



Université de Limoges
ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)
UMR INSERM 1092 : RESINFIT

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par
Sylvain MEYER

Le 24 juin 2024

De la colonisation à l'infection :
Suivi de la composition du microbiote respiratoire et des caractéristiques microbiologiques des aspirats endotrachéaux des patients intubés-ventilés en Réanimation

Thèse dirigée par le Professeur Olivier BARRAUD

JURY :

Présidente du jury

Pr Marie-Cécile PLOY, PU-PH, Inserm UMR 1092 RESINFIT, Université de Limoges

Rapporteurs

Pr Antoine GUILLON, PU-PH, Inserm UMR 1100 CEPR, Université de Tours

Pr Geneviève HERY-ARNAUD, PU-PH, Inserm UMR 1078 GGB, Université de Brest

Examineurs

Dr Anne JAMET, MCU-PH, Inserm UMR-S1151/CNRS UMR-S8253, Université Paris Descartes

Invités

Pr Olivier BARRAUD, PU-PH, Inserm UMR 1092 RESINFIT – Inserm CIC 1435, Université de Limoges

Dr Bruno FRANÇOIS, PH, Service de Réanimation, CHU Limoges – Inserm CIC 1435, Inserm UMR 1092 RESINFIT, Université de Limoges

*A la mémoire de mon parrain
Et de papy Antoine*

*La science n'est pas l'exercice d'une rationalité de glace.
Les scientifiques sont et ont toujours été des êtres humains créatifs, doués d'émotion,
intuitifs et entiers. Ils posent des questions à propos d'un monde qui n'a jamais été fait pour
être catalogué et classifié.*

Merlin Sheldrake, *Le Monde Caché*

Remerciements

A Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY, vous me faites l'honneur et le plaisir de présider ce travail de thèse. Je vous remercie tellement pour toute la confiance que vous m'avez témoignée ces dernières années. Votre investissement et votre passion pour la Science, la recherche et la microbiologie sont une source d'inspiration permanente. Permettez-moi de vous exprimer ma profonde reconnaissance et mon entière gratitude.

A Monsieur le Professeur Antoine GUILLON, et à Madame le Professeur Geneviève HÉRY-ARNAUD d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de Doctorat. Votre présence aujourd'hui dans ce jury de thèse est un véritable privilège. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements et l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Anne JAMET, de m'avoir fait l'honneur d'être examinatrice de ce travail de thèse. Je vous remercie grandement pour votre formation de bio-informatique qui m'aura été d'une grande utilité pour ces travaux. Croyez en mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Bruno FRANÇOIS, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience clinique sur ce sujet. Je vous remercie également pour toutes nos discussions qui permettent de rapidement mettre en place de nouveaux projets de recherche. Veuillez accepter mes remerciements les plus chaleureux pour cette collaboration.

A Monsieur le Professeur Olivier BARRAUD, directeur de ce travail de thèse. Je te remercie très sincèrement pour toute la confiance, l'esprit et la rigueur scientifique que tu m'as apporté au cours de ces cinq dernières années ! Tu m'as fait découvrir le monde du NGS et de l'analyse bio-informatique, et je crois bien que je suis tombé dans la marmite... Merci pour ton écoute, tes conseils, ta disponibilité et ta réactivité sans faille à toute heure de la journée (et de la nuit). Trouve dans ce manuscrit l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

Rome ne s'est pas faite en un jour, cette thèse non plus : ce fut un vrai travail d'équipe !
Et je dois dire que j'étais particulièrement bien entouré pour la réaliser.

A toute l'équipe de l'UMR Inserm 1092, qui m'a vu grandir depuis le Master 2,
A toute l'équipe de Réanimation et du Centre d'Investigation Clinique du CHU de
Limoges, sans qui ces travaux n'auraient pas vu le jour,
A Émilie Guérin et Valentin Tilloy pour toute l'aide technique, logistique et
bioinformatique concernant les analyses de séquençage haut débit,
A tous mes collègues biologistes et cadres, qui font de mon métier un apprentissage
et un épanouissement quotidien,
A l'URC du laboratoire de BVH, qui m'a bien épaulée sur tous ces projets,
A tous les techniciens, techniciennes et adjoints administratifs du laboratoire qui
m'accompagnent au quotidien et qui partagent la même passion de la Microbiologie,
A Cindy et Isabelle, pour l'aide logistique et administrative,
A Sarah pour toute l'aide fournie lors de la soumission des articles,

MERCI à tous pour votre accompagnement et votre soutien au cours de ces 4 dernières
années. C'est un réel plaisir de travailler ensemble et de faire progresser la Recherche. Soyez
assurés de ma sincère reconnaissance !

Quelques remerciements plus personnels,

Aux « meubles » Margaux, Yohann, Lucie et Mélissa. Merci pour votre présence au
quotidien, pour vos conseils si précieux tout au long de cette thèse et pour nos soirées toujours
gastronomiquement très riches !

A Linda et Mohamed, pour cette amitié si précieuse (vive les bricks, vive les makrouts) !

A tous les amis biologistes du coin : Marine, Marie-Fleur, Yohan, Adé, Maxime,
Guillaume, Sarah et Rémy. Merci pour tous ces moments passés et aux nombreux qui
viendront ! Quel plaisir de voir la famille s'agrandir (coucou Théa et Ellie).

A tous les amis du lycée : Suzanne, Lorelei, Lucie, Murielle, Gaultier, Chloé, Xavier,
Quentin, Julien et Thibaut. Quel bonheur de se retrouver à différents endroits en France ou en
Europe, et de nous voir grandir. Quel chemin parcouru depuis la Seconde 11 ! Notre amitié
est un cadeau que je mesure chaque jour un peu plus !

A toute la famille Meyer et à toute la famille Adolf, pour nos moments partagés si précieux. « La famille c'est là où la vie commence et où l'amour ne finit jamais ».

A ma grand-mère, que j'aime tant, merci pour tout ton amour, et tes gentils e-mails.

A mon formidable frère Pierre, qui m'a toujours accompagné et soutenu tout au long de ces études. Merci d'être toujours là dans les bons moments comme dans les moins bons. Si j'ai réussi jusqu'ici c'est aussi grâce à toi. Merci de m'avoir toujours encouragé à persévérer et à développer la stratégie la plus loufoque pour essayer de te battre (héhé). Nos pauses jeux de société ou Wii resteront sans aucun doute des moments de détente privilégiés qui ont largement contribué à être là où je suis aujourd'hui !

