

# Bactéries gram négatif aérobies strictes

(« *Pseudomonas* et apparentés »)

## 1. MORPHOLOGIE CLASSIFICATION

Les **bactéries gram - aérobies strictes** de culture "facile" forment un groupe de bactéries très souvent **oxydase +**, assimilés très longtemps au genre *Pseudomonas*.

Mais l'extrême diversité des bactéries qui furent nommées *Pseudomonas* a conduit à l'invention de nouvelles familles.

Les études ayant permis la création de nouvelles familles sont des études génétiques d'hybridations DNA-DNA et du DNA16S (ribosomal)

Nous avons préféré, même si elle reste approximative, utilisé la mention "**bactéries Gram négatif aérobies strictes**" à la terminologie

***Pseudomonas* et apparentés** sans différencier sur la morphologie pour intégrer les coques, parfois très proches des bacilles (voir Bergeys ci-dessous).

On pourrait aussi parler de Non Entérobactéries (NE) mais les aéroanaérobies seraient alors incluses. Le terme NE aérobies strictes serait aussi possible.



*Pseudomonas* au Gram (cliché de Pascal Fraperie)

### 1.1. Approche par les genres

On peut distinguer un certain nombre de genres :

Les principaux genres de <b>culture facile</b> sont :	D'autres genres de <b>culture plus délicate ou très délicate</b> :
<i>Acetobacter</i> <i>Achromobacter</i> ; proche d' <i>Alcaligenes</i> <b><i>Acinetobacter</i></b> <i>Agrobacterium</i> <i>Alcaligenes oxydase + et ciliature dégénérée</i> <b><i>Brevundimonas</i></b> (ex <i>Pseudomonas diminuta</i> et <i>vesicularis</i> ) <b><i>Burkholderia</i></b> ( <i>mallei</i> et <i>pseudomallei</i> ) <i>Chryseomonas</i> <b><i>Comamonas</i></b> <i>Flavimonas</i> <i>Flavobacterium</i> souvent pigmentées en jaune / jaune-orange <i>Frateuria</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Ralstonia</i> <b><i>Pseudomonas</i></b> <i>Rhizobium</i> (bactérie du sol) <i>Shewanella putrefaciens</i> (ex <i>Alteromonas</i> et <i>Pseudomonas</i> ) <b><i>Stenotrophomonas</i></b> (ex <i>Xanthomonas maltophilia</i> ) <i>Sphingobacterium</i> ; proche de <i>Flavobacterium</i> <i>Weeksella</i> <b><i>Xanthomonas</i></b>	<i>Arcobacter</i> <b><i>Bordetella</i></b> <b><i>Brucella coccobacilles</i></b> <b><i>Campylobacter</i></b> de forme spiralée Microaérophile <b><i>Francisella</i></b> <b><i>Helicobacter</i></b> Microaérophile <i>Kingella</i> <b><i>Legionella</i></b> <b><i>Neisseria Moraxella</i></b> (y compris <i>Branhamella</i> ) coques ou coccobacilles <i>Oligella</i>  En gras les taxons traités dans ce document (chapitre spécifique ou dans un chapitre plus global).

