouvons 1 patient dans la classe d'âge des 5-19 ans et 2 patients dans la classe d'âge des > 60 ans.

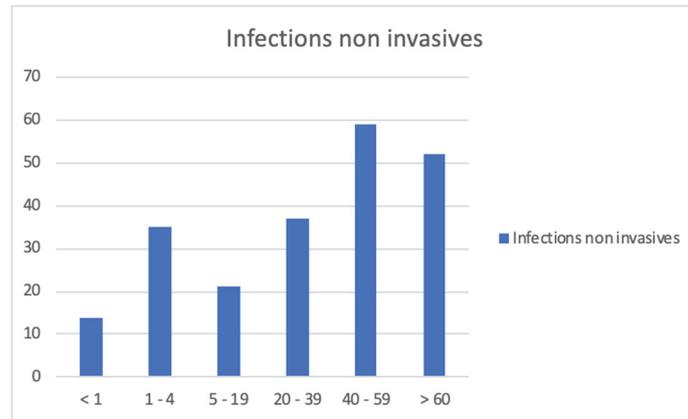


Figure 16. Histogramme du nombre d'infections non invasives à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

Dans le groupe des infections non invasives, nous voyons deux pics : l'un dans la classe d'âge des 1-4 ans et l'autre dans la classe d'âge des 40-59 ans. En analysant ces deux pics, on remarque que celui du groupe des 1-4 ans correspond à des otites et que celui des 40-59 ans correspond à des sinusites. Pour ces dernières, la différence entre les 40-59 ans et les > 60 ans est faible.

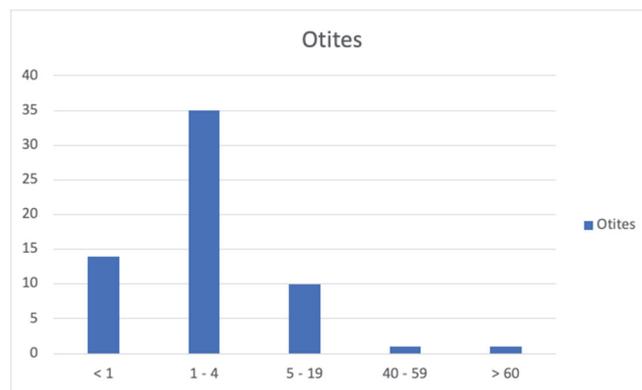


Figure 17. Histogramme du nombre d'otites à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

Dans le groupe des otites, les classes d'âge 40-59 ans et > 60 ans ne sont quasiment pas touchées tandis que les < 1 an, 1-4 ans et 5-19 ans sont les plus touchées. Nous notons le plus haut taux d'otites dans le groupe des 1-4 ans, il représente 60 % de cette atteinte. Nous mettons en avant un plus haut pourcentage d'otites chez les < 19 ans, 96,7 %, *versus* 3,3 % chez les > 19 ans.

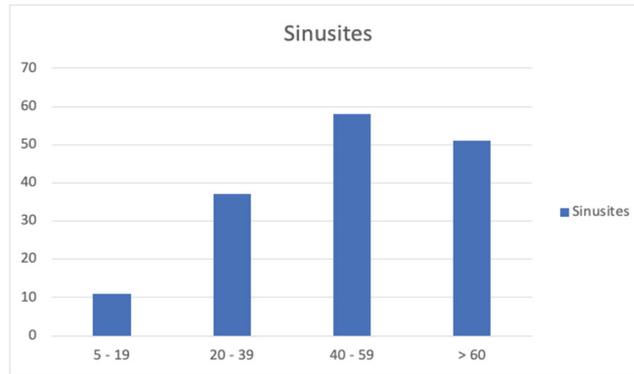


Figure 18. Histogramme du nombre de sinusites à *Hinf* en fonction de la classe d'âge

A contrario, pour les sinusites, nous voyons qu'il n'y a pas de documentation microbiologique pour les < 5 ans, tandis que les > 40 ans représentent 69,4 % de cette atteinte.

Pour les infections non invasives, nous observons donc que notre population est touchée à différentes classes d'âge en fonction de l'atteinte clinique.

Le groupe des > 60 ans est touché pour les sinusites et très peu pour les otites.

Portes d'entrée des bactériémies, méningites et IOA

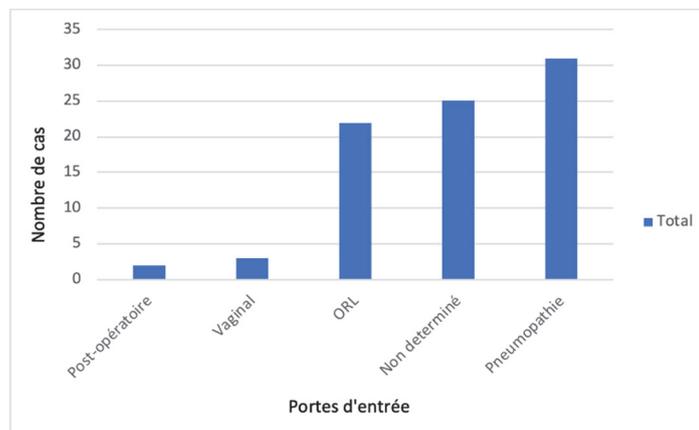


Figure 19. Histogramme du nombre de cas en fonction des portes d'entrée

Nous observons différentes portes d'entrée pour les bactériémies, méningites et IOA qui sont les suivantes : post-opératoire (2,4 %), vaginale (3,6 %), ORL (26,5 %) et pneumopathie (37,3 %). Les portes d'entrée ORL regroupent les abcès pharyngés, les angines, les brèches ostéoméningées, les cellulites, les otites (moyennes aiguës et externes), les laryngites, les mastoïdites et les sinusites. Sur l'ensemble de ces affections, 30,1 % sont restées sans portes d'entrée évidentes. Au sein de ce groupe porte d'entrée indéterminée, on retrouve 2 méningites et 23 bactériémies.

Nous observons des portes d'entrée post-opératoires entraînant des IOA pour 2 patients différents. Nous retrouvons une porte d'entrée vaginale pour 3 bactériémies. Nous avons 22 portes d'entrée ORL correspondant à 12 bactériémies, 9 méningites et 1 IOA. Nous avons 31 portes d'entrée de type pneumopathie correspondant à 30 bactériémies et 1 méningite.

Mortalité

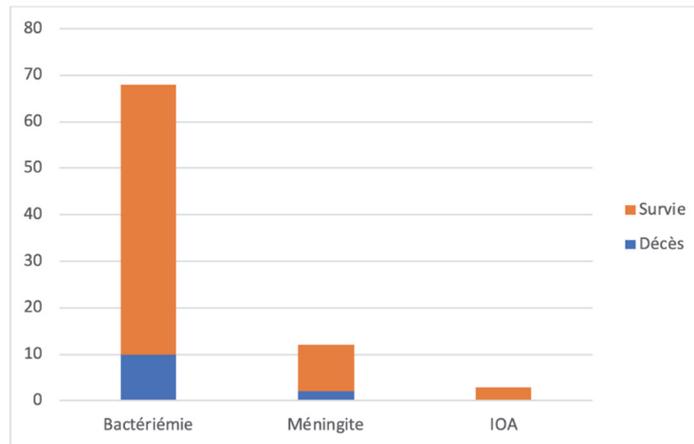


Figure 20. Histogramme de la répartition du nombre de décès et de survie en fonction du type d'affection

Nous avons imputé la mortalité à *Hinf* lorsqu'on retrouvait la bactérie au laboratoire dans les 15 jours qui précèdent la mort. Si nous regroupons les bactériémies, les méningites et les IOA, la mortalité globale est de 14,5 %. Au sein des bactériémies, la mortalité est de 14,7 %, alors qu'elle est respectivement de 16,7 % et de 0 % pour les méningites et les IOA.

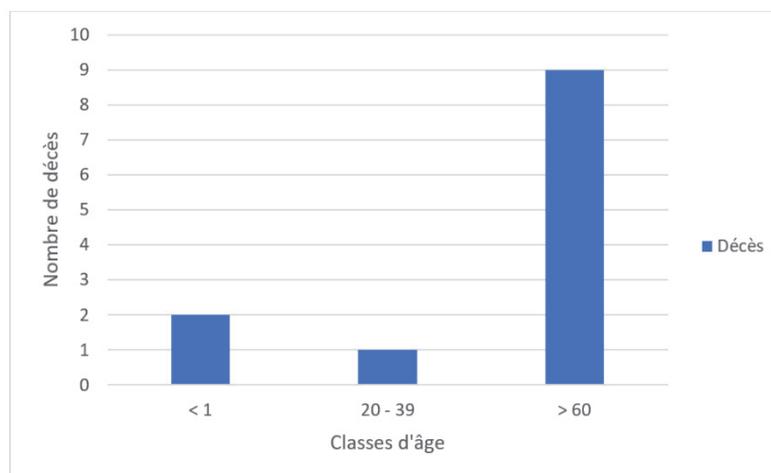


Figure 21. Histogramme de la répartition du nombre de décès en fonction des classes d'âge

Si nous nous intéressons à la répartition des morts en fonction des classes d'âge, nous observons : 21,4 % de mortalité pour les > 60 ans, 20 % pour les < 1 an et 11,1 % pour les 20-39 ans. Il n'y a pas de décès dans les groupes des 1-4 ans, 5-19 ans et 40-59 ans.