A Ben, qui met des paillettes, des fleurs et du chocolat dans nos vies ! Merci.

A mon cher papa, qui a su me transmettre la passion de la nature, des insectes, des champignons et de tout ce qui bouge. Pourquoi les bactéries ? C'est sûrement grâce à tout ce que tu m'as appris.

A ma douce maman, qui a toujours été là pour me soutenir et pour me conseiller efficacement. Merci infiniment pour tout ton amour.

Merci de m'avoir aidé à construire ma vie. Je vous aime tellement.

A mis suegros Rosa y Juan Guillermo, y a Juan Sebastian por todo su cariño y apoyo incluso desde lejos. Con muchas ganas de descubrir nuevas regiones de Colombia y compartir los dulces sabores de las frutas colombianas.

A Catalina, *mi estrellita*. Ta présence au quotidien est un rayon de soleil. Vivre avec toi est un bonheur qui me fait grandir chaque jour un peu plus. Merci d'être toujours là, de me supporter quand je râle, de m'aider quand je stresse, de m'aimer comme je suis ! Merci pour ce monde que nous construisons ensemble. Te amo tanto mi corazón.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations	15
Introduction	17
Chapitre I. De la colonisation respiratoire à l'infection chez le patient intubé-ventilé ..	19
I.1. La colonisation respiratoire	19
I.1.1. Le tube endotrachéal, acteur de la colonisation respiratoire	19
I.1.2. Différents mécanismes de colonisation respiratoire	20
I.1.2.1. Par l'intermédiaire du tube endotrachéal.....	21
I.1.2.1.1. Impact de la pose du tube endotrachéal.....	21
I.1.2.1.2. Le biofilm bactérien : réservoir de bactéries pathogènes	21
I.1.2.1.3. Colonisation du tube endotrachéal par les bactéries de la flore oro-pharyngée	23
I.1.2.1.4. Impact de la microaspiration bronchique	25
I.1.2.2. Par l'intermédiaire du tractus digestif	25
I.1.2.2.1. Impact de la micro-inhalation de liquide gastrique.....	25
I.2. La trachéobronchite acquise sous ventilation mécanique : une entité clinique aux contours flous	27
I.2.1. Définition et épidémiologie.....	27
I.2.2. Critères diagnostics actuels	27
I.2.3. Faut-il traiter une trachéobronchite ?	28
I.3. La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)	29
I.3.1. Définition	29
I.3.2. Critères diagnostiques	30
I.3.2.1. Diagnostic histologique.....	30
I.3.2.2. Diagnostic clinique.....	31
I.3.2.3. Diagnostic radiologique	31
I.3.2.4. Diagnostic microbiologique.....	32
I.3.2.4.1. Types de prélèvements nécessaires à la documentation microbiologique	33
I.3.2.4.2. Seuils et quantifications des bactéries pathogènes	34
I.3.2.4.3. Les PAVM bactériémiques.....	35
I.3.2.5. Le score CPIS	35

I.3.3. PAVM : les difficultés diagnostiques actuelles	38
I.3.3.1. Grande variabilité des facteurs influençant la survenue de PAVM.....	38
I.3.3.2. Faible sensibilité et/ou spécificité des outils diagnostics	38
I.3.3.3. PAVM ou EAVM ? Vers une complexification des définitions ?	39
I.3.4. Épidémiologie	39
I.3.4.1. Incidence en France et dans le monde	39
I.3.4.2. PAVM précoce, PAVM tardive.....	41
I.3.4.3. Principaux micro-organismes impliqués	42
I.3.4.4. Impact et pronostic	44
I.3.5. Facteurs de risque et prévention du risque infectieux dans la PAVM.....	44
I.3.5.1. Facteurs de risques de survenue de PAVM	44
I.3.5.2. Prévention de la survenue de PAVM : les « <i>VAP bundles</i> »	45
Chapitre II. Évolution du microbiote respiratoire au cours de l'intubation	49
II.1. Définitions et méthodologies d'étude du microbiote respiratoire	49
II.1.1. Origine du mot « microbiome » et « microbiote »	49
II.1.2. Taxonomie bactérienne	50
II.1.3. Méthodologies d'étude du microbiote respiratoire	52
II.1.3.1. La métagénomique ciblée et la métagénomique <i>shotgun</i>	52
II.1.3.2. Les régions variables de l'ARNr16S et stratégie d'amplification	53
II.1.3.3. Les limites de la métagénomique ciblée.....	55
II.1.4. Analyse bioinformatique et génération des abondances relatives	57
II.1.4.1. Regroupement des OTUs ou des ASVs.....	57
II.1.4.2. Analyse de la diversité.....	59
II.1.4.2.1. La diversité alpha.....	59
II.1.4.2.2. La diversité beta.....	59
II.1.5. Analyse statistique des résultats d'assignation taxonomique	61
II.2. Composition et variation du microbiote respiratoire sain	62
II.2.1. Découverte du microbiote respiratoire	62
II.2.2. Facteurs influençant le développement du microbiote respiratoire.....	63
II.2.3. Composition et évolution au cours de la vie	64
II.2.4. Structuration du microbiote respiratoire	65
II.3. Le microbiote respiratoire chez le patient intubé-ventilé.....	67
II.3.1. Intérêt de l'exploration du microbiote respiratoire	67
II.3.2. La cinétique du microbiote respiratoire	68
II.3.2.1. Le concept de dysbiose.....	68
II.3.2.2. Évolution de la diversité et de la composition du microbiote au cours de l'intubation	69

II.3.2.3. Étude du microbiote dans la PAVM : de nouveaux outils prédictifs ?	70
II.3.3. Modification du microbiote : intérêt des probiotiques ?.....	72
II.3.4. Limites de l'étude du microbiote respiratoire	73
Chapitre III. <i>Staphylococcus aureus</i> et PAVM.....	76
III.1. De la contamination autogène à l'infection	76
III.1.1. Caractéristiques générales	76
III.1.2. Impact de la virulence chez <i>S. aureus</i>	77
III.1.3. Les PAVM à <i>S. aureus</i>	82
Objectifs du travail de thèse	85
Premier travail : Suivi cinétique du microbiote respiratoire chez les patients intubés-ventilés en Réanimation : étude SCORPIUS.....	86
Second travail : Évaluation cinétique exhaustive des outils cliniques et microbiologiques pour améliorer le diagnostic de la PAVM précoce : étude INSPIRE	108
Troisième travail : Analyse génomique de souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées au niveau respiratoire chez des patients intubés-ventilés : étude SSUPREM.....	144
Discussion	175
Perspectives	186
Conclusion.....	188
Références bibliographiques	189
Annexes	212