## 1.2. Approche par les familles de Bergeys

<b>phylum XII : Proteobacteria</b>	Class I : Alphaproteobacteria	Ordre II : Rickettsiales	famille des Rickettsiales (incluant le genre Rickettsia)
			famille des Anaplasmataceae (incluant le genre Ehrlichia parfois élevé en famille)
		Ordre IV : Sphingomonas	famille des Sphingomonadaceae avec le genre Sphingomonas
		Ordre V : Caulobacteriales	famille des Caulobacteraceae avec le genre Brevundimonas
		Ordre VI : Rhizobiales	famille des Brucellaceae avec le genre Brucella
			famille des Rhizobiaceae (genres Rhizobium...)
	famille des Bartonellaceae (genres Bartonella...)		
	Class II : Bétaproteobacteria	Ordre I : Burkholderiales	famille des Burkholderiaceae
			famille des Ralstoniaceae
			famille des Alcaligenaceae (genres Alcaligenes, Achromobacter, Bordetella...)
		Ordre IV : Neisseriales	(famille des Neisseriaceae avec les genres Neisseria, Eikenella, Kingella...)
	Class III : Gammaproteobacteria	Ordre III : Xanthomonadales	famille des Xanthomonadaceae (avec les genres Stenotrophomonas, Xanthomonas...)
		Ordre V : Thiotrichales	(famille III : Francisellaceae)
		Ordre VI : Legionellales	famille des Legionellaceae (avec le genre Legionella)
			famille des Coxiellaceae (avec le genre Coxiella)
		Ordre IX : Pseudomonadales	famille des Pseudomonadaceae (avec les genres Pseudomonas, Morococcus...)
			famille des Moraxellaceae (avec les genres Moraxella, Acinetobacter...)
		Ordre X : Alteromonadales	famille des Alteromonadaceae (avec les genres Alteromonas, Shewanella...)
		Ordre XI : Vibrionales	famille des Vibrionaceae (avec les genres Vibrio, Listonella, Photobacterium...)
		Ordre XII : Aeromonadales	famille des Aeromonadaceae (avec les genres Aeromonas,...)
Ordre XIII : Enterobacteriales	famille des Enterobacteriaceae (avec les genres classiques mais aussi Plesiomonas...)		
Ordre XIII : Pasteurellales	famille des Pasteurellaceae (avec les genres Pasteurella, Haemophilus, Actinobacillus...)		
Class IV : Deltaproteobacteria			
Class V : Epsilonproteobacteria	Ordre I : Campylobacteriales	famille des Campylobacteraceae	
		famille des Helicobacteraceae	

## 1.3. Limites du chapitre

Tous les genres de culture difficile et *Acinetobacter* font l'objet d'un chapitre particulier.

On s'intéressera ici dans un premier temps aux ***Pseudomonas*** et bactéries proches, souvent impliquées en pathologie. Les bactéries de culture difficile seront évoquées dans des chapitres particuliers accessibles directement via les liens.

Les ***Pseudomonas*** et bactéries proches sont des bacilles Gram - très généralement mobiles et par ciliature polaire, possédant souvent des inclusions de polyhydroxybutyrate pouvant donner une coloration tigrée au Gram.

Certaines espèces produisent une substance extracellulaire muqueuse de nature peu claire (polysidique) : le **slime**. Quelques unes produisent des **pigments fluorescents** (pyocyanine, pyoverdine).

Les **antigènes O** permettent de différencier un certain nombre de sérovars de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2. HABITAT

Ces bactéries sont ubiquitaires et colonisent parfois des habitats surprenants comme les réservoirs de kérozène !

Ce sont des bactéries des eaux et des plantes coupées comme des plantes en pot et ces souches colonisent éventuellement l'homme (ce sont les mêmes). On trouve régulièrement *Pseudomonas aeruginosa* dans les selles malgré l'anaérobiose. Leur métabolisme respiratoire est très actif : on retrouve de nombreux *Pseudomonas* dans les stations d'épuration où ils biodégradent nos déchets. C'est la minéralisation en particulier des résidus de lessives.

### 3. POUVOIR PATHOGÈNE

En pathologie, les *Pseudomonas* interviennent essentiellement comme des pathogènes opportunistes.

Toutefois, *P. aeruginosa*, bactérie très résistante aux agents de désinfection et au métabolisme particulièrement actif, domine aux côtés de pathogènes stricts *Burkholderia mallei* et *pseudomallei*.

Se signale aussi dans les infections nosocomiales, *Stenotrophomonas maltophilia* (ex *Pseudomonas* et ex *Xanthomonas*) et comme opportuniste, *B. cepacia*.

Il existe des espèces phytopathogènes comme les *Xanthomonas*.

#### *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique

Son nom signifie "pus bleu" en raison de la production de pyocyanine. Toutefois des pus bleus sont aussi produits par *Staphylococcus aureus* pour des raisons mystérieuses. C'est le type même de la bactérie opportuniste pathogène chez l'immunodéprimé ou après un traumatisme grave y compris les brûlures.