Dans le groupe des patients décédés de > 60 ans, on retrouve 8 bactériémies et 1 méningite. Dans le groupe des patients décédés de < 1 an, on retrouve 1 bactériémie et 1 méningite. Dans le groupe des 20-39 ans, on retrouve 1 bactériémie.

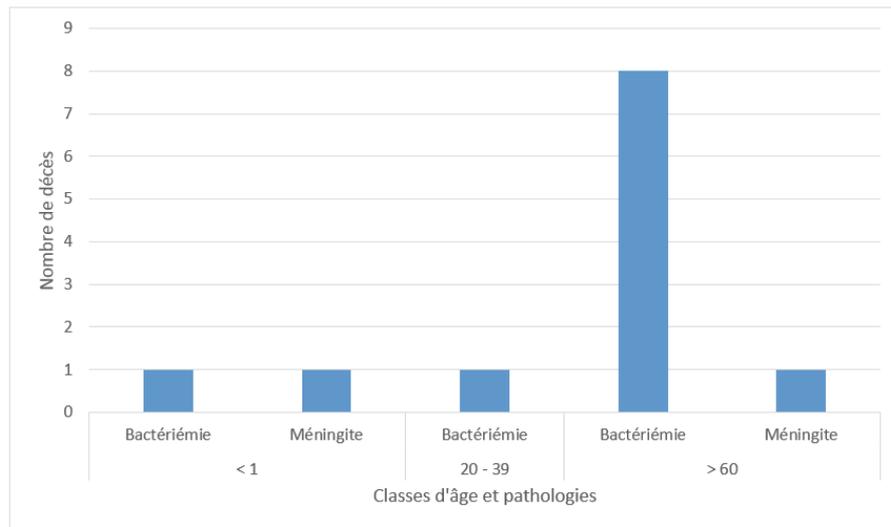
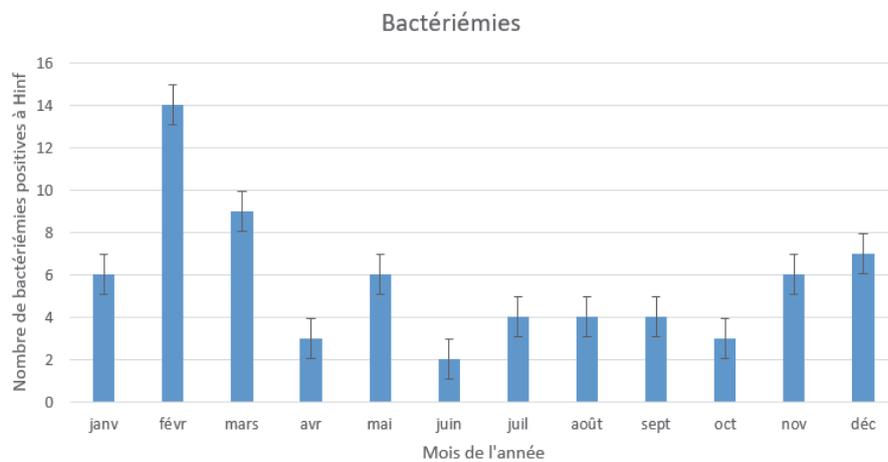
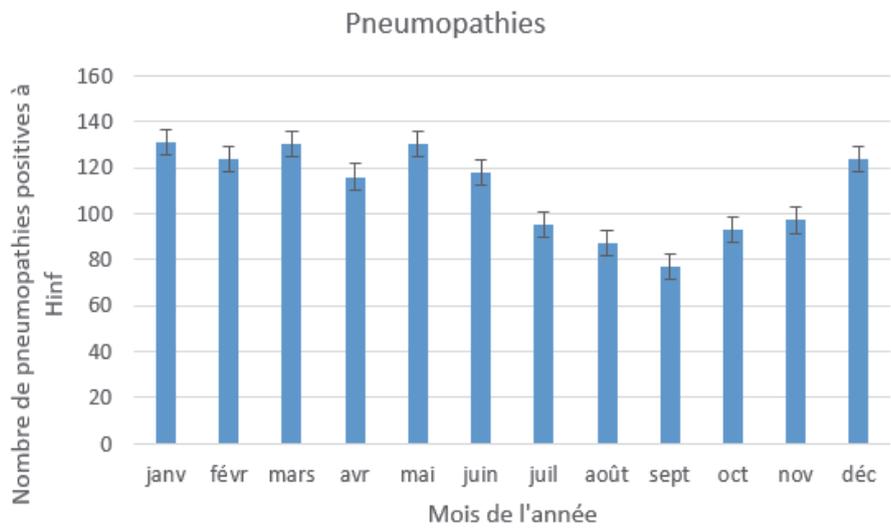
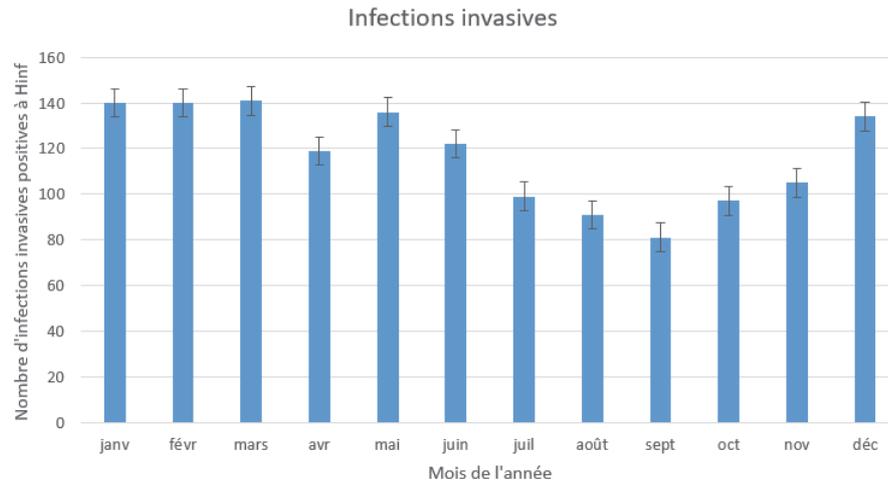


Figure 22. Histogramme de la répartition du nombre de décès en fonction des classes d'âge et des pathologies

Suite à l'étude des dossiers cliniques des patients décédés et après analyse par un médecin extérieur à l'étude, nous pouvons exclure 4 bactériémies dont le contexte écarte la mortalité directe par *Hinf*. Après ré-analyse des données, la mortalité globale est de 9,6 % et celle des bactériémies diminue à 8,8%. Nous observons que les deux classes d'âge les plus touchées par la mortalité sont les < 1 an et les > 60 ans. Les méningites représentent le taux de mortalité le plus élevé devant les bactériémies avec respectivement 16,7 % et 8,8 %. Nous remarquons que la mortalité des bactériémies est supérieure chez les > 60 ans par rapport aux < 1 an. Nous avons donc une supériorité de la mortalité pour les > 60 ans ayant une bactériémie.