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma (A) du tractus respiratoire supérieur et inférieur et (B) du positionnement de la sonde d'intubation orotrachéale.	20
Figure 2 : Physiopathologie de la transcolonisation bactérienne médiée par le tube endotrachéal.....	24
Figure 3 : Algorithme du diagnostic clinico-radiologique actuel permettant de différencier une TAVM d'une PAVM au lit du malade.....	28
Figure 4 : Continuum conduisant classiquement au développement d'une PAVM chez le patient intubé-ventilé.	29
Figure 5 : Exemple de deux radiographies pulmonaires d'un même patient à l'admission (à gauche) et au moment du diagnostic de PAVM (à droite).....	32
Figure 6 : Algorithme actuel de la prise en charge des prélèvements respiratoires au laboratoire de Microbiologie.	33
Figure 7 : Évolution de l'incidence des pneumopathies (en bleu) et des bactériémies (en rouge) dans les services de Réanimation en France.	41
Figure 8 : Proportion de pathogènes retrouvés dans l'étude SENTRY en Europe de l'Ouest, en Europe de l'Est et aux Etats-Unis entre 2016 et 2019.	43
Figure 9 : Différents rangs taxonomiques du domaine des procaryotes et exemples des principaux taxons retrouvés au niveau du microbiote respiratoire.	51
Figure 10 : Différence de préparation des bibliothèques entre métagénomique ciblée (à gauche) et métagénomique <i>shotgun</i> (à droite).	53
Figure 11 : Structure et organisation du gène codant l'ARNr 16S.	54
Figure 12 : Pipeline général d'analyse des données de métagénomique ciblée.	57
Figure 13 : Exemple d'affiliation taxonomique obtenue pour un échantillon respiratoire après amplification du gène de l'ARNr16S par la technologie Ion Torrent.	58
Figure 14 : Exemple de calcul de richesse et de diversité pour deux échantillons.	60
Figure 15 : Exemple d'analyses statistiques couramment effectuées à partir des distances de Bray-Curtis pour évaluer l'impact d'une ou plusieurs metadatas.	61
Figure 16 : Nombre de recherches Pubmed comprenant les mots « <i>respiratory microbiota</i> » et « <i>lung microbiota</i> », effectué en Janvier 2024.....	62
Figure 17 : Physiologie et variation de l'environnement le long du tractus respiratoire.	63
Figure 18 : Graphique schématisant l'hypothèse du « modèle insulaire ».....	66
Figure 19 : Scores pronostics et courbes de ROC basés sur les abondances relatives de certains genres bactériens de la flore oro-pharyngée retrouvés dans le microbiote respiratoire des patients intubés-ventilés pour (A) le diagnostic de pneumopathie acquise à l'hôpital et (B) pour le pronostic d'extubation.....	71
Figure 20 : (A) Photographie d'une culture pure de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu gélosé au sang de mouton après 24h d'incubation. A noter la franche hémolyse bêta autour des colonies. (B) Photographie d'une coloration de Gram d'une hémoculture positive à <i>S. aureus</i> avec un regroupement typique de cocci à Gram positif en amas.	76

Figure 21 : Principaux facteurs de virulence retrouvés chez <i>S. aureus</i>	78
Figure 22 : Nouvelles stratégies thérapeutiques anti <i>S. aureus</i> en développement.	84
Figure 23 : Présentation du protocole global de l'étude SCORPIUS, du recueil à l'analyse des échantillons.....	87
Figure 24 : Exemple d'une culture positive à <i>S. aureus</i> et <i>H. influenzae</i> (à gauche) et d'une culture négative (à droite).....	87
Figure 25 : Protocole général d'amplification et de séquençage des régions variables du gène codant l'ARNr16S.....	88
Figure 26 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) de la composition du microbiote respiratoire.	91
Figure 27 : Analyse canonique en coordonnée principale (CAP) selon (A) le scenario au troisième jour ou selon (B) le scenario au jour de survenue de la PAVM.	92
Figure 28 : Présentation du protocole global de l'étude INSPIRE du recueil à l'analyse des échantillons.	108
Figure 29 : Évolution du microbiote au cours des 72 premières heures de ventilation mécanique chez un patient colonisé à <i>S. aureus</i> (à gauche) et chez un patient présentant une PAVM à <i>S. aureus</i> à 48 heures (flèche noire à droite).....	142
Figure 30 : Évolution du logarithme de l'abondance quantitative du microbiote du patient présentant une PAVM.	143
Figure 31 : Principales étapes du protocole du recueil des échantillons au séquençage des isolats de <i>S. aureus</i>	145
Figure 32 : Synthèse des résultats obtenus au cours de nos travaux et proposition d'une hypothèse physiopathologique.....	184

Table des tableaux

Tableau 1 : Critères utilisés pour calculer le CPIS.	37
Tableau 2 : Principaux facteurs de risque de survenue d'une PAVM.	45
Tableau 3 : Présentation des « <i>VAP bundles</i> » ou actions préventives mises en place pour prévenir l'apparition de la PAVM en service de soins critiques.....	47
Tableau 4 : Actions remises en question et généralement non recommandées pour prévenir l'apparition de la PAVM.	48
Tableau 5 : Différentes définitions physiologiques du terme « microbiome ».	49
Tableau 6 : Principales modifications taxonomiques ayant eu un impact sur l'interprétation des études de microbiote conduites dans la littérature scientifique	52
Tableau 7 : Principales protéines de surface permettant l'adhésion et l'échappement à la réponse immunitaire chez <i>S. aureus</i>	79
Tableau 8 : Principales enzymes et impact sur la virulence chez <i>S. aureus</i>	80
Tableau 9 : Principales toxines observées chez <i>S. aureus</i> responsables de la cytotoxicité.	81