Les souches plus particulièrement pathogènes sont productrices de :

- une **cytotoxine nécrosante** (efficace à  $0,1 \mu\text{g cm}^{-3}$ ) et surtout
- une **exotoxine protéique dite A**, ADP ribosylante. Cette toxine de  $67 \text{ kg mol}^{-1}$  (soit 900 AA) ressemble par son mécanisme d'action à la toxine diphtérique. Elle est pourtant très différente. La DL50 est de  $0,1 \mu\text{g}$  par souris. Constituée de deux parties probablement attachées, elle se fixe par la sous-unité B à la mb plasmique puis pénètre entière. Elle va se fixer sur le facteur d'élongation EF2 après avoir fixé une molécule de NAD. Le transfert de l'ADP sur le facteur EF2 provoque sa libération et l'inactivation du facteur conduisant donc à l'arrêt des synthèses protéiques. (toxine ADP ribosylante).

Les infections obtenues sont très polymorphes : tous les organes peuvent être atteints. Chez les sujets sains, des infections cutanées sont possibles. Le rôle des bains agités peut être remarqué.

Elles sont très souvent nosocomiales : (0,5 % des patients hospitalisés font une infection à pyocyanique les sérotypes les plus fréquents sont O:6 et O:11 (celui-ci étant responsable de 60 % de épidémies).

Les malades de **mucoviscidose** sont très souvent atteints par des souches de *P. aeruginosa* souvent non groupables. Ces infections sont redoutables d'autant que le terrain est débilité et le traitement difficile.

#### *Burkholderia mallei*

*Burkholderia mallei* est un parasite obligatoire et pathogène strict immobile des solipèdes (cheval, âne, mulet). (Loeffler 1882).

Cette bactérie peut être considérée comme un mutant déficient de *Burkholderia pseudomallei*.

La maladie est la morve du cheval qui se manifeste par des lésions cutanées ou des muqueuses pouvant évoluer très rapidement vers la mort ou devenir chroniques. Le bacille **immobile** a été découvert par Loeffler en 1882. C'est un **pathogène strict**. La maladie est **très rare** (dernier cas connu en 1964 en France) d'autant que l'utilisation militaire du cheval est aujourd'hui très réduite.

Un extrait aqueux de la souche chauffé, baptisé malléine, permet de pratiquer une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) qui sert au dépistage et a permis l'éradication.

Au niveau scolaire la manipulation est interdite. **Niveau de sécurité 3**.



#### *Burkholderia pseudomallei*

(bacille de Whitmore 1912)

Pathogène strict **mobile**.

La maladie est la **mélioïdose**. Elle se manifeste par :

- des formes septicémiques d'évolution foudroyante
- des formes septicémiques d'évolution plus chronique mais métastatiques
- des formes chroniques avec de multiples abcès.

Au niveau scolaire la manipulation est interdite. **Niveau de sécurité 3**.

### 4. ISOLEMENT

Il peut être obtenu sur tous les milieux d'isolement des Gram - (bactéries H<sub>2</sub>S -) comme SS, Hektoen, Drigalski, Mac Conkey, etc.

Mais il existe un milieu sélectif important la **gélose au cétrimide et à l'acide nalidixique** (base King A).

Des *Klebsiella*, *Serratia* et *Acinetobacter* peuvent y cultiver.

Une incubation à **41°C** peut améliorer l'isolement sélectif de *P. aeruginosa*.

# 5. IDENTIFICATION

Elle met en jeu :

- l'oxydase
- la ciliature polaire
- la recherche de la production de **pigments** (milieux de King A et B et donc la gélose au cétrimide, cupule VP, Mueller Hinton et parfois géloses ordinaires). La pyoverdine a un rôle de captation du fer (sidérophore) : les milieux spéciaux utilisés sont donc carencés en fer. La pyocyanine se transforme parfois en pyorubine rouge sombre. Pyocyanine et/ou pyoverdine ont un rôle antibiotique.
- des caractères biochimiques classiques (ADH, lécithinase voir tableaux)
- l'auxanogramme
- culture à 41°C.
- sérogroupage (Pour les *Pseudomonas aeruginosa* : 16 groupes O d'intérêt médical, sérums anti O soit mélanges, soit monovalents)
- lysotypie
- étude des produits de sécrétion antimicrobiens (pyocines)

On remarquera l'**odeur aromatique** (sans mettre le nez sur les colonies !), permettant une orientation de l'identification pour les souches des infections du tractus urinaire, souvent très muqueuses et pour lesquelles l'oxydase est parfois faussement négative en raison de la difficulté de prélèvement des colonies.