Saisonnalité



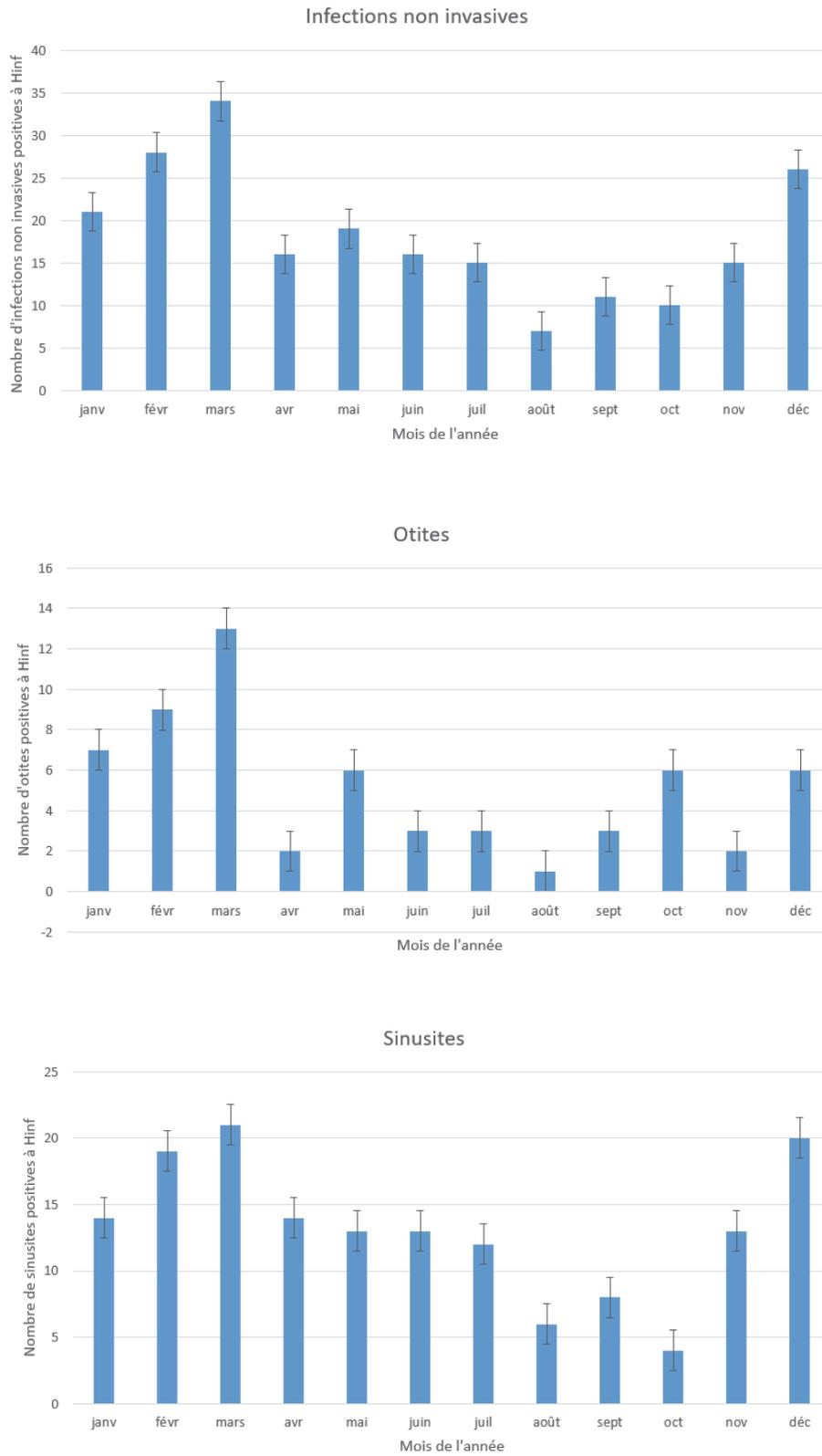


Figure 23. Histogrammes du nombre d'infections à *Hinf* en fonction des mois de l'année

Pour les infections invasives et non invasives, nous constatons que la courbe du nombre de cas est stable en hiver, diminue au printemps et en été puis remonte à l'automne jusqu'à retrouver le plateau hivernal. Nous remarquons alors une saisonnalité dans l'évolution des infections à *Hinf* avec une prédominance des infections en hiver.

Sensibilité aux antibiotiques

Parmi l'ensemble de nos souches, 74,7 % sont de type sauvage vis-à-vis des β -lactamines, 20,4 % de type BLPAR, 2,1 % de type BLPACR et 1,5 % de type BLNAR. D'après nos données, on retrouve une classe de souche avec le profil suivant : céfinase négative, amoxicilline résistante et amoxicilline-acide clavulanique sensible. Ce profil n'est à ce jour pas catégorisé. Il représente 1,3 % des souches totales.

Parmi tous les phénotypes, une seule souche possède une résistance à la ceftriaxone (CMI ceftriaxone 1,5mg/L). Elle fait partie des BLNAR et a été isolée dans des crachats chez un patient atteint d'une pneumopathie. Toutes les autres souches étaient sensibles à la ceftriaxone.

Nous ne notons pas de différence entre les classes d'âge et le pourcentage de souches d'*Hinf* au sein de chaque phénotype étudié. Il est à noter que nous ne retrouvons pas de BLNAR chez le < 1 an. Si nous reprenons phénotype par phénotype, il n'y a pas de différence de pourcentage de résistances que la souche soit invasive ou non. Pour la répartition des phénotypes en fonction des pathologies, nous remarquons qu'elle est globalement identique dans chaque groupe, hormis les méningites pour lesquelles nous retrouvons uniquement des souches sauvages.

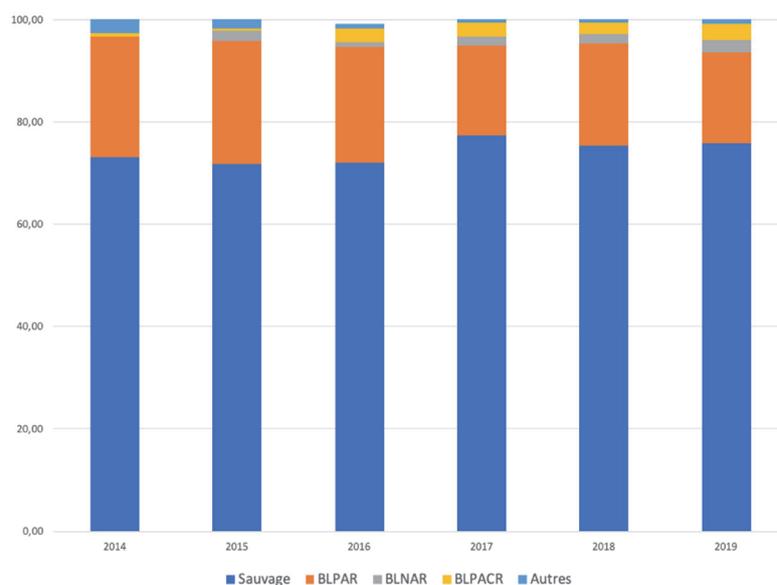


Figure 24. Histogramme de la répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines en fonction des années

Si nous nous intéressons à la répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines en fonction du temps, nous ne remarquons pas de différence entre les différents phénotypes. La résistance aux β -lactamines est restée stable durant la période de notre étude. Le phénotype le plus représenté reste le phénotype sauvage, suivi des BLPAR, des BLPACR, des BLNAR et de notre dernière classe (céfinase négative, amoxicilline résistante et amoxicilline-acide clavulanique sensible).

Les souches sensibles à la gentamicine et à l'acide nalidixique représentent respectivement 93,6 % et 96,6 % des souches totales. Ces pourcentages ne varient pas en fonction de la classe d'âge et des différentes formes cliniques, qu'elles soient invasives ou non.

Sérotype

L'ensemble de nos souches testées sont ressorties positives en PCR *Hinf*, confirmant à la fois la spécificité du MALDI-TOF et la bonne extraction de l'ADN des souches, ce qui permet de valider la PCR spécifique ciblant le gène de capsule b (*bcs*). Cette dernière était positive pour 1 souche sur les 310 (0.3 %). Toutes les autres souches sont de sérotype non b (99.7 %).

Notre cas positif à *Hib* est un garçon de 6 mois qui se présente aux urgences pour céphalées fébriles avec syndrome méningé à l'examen clinique. Nous retrouvons de l'*Hinf* dans des prélèvements d'hémocultures ainsi que dans une ponction lombaire permettant de documenter la méningite.

Une semaine auparavant, l'enfant présentait une otite aiguë unilatérale non documentée qui pourrait être la porte d'entrée infectieuse. Sur la souche des hémocultures, nous avons réalisé une PCR *Hinf* et *Hib* qui sont toutes les deux revenues positives. Cette même souche a été envoyée au CNR des *Hinf* permettant ainsi de confirmer son appartenance au sérotype b.

Suite à cette infection à germe encapsulé, des analyses plus poussées ont été réalisées dont la détection des anticorps anti-*Hinf*b (réalisée au CNR des *Hinf*) par méthode ELISA visant les IgG anti-sérotype b kit IBL RE56351 (122). Le patient avait reçu 2 doses du vaccin Hexyon® à des dates non connues. Quatre semaines après l'infection, l'enfant présentait une sérologie pour *Hib* à 0,55 $\mu\text{g/mL}$. Cette valeur est inférieure au seuil corrélé avec la protection (1 $\mu\text{g/mL}$) mais supérieure à la limite de détection (0,15 $\mu\text{g/mL}$). De ce

fait, on est face à un échec primaire de la vaccination ou à un enfant non vacciné réellement dont le titre de 0,55 µg/mL correspondrait à l'infection elle-même.

Il a été recommandé de réaliser un dosage des anticorps anti-tétanos, une vaccination anti-*Hinf*b associée à un contrôle du titre à un mois de la vaccination et une exploration d'un déficit immunitaire probable. A distance de l'infection, le bilan immunitaire avec typage lymphocytaire, dosage pondéral des immunoglobulines et exploration du complément est revenu normal.