Liste des abréviations

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
AET	Aspiration endotrachéale
ARN	Acide ribonucléique
ARN16S	ARN ribosomique 16S
ASV	Variante de séquence d'amplicon (<i>Amplicon Sequence Variant</i>)
ATS	<i>American Thoracic Society</i>

B

BAM	Fichier <i>binary alignment map</i>
BMR	Bactérie multi-résistante
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive

C

CAP	Analyse canonique en coordonnée principale
CC	Complexe clonal
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CPIS	Score clinique d'infection pulmonaire (<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>)
CRP	C- reactive protéine

E

EAVM	Évènement acquis sous ventilation mécanique
ELISA	Dosage d'immunoabsorption enzymatique

F

FDA	<i>Food and drug administration</i>
FiO ₂	Fraction inspirée d'oxygène

I

IB	Index bactériologique
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IMC	Indice de masse corporelle
IPP	Inhibiteur de pompe à proton
ITS	Espaceur interne transcrit (<i>Internal transcribed spacer</i>)

L

LBA	Liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire
-----	--------------------------------------

M

MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
mmHg	millimètre de mercure

N

NETs	Pièges extracellulaires des neutrophiles (<i>Neutrophil extracellular traps</i>)
------	--

O

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTU	Unité taxonomique opérationnelle (<i>Operationnal taxonomic unit</i>)

P

PaO ₂	Pression partielle en oxygène
PAVM	Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
pb	paire de bases
PCA	Analyse en composantes principales
PCoA	Analyse en coordonnées principales
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEEP	Pression expiratoire positive
PNN	Polynucléaire neutrophile

Q

qPCR	PCR quantitative
------	------------------

S

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SNP	Polymorphisme nucléotidique (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
ST	Type de séquence

T

TAVM	Trachéobronchite acquise sous ventilation mécanique
TE	Tube endotrachéal

U

UFC	Unité formant colonie
-----	-----------------------

V

VM	Ventilation mécanique
----	-----------------------

Liste des communications et publications en lien avec le Doctorat

Premier travail : étude SCORPIUS	
Article scientifique	Meyer S , Gaïa N, Lazarevic V, Schrenzel J, François B, Barraud O; SCORPIUS study group. Could daily changes in respiratory microbiota help predicting early <i>Staphylococcus aureus</i> ventilator-associated pneumonia? Intensive Care Med Exp. 2023 Jun 23;11(1):34. doi: 10.1186/s40635-023-00521-7. Lettre à l'éditeur
Communication poster	Congrès ECCMID 2020 – Paris, France - Présentation Poster P1318 Meyer S , Daix T, Francois B, Chainier D, Gay A, Ploy M-C, Vignon P, Barraud O. Next generation sequencing for kinetics of the respiratory microbiota of ICU intubated patients.

Second travail : étude INSPIRE	
Article scientifique	Danche E*, Meyer S* , Guichard E, Hernandez-Padilla AC, Fedou AL, Vignon P, Barraud O, François B. Evolution of tracheobronchial colonization following tracheal intubation in neuro-injured ventilated patients: the INSPIRE study. CHEST Critical Care, 2024, doi: 10.1016/j.chstcc.2024.100075.
Communication orale	Congrès de la Société de Réanimation de la Langue Française – Paris, Juin 2022 - Flash Communication FC-131 Meyer S , Danche E, Guichard E, Hernandez AC, Fedou AL, Vignon P, Barraud O, François B. Endotracheal bacterial kinetic changes from intubation to onset of pneumonia during mechanical ventilation: the core of VAP pathophysiology? Congrès de la Société de Réanimation de la Langue Française – Paris, Juin 2022 - Flash Communication FC-243 Danche E , Meyer S , Guichard E, Hernandez AC, Fedou AL, Vignon P, Barraud O, François B. Volume variation of endotracheal aspirates to predict onset of ventilator-associated pneumonia. Better than CPIS?

* co-first authors

Troisième travail : étude SSUPREM	
Article scientifique	Meyer S , Hernandez-Padilla A-C, Fedou A-L, Daix T, Chainier D, Ploy M-C, Vignon P, François B, Barraud O. Comparative genomic analysis of respiratory <i>Staphylococcus aureus</i> isolates from ICU mechanically ventilated patients <i>En cours de soumission</i>
Communication orale	Congrès ECCMID 2021 – Vienna, Autriche, Avril 2021 Communication orale 02964 « From genotype to pathotype » Meyer S , Fedou A-L, Daix T, Chainier D, Hernandez-Padilla A-C, Ploy M-C, Vignon P, François B, Barraud O. Whole Genome Sequencing for characterization of respiratory <i>Staphylococcus aureus</i> isolates in the Intensive Care Unit. Journées d'Animation Scientifique FéRI 2022 – Paris, Juillet 2022 Session 1 : Mécanismes de virulence et adaptation hôte-pathogène Meyer S , Fedou A-L, Daix T, Chainier D, Hernandez-Padilla A-C, Ploy M-C, Vignon P, François B, Barraud O. Whole genome sequencing of consecutive respiratory <i>S. aureus</i> isolates in the ICU: the SSUPREM study.
Communication poster	Congrès Microbiology Day – Bordeaux , Juin 2022 Présentation Poster P9 Meyer S , Fedou A-L, Daix T, Chainier D, Hernandez-Padilla A-C, Ploy M-C, Vignon P, François B, Barraud O. Whole genome sequencing of consecutive respiratory <i>S. aureus</i> isolates in the ICU: the SSUPREM study.

Autres travaux : Revue de la littérature	
Article scientifique	Meyer S , Hernandez AC, Barraud O. Le rôle des bactéries anaérobies dans la survenue de la Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. Rev Francoph Lab 2020;2020:32–9. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(20)30355-5 .

Introduction

La ventilation mécanique (VM) est un système de compensation des fonctions respiratoires défaillantes. Elle permet de mettre au repos les muscles respiratoires du patient et de prendre en charge tout ou partie du travail ventilatoire. La VM peut être réalisée avec des techniques non invasives à l'aide d'un masque facial, nasal ou nasobuccal, ou avec des techniques invasives par l'intermédiaire d'une intubation orotrachéale ou nasotrachéale. L'intubation orotrachéale est classiquement préférée chez les patients en phase critique ou en apnée car elle est plus rapidement réalisée. Les patients hospitalisés en Réanimation sont placés sous VM invasive afin de palier à une défaillance respiratoire, neurologique ou multiviscérale impactant les fonctions ventilatoires. La mise sous VM peut durer pendant plusieurs jours, semaines ou mois selon la gravité du tableau clinique. L'objectif prioritaire est la correction de l'hypoxémie et la sortie de VM n'est possible qu'après stabilisation et récupération des fonctions ventilatoires du patient.