La galerie à utiliser comprendra donc :

- une gélose de réisolement (oxydase, état frais)
- une gélose VF
- un milieu HL glucosé
- un milieu de Kligler qui remplace très utilement VF et HL glucosé.
- une gélose VF nitraté(e) éventuellement
- une galerie miniaturisée (**API20NE** par exemple)
- un King A
- un King B

Remarque : certaines souches sont auxotrophes comme *Stenotrophomonas maltophilia* qui a besoin de méthionine. Le milieu pour auxanogramme doit donc contenir cet acide aminé.



Fragment d'API20NE montrant, pour *Pseudomonas aeruginosa*, la production bleue de pyocyanine et celle de diazote à partir des nitrates dans la cupule NO3

## 6. TRAITEMENT ET ANTIBIOGRAMME

Les *Pseudomonas* sont des bactéries extrêmement résistantes aux antibiotiques donc fortement sélectionnées par les différentes antibiothérapies réalisées à l'hôpital. L'imperméabilité de la membrane externe est en cause dans la résistance, les porines prenant en charge les antibiotiques étant rares.

*P. aeruginosa* résiste à

- pénicilline G et ampicilline
- céphalosporines de 1° et 2° génération.
- streptomycine, kanamycine
- chloramphénicol
- sulfamides
- acide nalidixique
- tétracyclines

Il peut être sensible à

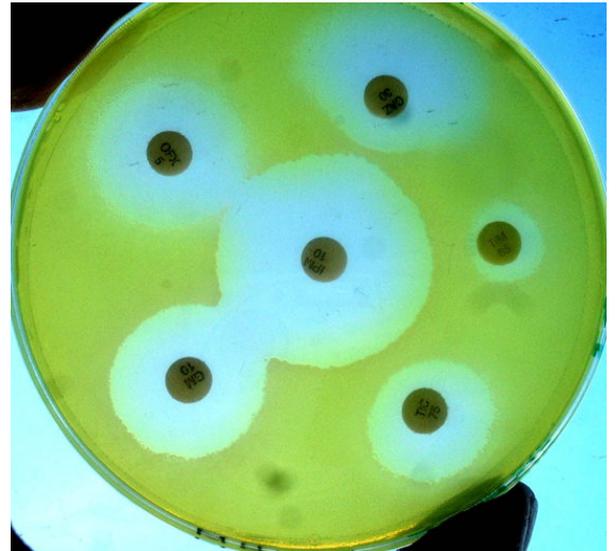
- carbénicilline (R = 21 %) ou Ticarcilline
- gentamycine (R = 18 %) ou Tobramycine
- colistine (Colimycine) (R = 1 %)

L'antibiogramme doit absolument tester ces cinq antibiotiques.

De nombreux antibiotiques ont été depuis découverts :

- azlocilline, pipéracilline, imipénème, aztréonam
- céphalosporines de 3° génération (Céfopérazone, cefsulodine, ceftazidime (R=5%))
- amikacine (R = 3 %)
- nouvelles quinolones de deuxième génération

On préfère le plus souvent, en raison de nombreuses résistances, utiliser des associations d'Ab, aminoside et bêta-lactamines actives.



Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* montrant le production de pyoverdine

## 7. PROPHYLAXIE

Au niveau hospitalier elle met en jeu les règles simples d'hygiène en utilisant des antiseptiques puissants comme l'eau de Javel puisque les *Pseudomonas* résistent à presque tous les ammoniums quaternaires (dans certaines limites de concentration). On peut en particulier éviter les fleurs coupées.

L'hygiène des mains, les précautions dans la désinfection des flacons de perfusion (*Pseudomonas* se développe parfois entre capsule et bouchon de caoutchouc), en évitant les contaminations, limitent la transmission.

La contamination par les eaux nécessite une bonne désinfection des eaux, et en particulier des piscines et des bains à remous. Il ne faut toutefois pas exagérer le danger qui dépend de la souche en cause.

## COMPLÉMENTS