Au final, notre cas reprend l'histoire d'une méningite à *Hib* chez un enfant en cours de vaccination selon le schéma vaccinal avec un taux d'anticorps non protecteur vis-à-vis du pathogène.

Parmi les souches non b, 5 ont été envoyées au CNR pour typage. Quatre de ces souches sont revenues non typables (NTHi) et une est revenue de sérotype a. Sur les souches non typables, 3 provenaient de LCR et 1 d'hémoculture. Les quatre patients présentaient une méningite à porte d'entrée ORL (otite moyenne aiguë, sinusite maxillaire, mastoïdite). La souche de type a était responsable d'une méningite à porte d'entrée ORL (otite moyenne aiguë sur otite séromuqueuse).

2.3. Discussion

Les données de notre étude permettent une mise à jour des connaissances sur l'épidémiologie locale des infections à *Haemophilus influenzae* comprenant leurs distributions au cours du temps, la répartition des sexes et des âges des patients, les présentations cliniques, les portes d'entrée des bactériémies, méningites et IOA, la mortalité, la sensibilité aux antibiotiques et les sérotypes circulants.

Nous avons observé une tendance à la hausse dans les taux annuels d'infections à *Hinf* chez les > 60 ans qui est la classe d'âge la plus touchée par les infections invasives à *Hinf*. Ces tendances peuvent être dues à une augmentation réelle de « l'incidence » de la maladie s'expliquant par différents facteurs tels que le vieillissement de la population et l'utilisation de thérapeutiques de plus en plus immunosuppressives. Les tendances peuvent également refléter des changements de techniques dans le diagnostic microbiologique. A titre d'exemple notre procédure au laboratoire concernant les prélèvements respiratoires a été révisée en janvier 2016 et mentionnait les isolats d'*Hinf* comme germes d'intérêt. En parallèle, nous avons fait l'acquisition en 2018 d'un nouvel automate d'hémoculture plus

performant pouvant expliquer la soudaine augmentation des bactériémies diagnostiquées à cette date. Ces changements technologiques et analytiques peuvent donc biaiser l'interprétation de cette augmentation. Entre 2014 et 2019, nous sommes face à une augmentation des pneumopathies, des bactériémies, des méningites et des sinusites. Néanmoins, pour les méningites, une fluctuation est à noter avec une diminution du nombre de cas en 2017 et 2018.

Nous avons mis en évidence une saisonnalité marquée des infections à *Hinf* avec une prédominance hivernale, quelle que soit l'entité clinique.

Nous mettons en avant que les pneumopathies et les infections ORL sont les deux portes d'entrée les plus fréquentes des infections invasives à *Hinf*; ceci s'explique par le fait que la bactérie est un commensal des voies respiratoires.

La mortalité des infections invasives (hors pneumopathies) à *Hinf* n'est pas négligeable puisqu'elle concerne environ 10 % de nos patients. Les deux classes d'âge les plus touchées par la mortalité sont les < 1 an et les > 60 ans. Au sein du groupe méningite, les > 60 ans n'ont pas une mortalité plus élevée que les < 1 an, contrairement aux bactériémies où les > 60 ans ont une mortalité supérieure au < 1 an avec respectivement 11,8 % et 1,5 %. Néanmoins, l'imputabilité de la mortalité demeure toujours difficile à évaluer compte tenu de la présence de nombreuses co-morbidités des patients, en particulier chez les > 60 ans.

Concernant la sensibilité aux antibiotiques de nos souches testées, on observe que la plupart de nos isolats sont sensibles à la gentamicine et l'acide nalidixique. Pour les β -lactamines, 74,7 % des souches étaient sauvages et 3,6% étaient résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique. Parmi les souches résistantes aux β -lactamines, les mécanismes de résistance les plus fréquents étaient : la production de pénicillinase (20,4 % des souches résistantes), la modification de PLP (1,5 %) ou encore une combinaison des deux (2,1 %). Au vu de nos résultats et de la gravité de certaines atteintes, l'amoxicilline ne devrait pas être l'antibiothérapie de première intention afin de traiter une infection à *Hinf*. Nos données sont concordantes avec celles rapportées sur le plan national. On ne note pas de variation en fonction du temps, en fonction de l'âge et du type d'infections invasives ou non. Pour notre groupe de souches ayant le phénotype β -lactamase négative, amoxicilline résistant, amoxicilline-acide clavulanique sensible, on peut supposer une mutation partielle de la PLP3. De plus, sur l'ensemble de nos souches, une seule possède une résistance à la ceftriaxone. Néanmoins une surveillance par séquençage du gène *ftsI* codant pour la PLP3 reste un moyen efficace de surveiller l'émergence de souches résistantes. Les

céphalosporines de 3^{ème} génération demeurent donc un traitement empirique de choix des infections invasives à *Hinf* avec un risque d'échec microbiologique presque nul.

L'impact de la vaccination est également mis en évidence dans ce travail puisque nous ne retrouvons qu'une seule souche appartenant au groupe b sur les 310 testées (0,3 %). Cette dernière a été isolée lors d'une méningite chez un enfant en cours de vaccination selon le schéma vaccinal avec un taux d'anticorps non protecteur vis-à-vis du pathogène.

Dans cette étude, nous n'avons pas réalisé le sérotype des *Hinf* non b, ne permettant pas d'évaluer le changement démographique des *Hinf* encapsulés au profit des NTHi. Néanmoins, il existe un nombre non négligeable de souches non b responsables d'infections invasives, en particulier chez les > 60 ans. Les NTHi sont les souches les plus retrouvées dans les infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, les otites, les sinusites, les surinfections de BPCO, les IOA, les bactériémies et les méningites (1)(7)(109)(110). La réalisation d'un vaccin permettrait de diminuer la prévalence des infections invasives causées par les NTHi (11). Des études prospectives sur 3-9 mois, étudiant l'efficacité de la vaccination contre les NTHi ont exposé des résultats encourageants (112)(114)(115). Ces dernières méritent d'être poursuivies plus longtemps afin de déterminer l'efficacité réelle de la protection respiratoire à long terme de cette vaccination orale.

Au total, ce travail permet de mettre en évidence que la quasi-totalité des infections invasives actuelles à *Hinf*, en particulier chez le plus de 60 ans, sont dues à un séro groupe non b, et donc actuellement non couvertes par la vaccination. De nouvelles stratégies vaccinales représentent des perspectives d'avenir dans cette population à risque.

Conclusion

Notre étude démontre que le sérotype b n'est quasiment plus présent dans les infections à *Hinf* diagnostiquées à l'AP-HM, que l'atteinte soit invasive ou non. Néanmoins, on observe une augmentation d'infections invasives à sérotype non b, principalement des pneumopathies.

Nous retrouvons un taux de résistance dans notre série qui est de 25,3 % de résistance à l'amoxicilline, 3,6% de résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique et seulement 1 souche était résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération (< 1/1000).

La mortalité globale est de l'ordre de 10 % et touche en particulier les plus de 60 ans. Cette observation laisse suggérer l'utilité d'une vaccination contre les *Hinf* non typables dans cette classe d'âge.

Bibliographie

1. Heinz E. The return of Pfeiffer's bacillus: Rising incidence of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Microb Genom* [Internet]. 12 sept 2018;4(9).
2. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol.* mars 1976;93(1):9-62.
3. Cattoir V, Lemenand O, Avril J-L, Gaillot O. The *sodA* gene as a target for phylogenetic dissection of the genus *Haemophilus* and accurate identification of human clinical isolates. *International Journal of Medical Microbiology.* 4 déc 2006;296(8):531-40.
4. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *hemophilus influenzae*. *J Exp Med.* 31 mars 1931;53(4):471-92.
5. King P. *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). *Clin Transl Med.* 14 juin 2012;1:10.
6. *Haemophilus Influenzae, Invasive Disease | 2015 Case Definition* [Internet]. [cité 26 mars 2020]. Disponible sur: [/nndss/conditions/haemophilus-influenzae-invasive-disease/case-definition/2015/](#)
7. Moxon ER, Vaughn KA. The type b capsular polysaccharide as a virulence determinant of *Haemophilus influenzae*: studies using clinical isolates and laboratory transformants. *J Infect Dis.* avr 1981;143(4):517-24.
8. Nizet V, Colina KF, Almquist JR, Rubens CE, Smith AL. A virulent nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis.* janv 1996;173(1):180-6.
9. Duell BL, Su Y-C, Riesbeck K. Host-pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS Lett.* nov 2016;590(21):3840-53.
10. Van Eldere J, Slack MPE, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *Lancet Infect Dis.* déc 2014;14(12):1281-92.
11. Cerquetti M, Giufrè M. Why we need a vaccine for non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(9):2357-61.
12. Langereis JD, de Jonge MI. Invasive Disease Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Emerging Infect Dis.* oct 2015;21(10):1711-8.
13. Otitis media in infancy and intellectual ability, school achievement, speech, and language at age 7 years. Greater Boston Otitis Media Study Group. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 26 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387994>
14. Smith-Vaughan HC, Sriprakash KS, Mathews JD, Kemp DJ. Nonencapsulated *Haemophilus influenzae* in Aboriginal infants with otitis media: prolonged carriage of P2 porin variants and evidence for horizontal P2 gene transfer. *Infect Immun.* avr 1997;65(4):1468-74.