Le risque infectieux chez les patients hospitalisés en service de Réanimation est élevé avec une incidence d'infection associée aux soins estimée entre 20 et 30% [1]. Cela est principalement lié aux caractéristiques endogènes motivant l'admission des patients mais également à une exposition accrue aux dispositifs invasifs tels que la VM. La stabilisation clinique des patients critiques, tout en empêchant le développement d'infections secondaires liées à l'utilisation de ces dispositifs invasifs, constitue un enjeu majeur en Réanimation. Pour ce faire, une surveillance étroite des patients est nécessaire, et une discussion clinico-biologique efficace est primordiale pour détecter et traiter, le plus rapidement, les éventuelles complications infectieuses. L'utilisation d'antibiotiques est, de ce fait, importante en service de Réanimation. Dans un objectif de réduction de la consommation d'antibiotiques, une meilleure compréhension des mécanismes de survenue de ces infections est indispensable pour diminuer la pression de sélection antibiotique, mais également pour envisager d'autres thérapeutiques anti-infectieuses ne perturbant pas ou peu les microbiotes du patient. Le risque de complications sous antibiothérapie reste effectivement élevé avec la sélection de bactéries multi-résistantes ou encore le risque de colites à *Clostridioides difficile*. Ainsi, ce travail s'inscrit dans une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques liés au microbiote et à la microbiologie des prélèvements respiratoires afin de mieux identifier les patients à risques de développer une infection respiratoire sous VM.

Chapitre I. De la colonisation respiratoire à l'infection chez le patient intubé-ventilé

I.1. La colonisation respiratoire

« *Adhésion, Prolifération, Invasion, Dissémination* ». Ces quatre étapes cruciales dans le cycle d'une infection bactérienne sont indéniablement rythmées par le processus de colonisation, première étape essentielle sans laquelle ce cycle ne s'enclenche pas [2]. La colonisation bactérienne est définie comme la rencontre d'une bactérie avec une surface - typiquement un épithélium chez l'Homme - où elle pourra adhérer par l'intermédiaire des acides teichoïques, lipoteichoïques et des différentes glycoprotéines présentes à la surface de sa paroi. Dans la plupart des cas, les défenses immunitaires de l'hôte ainsi que les communautés microbiennes locales qui composent le microbiote, empêchent l'installation des éventuels pathogènes, et contrôlent voire limitent la réplication des bactéries. Néanmoins, chez le patient intubé-ventilé, un certain nombre de ces réponses physiologiques sont altérées, entraînant un risque infectieux important.

I.1.1. Le tube endotrachéal, acteur de la colonisation respiratoire

Lors de la VM, la sonde d'intubation endotrachéale est une interface essentielle entre le patient et le respirateur. Elle permet d'acheminer l'oxygène jusqu'aux voies pulmonaires inférieures, allant de la trachée aux alvéoles pulmonaires (Figure 1A). Mais la présence du tube endotrachéal (TE) perturbe les mécanismes physiologiques permettant l'évacuation des sécrétions bronchiques. Plus particulièrement, le TE maintient l'épiglotte en position ouverte, ce qui altère le réflexe de la toux et la clairance muco-ciliaire (Figure 1B) [3]. En outre, la sédation, appliquée pour limiter la douleur, assurer la myorelaxation et faciliter la VM peut engendrer une immunosuppression et altérer d'autant plus les réflexes neurologiques de la toux. L'ascenseur muco-ciliaire et la toux sont des défenses locales primordiales dans l'évacuation des particules et des microorganismes respiratoires [4]. L'altération de cette fonction engendre un risque infectieux accru chez ces patients par accumulation et prolifération des micro-organismes et autres déchets cellulaires.

De plus, comme tout matériel, la présence du TE au niveau des voies respiratoires engendre de l'inflammation locale et des microlésions provoquées par la sonde sur la muqueuse trachéale [5,6]. Ces lésions conduisent à des difficultés respiratoires et vocales post extubation chez plus de 80% des patients [7]. Durant l'intubation, ces lésions sont

principalement localisées au niveau du positionnement du ballonnet et peuvent se manifester par un érythème léger jusqu'à une ulcération profonde [8].

Plusieurs types de sondes endotrachéales existent. La plupart des sondes sont composées de polychlorure de vinyle (PVC) ou de polyuréthane et utilisent un ballonnet permettant le maintien de la sonde au niveau de la trachée (Figure 1B). Il a été montré que le type de sonde, sa rigidité ou la forme du ballonnet peuvent conditionner la fréquence de survenue des complications liées à l'intubation prolongée [9].

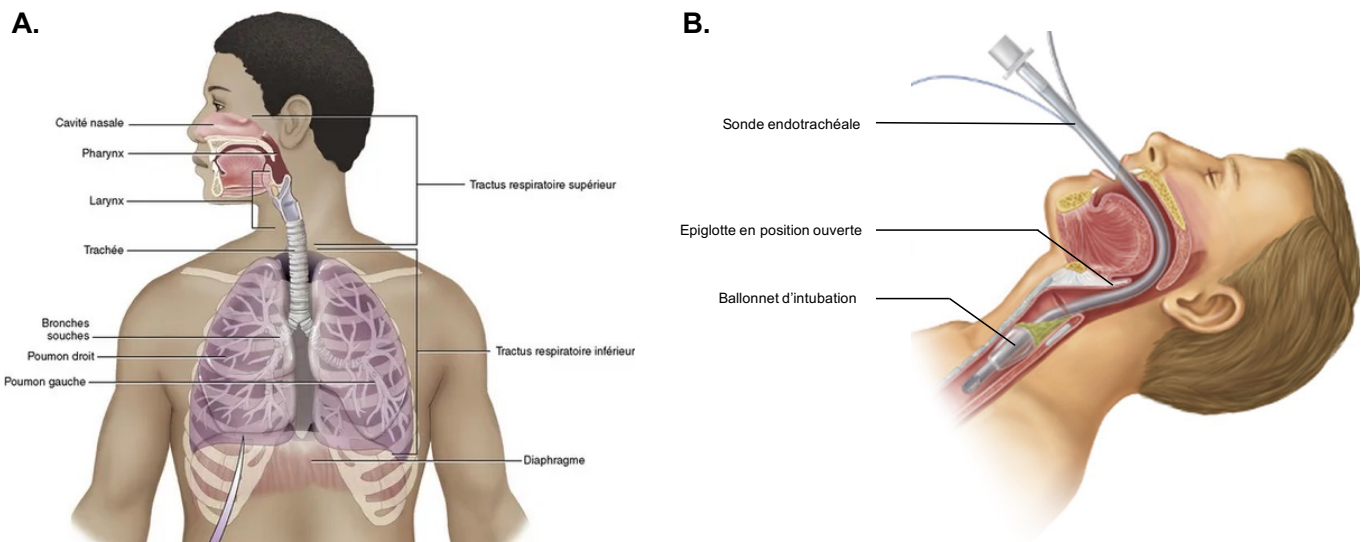


Figure 1 : Schéma (A) du tractus respiratoire supérieur et inférieur et (B) du positionnement de la sonde d'intubation orotrachéale.

1.1.2. Différents mécanismes de colonisation respiratoire

La compréhension des mécanismes de colonisation est essentielle dans l'objectif de prévenir tout processus infectieux chez les patients intubés-ventilés. La colonisation respiratoire par une bactérie potentiellement pathogène, comme le *S. aureus*, représente un risque important de survenue d'infection respiratoire [10, 11]. Les bactéries colonisant les voies respiratoires inférieures peuvent provenir de plusieurs origines, principalement des voies respiratoires supérieures mais également du tractus digestif de par la continuité anatomique de l'oropharynx. Ce processus est appelé transcolonisation et est consécutif à plusieurs facteurs qui dépendent, pour la plupart, de la présence du TE. Deux étapes sont classiquement décrites : d'abord, une altération microbiologique des flores orales, oro-pharyngées, gastriques et œsophagiennes, puis une altération des voies respiratoires inférieures par inhalation de microorganismes à partir du TE.

I.1.2.1. Par l'intermédiaire du tube endotrachéal

I.1.2.1.1. Impact de la pose du tube endotrachéal

La pose du TE est en soi un geste invasif, difficile et nécessitant une certaine expertise. Le passage du tube par l'oropharynx entraîne inévitablement un déplacement des sécrétions et bactéries des voies respiratoires supérieures vers les voies respiratoires inférieures, ce qui participe aux premières étapes de la colonisation respiratoire.

De plus le mauvais positionnement de la sonde peut favoriser le risque microbien, en particulier si la sonde est placée trop profondément (intubation endobronchique) ou au niveau de l'œsophage (intubation œsophagienne). Ces mauvais positionnements sont retrouvés chez environ 10 à 20% des patients [12], et ont été associés à une tendance à l'augmentation du risque infectieux [13]. Ils résultent très souvent d'une pose dans un contexte d'urgence absolue ou du manque de matériel à disposition. L'intubation préhospitalière peut également participer à l'inoculation de bactéries environnementales, mais son impact dans la survenue d'un processus infectieux ne semble pas avéré [14,15].

I.1.2.1.2. Le biofilm bactérien : réservoir de bactéries pathogènes

La principale source de colonisation bactérienne des voies respiratoires inférieures est médiée par le TE. Les bactéries adhèrent en effet beaucoup plus facilement aux surfaces inertes qu'aux épithéliums. La surface interne de la sonde endotrachéale offre également un environnement unique de forces de cisaillement élevées, d'écoulement bidirectionnel et d'environnement immunologique restreint, ce qui favorise une forme de vie bactérienne sessile plutôt que planctonique. Le TE est, de ce fait, une très bonne matrice pour la formation de biofilm. Cela a été très largement documenté dès les années 1970s [16–18]. En moins de 24 heures, le tube est rapidement colonisé et un biofilm commence à s'y développer [19]. La formation du biofilm est un processus dynamique, qui nécessite une maturation. Le risque de survenue d'évènements infectieux a d'ailleurs été associé au niveau de développement du biofilm [20]. Un biofilm mature a ainsi plus de risque de générer une pneumopathie, et cela qu'importe la durée de VM.

Adair *et al.* ont montré qu'une correspondance était retrouvée entre pathogènes présents dans le biofilm du TE et dans les sécrétions endotrachéales des patients développant une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) [21]. Bien que réalisée sur un faible nombre de patients, cette étude démontre le rôle important du biofilm comme agent pourvoyeur de bactéries pathogènes. D'autres études ont par la suite confirmé ces résultats

sur de plus grandes cohortes [22]. Par ailleurs, Danin *et al.* ont confirmé qu'il n'existait pas de variation de la culture microbiologique en fonction de la section du TE étudiée. La colonisation semble donc homogène le long du tube [23].

Le biofilm endoluminal, sous l'effet de la pression exercée par le respirateur, peut se détacher du tube et être directement aérosolisé dans les voies pulmonaires inférieures, ce qui participe activement à la colonisation des poumons [18,24]. Récemment, une étude française menée par Maldiney *et al.*, a étudié par microscopie confocale les TE récupérés après extubation des patients. Dans leur analyse, seule l'épaisseur du biofilm était significativement associée à la survenue d'une PAVM [25]. En revanche, cette étude n'a été réalisée qu'à partir de TE récupérés à l'extubation et non au jour de survenue de l'évènement infectieux, ce qui peut avoir été impacté par le délai de VM ou l'utilisation d'antibiotiques. L'étude du biofilm du TE reste ainsi très difficile, principalement à cause de la complexité de collecter les échantillons avant la sortie de VM du patient. Il est également très difficile de réaliser des études dynamiques pourtant essentielles dans l'acquisition de connaissance de la physiopathologie de colonisation du TE.

Thorarinsdottir *et al.* ont démontré en 2020 que le pathogène responsable d'évènements infectieux persistait au sein du biofilm du TE dans plus de 56% des cas et cela malgré la mise en place d'une antibiothérapie adaptée [26]. Le développement de stratégies de contrôle de la formation du biofilm à la surface du TE est donc nécessaire. Certaines études ont évalué l'intérêt de l'amélioration des matériaux composant le TE tel que le silicone, ou l'enrobage du tube par une fine couche de métal noble (or, argent, platine) [26,27], ou bien par le développement de mécanismes optiques de suivi continu de la formation de biofilm à l'aide de fibres optiques [28]. Cette dernière technologie pourrait permettre de mieux comprendre la formation du biofilm à la surface du TE dans un futur proche. Néanmoins, des études complémentaires doivent être réalisées car actuellement ces technologies ne sont pas recommandées par les guides de consensus internationaux par manque de preuves suffisantes [29].