15. Teele DW, Klein JO, Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis.* juill 1989;160(1):83-94.
16. Morris PS, Leach AJ, Silberberg P, Mellon G, Wilson C, Hamilton E, et al. Otitis media in young Aboriginal children from remote communities in Northern and Central Australia: a cross-sectional survey. *BMC Pediatr.* 20 juill 2005;5:27.
17. Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Genomic+sequence+of+an+otitis+media+isolate+of+nontypeable+Haemophilus+influenzae%3A+comparative+study+with+H.+influenzae+serotype+d%2C+strain+KW20>
18. Barenkamp SJ, Leininger E. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* avr 1992;60(4):1302-13.
19. Shen K, Antalis P, Gladitz J, Sayeed S, Ahmed A, Yu S, et al. Identification, distribution, and expression of novel genes in 10 clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* juin 2005;73(6):3479-91.
20. Harabuchi Y, Faden H, Yamanaka N, Duffy L, Wolf J, Krystofik D. Nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* and recurrent otitis media. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis.* oct 1994;170(4):862-6.
21. Murphy TF, Apicella MA. Nontypable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. *Rev Infect Dis.* févr 1987;9(1):1-15.
22. Progress towards a vaccine for nontypable *Haemophilus influenzae*. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 26 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932503/>
23. Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* oct 1992;146(4):1067-83.
24. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and Prevention. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 1998;62(2):294-308.
25. Collins S, Litt DJ, Flynn S, Ramsay ME, Slack MPE, Ladhani SN. Neonatal invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales: epidemiology, clinical characteristics, and outcome. *Clin Infect Dis.* 15 juin 2015;60(12):1786-92.
26. Giufrè M, Cardines R, Accogli M, Cerquetti M. Neonatal Invasive *Haemophilus influenzae* Disease and Genotypic Characterization of the Associated Strains in Italy. *Clin Infect Dis.* 1 oct 2015;61(7):1203-4.
27. Wallace RJ, Baker CJ, Quinones FJ, Hollis DG, Weaver RE, Wiss K. Nontypable *Haemophilus influenzae* (biotype 4) as a neonatal, maternal, and genital pathogen. *Rev Infect Dis.* févr 1983;5(1):123-36.

28. Reddy MS, Murphy TF, Faden HS, Bernstein JM. Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Otolaryngol Head Neck Surg.* févr 1997;116(2):175-80.
29. Miyamoto N, Bakaletz LO. Selective adherence of non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) to mucus or epithelial cells in the chinchilla eustachian tube and middle ear. *Microb Pathog.* nov 1996;21(5):343-56.
30. Denny FW. Effect of a toxin produced by *Haemophilus influenzae* on ciliated respiratory epithelium. *J Infect Dis.* févr 1974;129(2):93-100.
31. Janson H, Carl n B, Cervin A, Forsgren A, Magnusdottir AB, Lindberg S, et al. Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J Infect Dis.* sept 1999;180(3):737-46.
32. Rodriguez CA, Avadhanula V, Buscher A, Smith AL, St. Geme III JW, Adderson EE. Prevalence and Distribution of Adhesins in Invasive Non-Type b Encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* avr 2003;71(4):1635-42.
33. Barenkamp SJ, Bodor FF. Development of serum bactericidal activity following nontypable *Haemophilus influenzae* acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J.* mai 1990;9(5):333-9.
34. St Geme JW, Falkow S, Barenkamp SJ. High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1 avr 1993;90(7):2875-9.
35. St Geme JW, Pinkner JS, Krasan GP, Heuser J, Bullitt E, Smith AL, et al. *Haemophilus influenzae* pili are composite structures assembled via the HifB chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 oct 1996;93(21):11913-8.
36. Van Ham SM, van Alphen L, Mooi FR, van Putten JP. The fimbrial gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol.* août 1994;13(4):673-84.
37. McCrea KW, Watson WJ, Gilsdorf JR, Marrs CF. Identification of hifD and hifE in the pilus gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b strain Eagan. *Infect Immun.* nov 1994;62(11):4922-8.
38. Krasan GP, Cutter D, Block SL, St Geme JW. Adhesin expression in matched nasopharyngeal and middle ear isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* from children with acute otitis media. *Infect Immun.* janv 1999;67(1):449-54.
39. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8730864>
40. Mulks MH, Kornfeld SJ, Frangione B, Plaut AG. Relationship between the specificity of IgA proteases and serotypes in *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis.* août 1982;146(2):266-74.
41. Plaut AG. The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1983;37:603-22.

42. West-Barnette S, Rockel A, Swords WE. Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. *Infect Immun.* mars 2006;74(3):1828-36.
43. Starner TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2006;174(2):213-20.
44. van Ham SM, van Alphen L, Mooi FR, van Putten JP. Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell.* 18 juin 1993;73(6):1187-96.
45. Duim B, Vogel L, Puijk W, Jansen HM, Meloen RH, Dankert J, et al. Fine mapping of outer membrane protein P2 antigenic sites which vary during persistent infection by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* nov 1996;64(11):4673-9.
46. pubmeddev, al EI et. Prevalence of the hifBC, hmw1A, hmw2A, hmwC, and hia Genes in *Haemophilus influenzae* Isolates. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=prevalence+of+the+hifBC%2C+hmw1A%2C+hmw2A%2C+hmwC%2C+and+hia+Genes+in+Haemophilus+influenzae+Isolates>
47. Xie J, Juliao PC, Gilsdorf JR, Ghosh D, Patel M, Marrs CF. Identification of new genetic regions more prevalent in nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media strains than in throat strains. *J Clin Microbiol.* déc 2006;44(12):4316-25.
48. Rachidi M, Moussair FA, Daoudi N, Sora N. Méningite à *Haemophilus influenzae* de type non b chez un nourrisson: cause rare à pronostic réservé. *Pan Afr Med J* [Internet]. 22 juin 2018 [cité 14 avr 2020];30. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6235511/>
49. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition* [Internet]. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition.* American Society of Microbiology; 2016 [cité 2 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818814>
50. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition* [Internet]. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition.* American Society of Microbiology; 2015 [cité 2 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381/>
51. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* juill 2013;26(3):547-603.
52. Binks MJ, Temple B, Kirkham L-A, Wiertsema SP, Dunne EM, Richmond PC, et al. Molecular Surveillance of True Nontypeable *Haemophilus influenzae*: An Evaluation of PCR Screening Assays. *PLoS One* [Internet]. 28 mars 2012 [cité 27 mars 2020];7(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314702/>
53. Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR

- assay to detect *Haemophilus influenzae*. *International Journal of Medical Microbiology*. 1 avr 2011;301(4):303-9.
54. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. avr 2001;39(4):1553-8.
 55. McCrea KW, Xie J, LaCross N, Patel M, Mukundan D, Murphy TF, et al. Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. *J Clin Microbiol*. févr 2008;46(2):406-16.
 56. Nørskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. Delineation of the species *Haemophilus influenzae* by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. *J Bacteriol*. févr 2009;191(3):822-31.
 57. Harper JJ, Tilse MH. Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. *J Clin Microbiol*. nov 1991;29(11):2539-42.
 58. Denis F. *Bactériologie médicale*. Elsevier. Elsevier Manson; 2016. 599 p.
 59. Falla TJ, Anderson EC, Chappell MM, Slack MP, Crook DW. Cross-reaction of spontaneous capsule-deficient *Haemophilus influenzae* type b mutants with type-specific antisera. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. févr 1993;12(2):147-8.
 60. Wen S, Feng D, Chen D, Yang L, Xu Z. Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 1 juin 2020;80:104205.
 61. Potts CC, Topaz N, Rodriguez-Rivera LD, Hu F, Chang H-Y, Whaley MJ, et al. Genomic characterization of *Haemophilus influenzae*: a focus on the capsule locus. *BMC Genomics* [Internet]. 12 oct 2019 [cité 18 mai 2020];20. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6790013/>
 62. Marty A, Greiner O, Day PJR, Gunziger S, Mühlemann K, Nadal D. Detection of *Haemophilus influenzae* Type b by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. août 2004;42(8):3813-5.
 63. Meats E, Feil EJ, Stringer S, Cody AJ, Goldstein R, Kroll JS, et al. Characterization of Encapsulated and Nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol*. avr 2003;41(4):1623-36.
 64. Månsson V, Gilsdorf JR, Kahlmeter G, Kilian M, Kroll JS, Riesbeck K, et al. Capsule Typing of *Haemophilus influenzae* by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Emerg Infect Dis*. mars 2018;24(3):443-52.
 65. Benítez-Páez A, Portune KJ, Sanz Y. Species-level resolution of 16S rRNA gene amplicons sequenced through the MinION™ portable nanopore sequencer. *Gigascience* [Internet]. 28 janv 2016 [cité 20 mai 2020];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730766/>