Ainsi, le biofilm développé à la surface du TE agit comme un promoteur de la colonisation bactérienne des voies respiratoires inférieures et un réservoir important de bactéries potentiellement pathogènes. Il existe une continuité entre la colonisation respiratoire, la formation de biofilm et le développement d'une PAVM. Le biofilm s'impose comme un mécanisme de persistance bactérienne et de réponse altérée au traitement dans la PAVM [22].

I.1.2.1.3. Colonisation du tube endotrachéal par les bactéries de la flore oro-pharyngée

Le TE est directement responsable de la translocation des bactéries de la sphère respiratoire supérieure vers les voies respiratoires inférieures. Plusieurs études ont montré un rôle prépondérant de la flore oropharyngée dans la composition du biofilm du TE, et plus particulièrement des bactéries composant la plaque dentaire. Dès les années 1990s, les bactéries de la plaque dentaire ont été identifiées comme source probable de bactéries responsables de la formation du biofilm et de la colonisation respiratoire des patients intubés-ventilés [30–32]. La quantité de plaque dentaire chez ces patients augmente [33,34], et est également accompagnée d'une augmentation de l'inflammation gingivale. Un possible lien entre infections respiratoires et périodontite a d'ailleurs rapidement émergé [35], faisant modifier la prévention de la survenue d'évènements infectieux avec la mise en place de protocoles de décontamination oropharyngée (voir chapitre 1.3.5.2. Prévention de la survenue de la PAVM : les *VAP bundles*).

En effet, les bactéries de la plaque dentaire sont capables de rapidement former du biofilm et de produire des glycoprotéines permettant l'adhésion d'autres micro-organismes (Figure 2A) [36]. En outre, la présence de pathogènes, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* a été retrouvée précocement au niveau de la plaque dentaire [37]. La colonisation peut donc débuter par l'adhésion de bactéries au niveau du biofilm de la plaque dentaire avant de descendre dans les voies respiratoires inférieures par l'intermédiaire du TE.

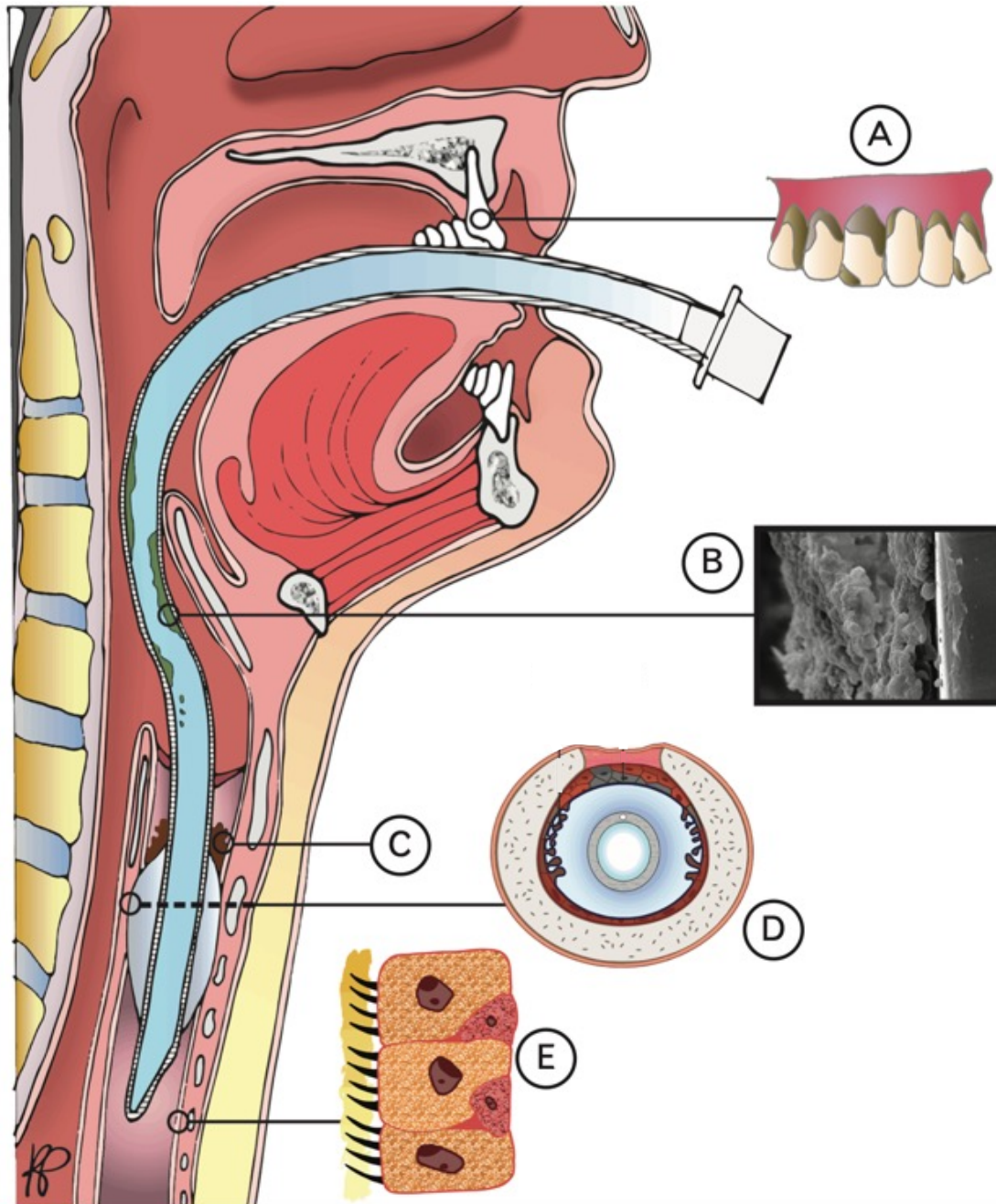


Figure 2 : Physiopathologie de la transcolonisation bactérienne médiée par le tube endotrachéal.