66. Moon J, Jang Y, Kim N, Park WB, Park K-I, Lee S-T, et al. Diagnosis of Haemophilus influenzae Pneumonia by Nanopore 16S Amplicon Sequencing of Sputum. *Emerg Infect Dis.* oct 2018;24(10):1944-6.
67. Pendleton KM, Erb-Downward JR, Bao Y, Branton WR, Falkowski NR, Newton DW, et al. Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 2017;196(12):1610-2.
68. Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428889>
69. Park JT, Strominger JL. Mode of action of penicillin. *Science.* 18 janv 1957;125(3238):99-101.
70. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25480295>
71. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* sept 2004;61(17):2200-23.
72. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb Genom.* 2018;4(7).
73. Mathies AW. Penicillins in the treatment of bacterial meningitis. *J R Coll Physicians Lond.* janv 1972;6(2):139-46.
74. Leaves NI, Dimopoulou I, Hayes I, Kerridge S, Falla T, Secka O, et al. Epidemiological studies of large resistance plasmids in Haemophilus. *J Antimicrob Chemother.* mai 2000;45(5):599-604.
75. Fleury C, Resman F, Rau J, Riesbeck K. Prevalence, distribution and transfer of small β -lactamase-containing plasmids in Swedish Haemophilus influenzae. *J Antimicrob Chemother.* mai 2014;69(5):1238-42.
76. First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable Haemophilus influenzae isolates. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620383>
77. Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2004;48(5):1630-9.
78. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing Haemophilus influenzae in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to... - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470649>
79. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant... - PubMed - NCBI

- [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11353613>
80. Peric M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2003;47(3):1017-22.
 81. Bogdanovich T, Bozdogan B, Appelbaum PC. Effect of efflux on telithromycin and macrolide susceptibility in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2006;50(3):893-8.
 82. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Amino Acid Substitution in the Major Multidrug Efflux Transporter Protein AcrB Contributes to Low Susceptibility to Azithromycin in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11).
 83. Seyama S, Wajima T, Yanagisawa Y, Nakaminami H, Ushio M, Fujii T, et al. Rise in *Haemophilus influenzae* With Reduced Quinolone Susceptibility and Development of a Simple Screening Method. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(3):263-6.
 84. Kondo H, Ito S, Hatazaki K, Horie K, Nakane K, Mizutani K, et al. GyrA and/or ParC alterations of *Haemophilus influenzae* strains isolated from the urethra of men with acute urethritis. *J Infect Chemother.* mars 2018;24(3):232-5.
 85. Kuo S-C, Chen P-C, Shiau Y-R, Wang H-Y, Lai J-F, Huang W, et al. Levofloxacin-resistant *haemophilus influenzae*, Taiwan, 2004-2010. *Emerging Infect Dis.* août 2014;20(8):1386-90.
 86. Puig C, Tirado-Vélez JM, Calatayud L, Tubau F, Garmendia J, Ardanuy C, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2015;59(1):461-6.
 87. Coevolution of DNA uptake sequences and bacterial proteomes. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20333176>
 88. Smith HO, Gwinn ML, Salzberg SL. DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res Microbiol.* déc 1999;150(9-10):603-16.
 89. DNA uptake during bacterial transformation. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15083159>
 90. Witherden EA, Bajanca-Lavado MP, Tristram SG, Nunes A. Role of inter-species recombination of the *ftsI* gene in the dissemination of altered penicillin-binding-protein-3-mediated resistance in *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother.* juin 2014;69(6):1501-9.
 91. Skaare D, Anthonisen IL, Caugant DA, Jenkins A, Steinbakk M, Strand L, et al. Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol.* 20 mai 2014;14:131.

92. Lipsitch M, Siber GR. How Can Vaccines Contribute to Solving the Antimicrobial Resistance Problem? *mBio*. 07 2016;7(3).
93. The rise and fall of pneumococcal serotypes carried in the PCV era. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28161425>
94. Goto H, Shimada K, Ikemoto H, Oguri T, Study Group on Antimicrobial Susceptibility of Pathogens Isolated from Respiratory Infections. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from more than 10,000 patients with infectious respiratory diseases: a 25-year longitudinal study. *J Infect Chemother*. déc 2009;15(6):347-60.
95. *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry β -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inac... - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576428>
96. Perez AC, Murphy TF. Potential impact of a *Moraxella catarrhalis* vaccine in COPD. *Vaccine*. 3 sept 2019;37(37):5551-8.
97. Schaar V, Uddbäck I, Nordström T, Riesbeck K. Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing β -lactamase derived from *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. janv 2014;69(1):117-20.
98. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respirator... - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239228>
99. Felmingham D, Grüneberg RN. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother*. févr 2000;45(2):191-203.
100. Barbosa AR, Giufrè M, Cerquetti M, Bajanca-Lavado MP. Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother*. avr 2011;66(4):788-96.
101. Honda H, Sato T, Shinagawa M, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, et al. Multiclonal Expansion and High Prevalence of β -Lactamase-Negative *Haemophilus influenzae* with High-Level Ampicillin Resistance in Japan and Susceptibility to Quinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(9).
102. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist*. 2003;9(1):39-46.
103. Giufrè M, Daprai L, Cardines R, Bernaschi P, Ravà L, Accogli M, et al. Carriage of *Haemophilus influenzae* in the oropharynx of young children and molecular epidemiology of the isolates after fifteen years of *H. influenzae* type b vaccination in Italy. *Vaccine*. 17 nov 2015;33(46):6227-34.

104. Deghmane A-E, Hong E, Chehboub S, Terrade A, Falguières M, Sort M, et al. High diversity of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of *ftsI* gene. *J Infect*. 2019;79(1):7-14.
105. calendrier_vaccinal_mars_2019.pdf [Internet]. [cité 27 mars 2020]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/calendrier_vaccinal_mars_2019.pdf
106. Nitta DM, Jackson MA, Burry VF, Olson LC. Invasive *Haemophilus influenzae* type f disease. *Pediatr Infect Dis J*. févr 1995;14(2):157-60.
107. Ulanova M, Tsang RSW. *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections. *Lancet Infect Dis*. janv 2014;14(1):70-82.
108. Desai S, Jamieson FB, Patel SN, Seo CY, Dang V, Fediurek J, et al. The Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Non-Serotype B Disease in Ontario, Canada from 2004 to 2013. *PLoS One* [Internet]. 16 nov 2015 [cité 30 mars 2020];10(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4646341/>
109. Finney LJ, Ritchie A, Pollard E, Johnston SL, Mallia P. Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:1119-32.
110. Dagan R, Leibovitz E. Bacterial eradication in the treatment of otitis media. *Lancet Infect Dis*. oct 2002;2(10):593-604.
111. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and Prevention. *Microbiol Mol Biol Rev*. juin 1998;62(2):294-308.
112. Oral immunisation with killed *Haemophilus influenzae* for protection against acute bronchitis in chronic obstructive lung disease. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 27 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2867396>
113. Clancy RL, Cripps AW, Husband AJ, Buckley D. Specific immune response in the respiratory tract after administration of an oral polyvalent bacterial vaccine. *Infect Immun*. févr 1983;39(2):491-6.
114. Lehmann D, Coakley KJ, Coakley CA, Spooner V, Montgomery JM, Michael A, et al. Reduction in the incidence of acute bronchitis by an oral *Haemophilus influenzae* vaccine in patients with chronic bronchitis in the highlands of Papua New Guinea. *Am Rev Respir Dis*. août 1991;144(2):324-30.
115. Tandon MK, Gebiski V. A controlled trial of a killed *Haemophilus influenzae* vaccine for prevention of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Aust N Z J Med*. août 1991;21(4):427-32.
116. Commission Implementing Decision of 8 August 2012 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council [Internet]. Official Journal of the European Union. 2012 [cité 3 mai 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:262:0001:0057:EN:PDF>

117. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* nov 2010;5(11):1733-54.
118. OpenEpi [Internet]. [cité 9 mai 2020]. Disponible sur: https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
119. Hotomi M, Togawa A, Kono M, Sugita G, Sugita R, Fujimaki Y, et al. An Application of Outer Membrane Protein P6-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Haemophilus influenzae* in Middle Ear Fluids and Nasopharyngeal Secretions. *PLoS One* [Internet]. 28 août 2013 [cité 9 août 2020];8(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3756020/>
120. Ladhani S, Slack MPE, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996–2006. *Emerg Infect Dis.* mars 2010;16(3):455-63.
121. Murphy TF. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis.* avr 2003;16(2):129-34.
122. *Haemophilus influenzae* B IgG ELISA [Internet]. [cité 9 août 2020]. Disponible sur: http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE56351_IFU_en_HiB_IgG_ELISA_2014-11_sym3.pdf
123. Descy J, Meex C, Melin P, Hayette M-P, Pascale H, Mol P. Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Revue médicale de Liège.* 1 janv 2010;65.
124. Montgomery K, Raymundo L, Drew WL. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *J Clin Microbiol.* févr 1979;9(2):205-7.
125. Skinner A, Wise R. A comparison of three rapid methods for the detection of beta-lactamase activity in *Haemophilus influenzae*. *J Clin Pathol.* nov 1977;30(11):1030-2.
126. O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 1972;1(4):283-8.
127. FilmArray Respiratory Panel 2 plus (RP2 plus) [Internet]. bioMérieux France. [cité 14 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/filmarray-respiratory-panel-2-plus-rp2-plus>
128. Request a Free Demo [Internet]. BioFire Diagnostics. [cité 14 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.biofire.com/products/request-a-demo/>
129. MinION: A Portable, Real-Time DNA/RNA Sequencing Device [Internet]. [cité 22 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=Wq35ZXyayuU>
130. Claesson BA, Lagergård T, Trollfors B. Development of serum antibodies of the immunoglobulin G class and subclasses against the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b in children and adults with invasive infections. *J Clin Microbiol.* déc 1988;26(12):2549-53.

131. Käyhty H, Jousimies-Somer H, Peltola H, Mäketä PH. Antibody response to capsular polysaccharides of groups A and C neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae type b during bacteremic disease. J Infect Dis. janv 1981;143(1):32-41.
132. Käyhty H, Peltola H, Karanko V, Mäkelä PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b. J Infect Dis. juin 1983;147(6):1100.

Annexes

MALDI-TOF MS

Matrice Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass spectrometry. Cet automate permet d'identifier l'espèce d'une bactérie par comparaison des pics protéiques obtenus avec les banques de données. Cet outil est très rapide et donne ce résultat en quelques minutes.

Un spectromètre de masse (SM) est divisé en quatre parties : la plaque de dépôt de l'échantillon, la chambre d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

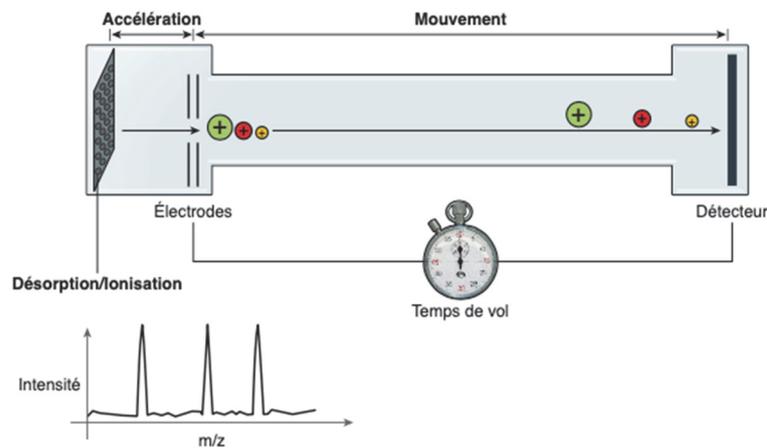


Schéma de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

Cette méthode fait appel au principe de désorption-ionisation assisté par une matrice. Tout d'abord, il faut placer l'échantillon (les colonies) et la matrice sur une cible présente sur la plaque d'analyse.

Ensuite, il faut introduire la plaque dans le SM, dans lequel elle sera bombardée par un laser générant des ions sous forme gazeuse. Les ions formés dans la chambre d'ionisation sont accélérés grâce à un champ électrique. Ce dernier permet aux ions de voler vers l'analyseur. Il permet en fonction du temps de vol (TOF), qui dépend lui-même du rapport m/z , de séparer les ions et de générer un spectre de masse (m/z). Il est le reflet de la composition en protéines de la bactérie initialement déposée sur la cible. Ce spectre est ensuite analysé par comparaison à d'autres spectres dans des banques de données (123).

Test à la Céfinase

Certaines bactéries (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis* et germes anaérobies) ont la propriété de produire des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques de la famille des β -lactamines. La production de ces enzymes est donc très souvent le signe d'une résistance aux β -lactamines.

Le réactif Céfinase est constitué de disques de papier imprégnés de céphalosporine chromogène, qui libère un composé rouge lors de son hydrolyse par une β -lactamase (124), (125), (126). L'utilisation de ce test permet d'indiquer la présence d'une β -lactamase ou non.

Un test positif s'observe par la coloration du papier en rose. Cette coloration correspond à l'ouverture du cycle β -lactame de la céphalosporine chromogénique grâce à l'action de la β -lactamase. La présence de cette enzyme inactive l'action de l'amoxicilline qui est l'une des molécules de première ligne utilisée en thérapeutique.

La PCR

Polymerase Chain Reaction ou PCR est une méthode d'amplification d'acides nucléiques *in vitro* permettant d'augmenter la quantité de matériel génétique d'intérêt. Cette méthode permet d'obtenir à partir d'un échantillon peu abondant, d'importante quantité d'ADN spécifique et de longueur définie (en millions de copies).

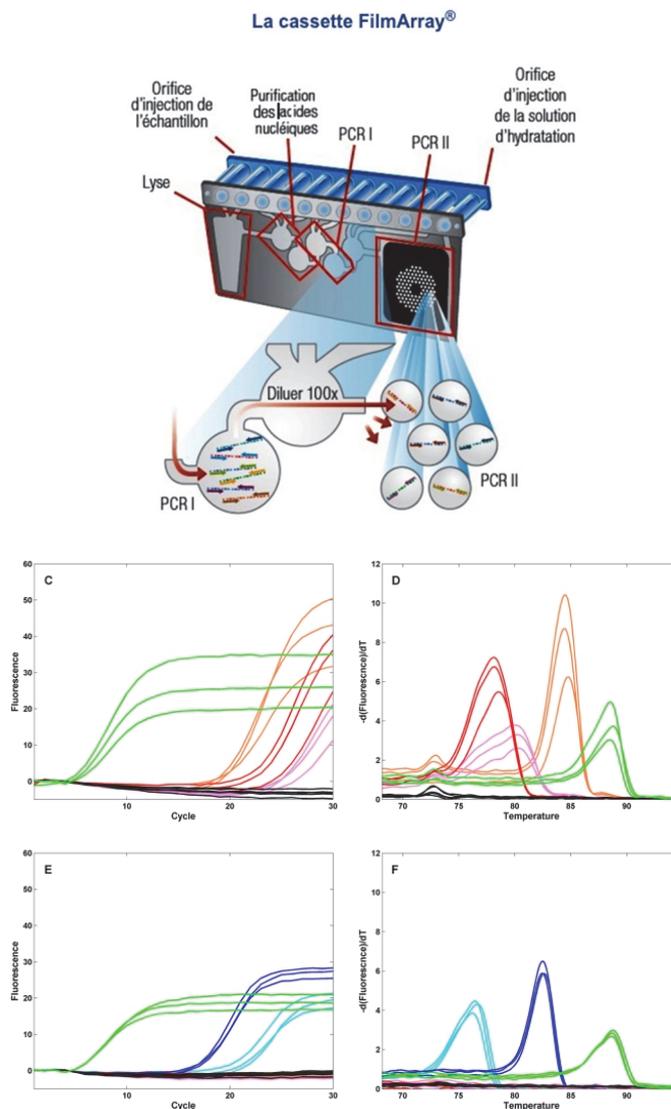
La PCR fait appel à une succession de réactions de réplication d'une matrice d'ADN double brins. Pour ce faire, dans le milieu réactionnel ou mix, on a besoin de la matrice d'ADN d'intérêt, de l'ADN polymérase (Taq-polymérase), de tampon ($MgCl_2$, stabilisant la liaison ADN pol/ADN matrice), dNTPs (désoxyribonucléotides, en excès) et un couple d'amorces (primers, oligonucléotides) spécifique de la séquence cible à amplifier.

Afin de réaliser les différentes étapes de PCR, il est indispensable d'utiliser un thermocycleur qui permet de faire varier la température lors de la réaction. Premièrement, on a une dénaturation de l'ADN (95 °C) : les liaisons hydrogènes du double brin d'ADN sont lysées et on obtient deux brins d'ADN simple brin. Ensuite, l'étape d'hybridation (45-60 °C) correspond à l'appariement des bases complémentaires entre les amorces et l'ADN. Enfin vient la dernière étape, l'élongation (72 °C), durant laquelle les amorces hybridées à la matrice servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN de façon complémentaire et antiparallèle. L'élongation se fait de l'extrémité 5' vers 3'. On a une croissance exponentielle de notre matériel de départ. Ce cycle composé de trois étapes se

répète jusqu'à épuisement du matériel présent dans le mix. A la fin de la réaction on obtient 2^n copies d'ADN (n =nombre de cycle).

Une méthode de PCR en temps réel (qPCR), correspond à la détection du matériel amplifié au fur et à mesure des cycles d'amplification. Ce principe se base sur l'utilisation de : dNTPs, MgCl, Taqpol, amorces spécifiques et des molécules fluorescentes (soit des sondes spécifiques marquées, soit un agent intercalant). A la différence de la PCR classique, la qPCR permet de quantifier l'ADN initial. Pour cela, il faut un thermocycleur capable de quantifier la fluorescence émise.

Le Biofire



Cassette FilmArray et Courbes de fusions (127)(128)

Cet outil diagnostique utilise comme méthode la PCR multiplex, c'est à dire qui peut cibler et amplifier plusieurs pathogènes en même temps. Ce test est unitaire, un test par patient. Une cassette teste différents types de pathogènes en fonction du panel utilisé. Pour *Hinf*, les tests biofire méningite et respiratoire bas sont intéressants. Ils permettent de répondre en quelques heures à la présence ou non d'acides nucléiques spécifiques de ce dernier.

Une première étape de lyse de notre échantillon (cellules, bactéries, virus, parasites) est réalisée par méthode chimique puis mécanique (sonication, bille). Au cours de la lyse mécanique, les acides nucléiques se clivent en fragment qui se fixent sur des billes magnétiques. Par la suite, ces dernières se dirigent vers la chambre de purification dans laquelle un solvant élimine tous les débris cellulaires. Ensuite, une élution est réalisée afin de récupérer les fragments d'ADN/ARN fixés aux billes magnétiques. Après cette étape, l'ADN/ARN migre vers la première chambre de PCR en laissant derrière elle les billes magnétiques. Pour les virus à ARN, une étape de reverse transcription (RT) est réalisée pour passer de l'ARN à l'ADNc. Puis l'ADN est multiplié de façon spécifique (amorce spécifique, > 1000 amorces, nombreuses PCR en parallèle), on parle alors de PCR nichée. On obtient des millions de copies d'ADN qui vont être diluées.

Enfin, les copies d'ADN arrivent dans la deuxième chambre de PCR au niveau de la matrice. Au niveau de celle-ci, chaque compartiment contient des amorces spécifiques des pathogènes ciblés (pour un pathogène, trois compartiments identiques). Les amorces se fixent sur les séquences d'intérêts et une nouvelle PCR spécifique débute. Un agent intercalant fluorescent permet de détecter la réplication de l'ADN. A l'aide d'un algorithme tenant compte du nombre de puits positifs (≥ 2 puits sur 3 positifs), de leurs intensités et de l'utilisation de courbe de fusion, on obtient un résultat positif ou non. Ce résultat indique la présence ou non d'acides nucléiques pour chaque pathogène présent dans le panel. Cet outil diagnostique est très utilisé devant la rapidité du rendu de résultat (< 3 heures) notamment dans les suspicions de méningites bactériennes et les pneumopathies en réanimation. Cela permet l'adaptation rapide de l'antibiothérapie et donc l'amélioration de la survie du patient atteint.

Le MinION

Le MinION est un automate qui permet le séquençage à partir du prélèvement primaire. Il utilise la méthode du séquençage des nanopores. Cette dernière permet l'analyse directe et en temps réel de longs fragments d'ADN ou d'ARN.

Il fonctionne en monitorant les modifications d'un courant électrique généré par le passage des acides nucléiques à travers un nanopore formé par une protéine transmembranaire. Le signal qui en résulte est capté puis décodé pour fournir la séquence spécifique d'ADN ou d'ARN.

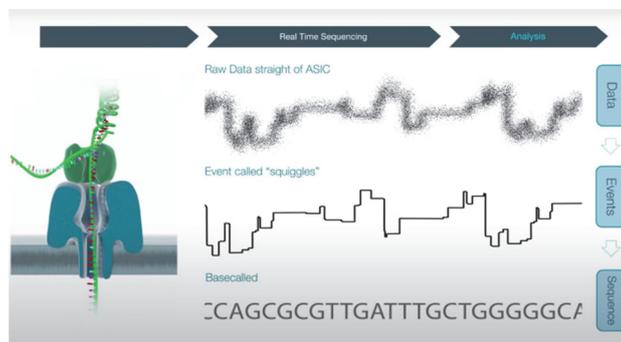


Schéma du nanopore (129)

Les séquences produites peuvent atteindre une longueur de 10 à 100 kilobases. Ce système facilite l'analyse d'une molécule d'ADN/ARN à haut débit en identifiant les bases qui le composent les unes après les autres. Les données sont diffusées en temps réel.

La métagénomique ciblée consiste à l'amplification d'un locus génomique considéré comme ubiquitaire chez l'ensemble des micro-organismes constitutifs du microbiote étudié et comportant des régions conservées, qui seront le plus souvent amplifiées par un même couple d'amorces, mais aussi des régions variables d'un organisme à l'autre afin de les discriminer. Ainsi, pour les bactéries, l'ADNr (ADN ribosomal) 16S est le locus le plus souvent utilisé (65).

Sérologie *Haemophilus influenzae b*

Ce test de biologie médicale est un test ELISA permettant la détection des anticorps IgG contre le polyribosylribitolphosphate (PRP) de *Haemophilus influenzae* type b dans le sérum et le plasma humain. Le PRP est le composant de la capsule de *Hib*.

La détermination des anticorps spécifiques vis-à-vis du PRP montre le niveau de réaction immunitaire humorale après une immunisation par un vaccin contenant du PRP ou après une infection clinique apparente ou inapparente à *Haemophilus influenzae* type b.

Lorsque ce test est négatif, on peut supposer qu'il existe un risque d'infection à *Haemophilus influenzae* de type b. L'absence de séroconversion après la vaccination indique l'incapacité du système immunitaire du patient à réagir à des antigènes glucidiques. Une immunodéficience spécifique aux polysaccharides peut être observée chez les patients atteints de bronchites chroniques, pneumonies récurrentes, asthmes bronchiques intrinsèques ou bronchectasies de genèse peu claire. Il est important de noter que les immunoréactions humorales après une infection à NTHi ne sont pas détectées par ce test.

Il a été démontré dans des publications (130)(131)(132) qu'une concentration d'anticorps inférieure à 0,15 µg/mL donne une protection insuffisante contre *Hib*. Des concentrations d'anticorps comprises entre 0,15 et 1,0 µg/mL indiquent que le patient a été immunisé contre *Hib* via le vaccin ou via une infection vraie. Mais seules les concentrations d'anticorps supérieures à 1,0 µg/ml représentent une immunité suffisante et protectrice. Afin d'obtenir ce titre, il est nécessaire de suivre le protocole vaccinal de trois injections.

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

Résumé

Avant l'ère vaccinale, *Haemophilus influenzae* (*Hinf*) était connu pour provoquer des infections invasives et non invasives. La mise en place de la vaccination contre *Haemophilus influenzae* de sérotype b, qui était le sérotype dominant, a permis une éradication quasi-totale de ce dernier. Néanmoins, l'épidémiologie d'*Hinf* a connu de profondes modifications avec une augmentation du nombre d'infections causées par les souches non typables contre lesquelles le vaccin était inefficace.

Nous avons mené une étude rétrospective des infections à *Hinf* diagnostiquées à l'AP-HM de 2014 à 2019. Mille-six-cent-vingt-trois infections ont été documentées durant cette période. Nous avons mis en évidence une saisonnalité dans l'évolution des infections à *Hinf* avec une prédominance en hiver. Au sein de ces dernières, les pneumopathies étaient l'atteinte la plus représentée (81,4 %) et ont vu leur nombre augmenter entre 2014 et 2019. La mortalité globale des infections invasives de notre étude est de l'ordre de 10% et touche en particulier les plus de 60 ans avec une mortalité atteignant 21,4 %.

Nous avons typé 19 % des souches (310/1623), et 99,7 % d'entre elles étaient de sérotype non b.

Sur l'ensemble de nos souches, 74,7 % étaient sauvages et une seule était résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Le mécanisme de résistance aux β -lactamines le plus fréquent est l'acquisition d'une β -lactamase.

Devant l'augmentation du nombre d'infections et de résistances, il est indispensable de trouver de nouvelles armes afin de prévenir ces infections. Avec le développement des vaccins contre les *Haemophilus influenzae* non typables, la vaccination chez le plus de 60 ans pourrait être une option thérapeutique à venir.

Mots-clés : *Haemophilus influenzae*, Epidémiologie, Sérogroupage, Vaccin, Résistance