Figure reproduite d'après [36]

(A) La flore de la plaque dentaire est une source majeure de bactéries retrouvées au niveau des voies respiratoires inférieures et un réservoir important de bactéries pathogènes. (B) Les bactéries de la flore oropharyngée migrent et adhèrent au tube endotrachéal, ce qui permet l'adhésion d'autres micro-organismes et la formation d'un biofilm dense. (C) et (D) L'accumulation des sécrétions trachéales d'origine oropharyngée et digestive en amont du ballonnet contribue à l'encombrement et à la microaspiration de sécrétions vers les voies inférieures. (E) La présence du tube endotrachéal perturbe les mécanismes de réflexe de la toux et de l'ascenseur mucociliaire.

I.1.2.1.4. Impact de la microaspiration bronchique

Le ballonnet du TE est essentiel pour maintenir la sonde d'intubation en place. Il est également primordial pour empêcher le passage des sécrétions respiratoires vers les poumons, qui descendent vers les voies respiratoires inférieures du fait de la gravité et de la perte de l'ascenseur mucociliaire (Figure 2C). Un écoulement de sécrétions depuis le ballonnet peut cependant exister suite à différents facteurs [36,38] :

- Une accumulation trop importante de sécrétions trachéales en amont du ballonnet,
- Une pression inadéquate du ballonnet (trop élevée par création de lésions de l'épithélium de la trachée ou trop basse par perte d'étanchéité),
- Un repliement du ballonnet impacté par l'anatomie de la trachée du patient,
- Des mouvements du TE survenant selon les mouvements exercés par le patient ou le personnel soignant lors des soins.

La microaspiration de sécrétions trachéales est donc un facteur important de survenue d'évènements infectieux et cela a été démontré à plusieurs reprises [39,40]. Rello *et al.* ont, par exemple, démontré qu'une fuite du ballonnet est un facteur de risque important d'évènement infectieux dans les huit premiers jours de VM [41].

Pour diminuer cette fuite, l'utilisation de nouveaux ballonnets « anti-fuites » étanches à double couche a montré chez l'animal des résultats intéressants avec une baisse importante du passage de bactéries dans les voies respiratoires inférieures (27% de colonisation contre 92% dans le groupe contrôle) et une diminution de la survenue d'évènements infectieux [42]. Une méta-analyse préconisant l'utilisation de ballonnets à pression continue a également démontré un intérêt à prévenir la microaspiration et le risque infectieux qui en découle [43].

De ce fait, les aspirations endotrachéales en amont du ballonnet doivent être évacuées de façon pluriquotidienne, et cela fait désormais partie des recommandations de prévention du risque infectieux en Réanimation bien que le niveau de preuve reste encore limité.

I.1.2.2. Par l'intermédiaire du tractus digestif

I.1.2.2.1. Impact de la micro-inhalation de liquide gastrique

Outre la microaspiration de sécrétions orotrachéales, il a été démontré que des bactéries d'origine digestive peuvent coloniser les voies respiratoires inférieures en remontant l'œsophage [44]. Ce phénomène s'effectue par micro-inhalation de liquide gastrique et peut être favorisé par la présence d'une sonde naso-gastrique [45], bien que ceci reste encore

débatu [46] [47]. Il est néanmoins très difficile de différencier l'origine de la contamination, et la part d'aspiration gastrique ou oropharyngée varie grandement en fonction des études.

Le dosage dans les prélèvements respiratoires de la pepsine, produite au niveau gastrique, a par exemple permis de détecter une aspiration gastrique dans près de 90% des patients suivis dans l'étude de Metheny *et al.* [46]. De plus, dans cette même étude, les patients qui n'avaient pas développé de processus infectieux présentaient un pourcentage d'aspirats contaminés par de la pepsine de manière beaucoup moins importante. Par un procédé similaire, Nseir *et al.* ont démontré que l'application d'une pression continue du ballonnet d'intubation diminuait significativement la quantité de pepsine retrouvée au niveau des poumons et réduisait ainsi la micro-inhalation de liquide gastrique [48].

Par ailleurs, Feldman *et al.* ont montré que la cinétique de colonisation des bactéries au niveau digestif s'effectuait préférentiellement entre 36 et 60 h post-intubation, bien que cela puisse survenir à tout moment selon le positionnement et les mouvements du patient [49].

La micro-inhalation gastrique est couramment admise dans la littérature bien qu'il soit extrêmement difficile de déterminer son poids dans la part de bactéries colonisant les voies respiratoires inférieures.

I.2. La trachéobronchite acquise sous ventilation mécanique : une entité clinique aux contours flous

La colonisation et l'infection ne sont pas deux états binaires indépendants mais plutôt issues d'un continuum dont la limite est très difficile à définir [50]. Dans le cas du patient intubé-ventilé, la trachéobronchite acquise sous ventilation mécanique (TAVM) est l'illustration parfaite de cet état transitoire entre colonisation et infection. Son diagnostic, sa prise en charge et l'attitude thérapeutique peuvent fortement différer selon les études et peu de données et recommandations sont disponibles dans la littérature.

I.2.1. Définition et épidémiologie

La TAVM peut être définie comme une altération de la physiologie pulmonaire localisée aux voies respiratoires supérieures et sans retentissement sur l'imagerie pulmonaire. Actuellement, la TAVM est très mal définie, il n'existe d'ailleurs pas de gold standard, ce qui complique le recueil de données épidémiologiques fiables [51]. La séparation diagnostique de la TAVM avec la colonisation respiratoire ou la PAVM est dorénavant bien reconnue dans la littérature, en particulier grâce à l'analyse de coupes histopathologiques de patients post-mortem [52] ainsi qu'à l'analyse microbiologique des prélèvements respiratoires [53]. Néanmoins, la limite entre colonisation et TAVM reste incomprise et un processus intermédiaire encore non identifié permet le développement vers la trachéobronchite voire vers l'infection [54].

L'épidémiologie rapportée de la TAVM est très variable selon les études, allant de 0% à près de 20% des patients intubés-ventilés, mais plusieurs études d'envergure l'estiment plutôt aux alentours des 10 à 15% [55].

I.2.2. Critères diagnostics actuels

Le diagnostic de la TAVM est basé sur les mêmes critères que la PAVM (confère chapitre 1.3.2. *Critères diagnostiques de la PAVM*) à l'exception de l'apparition ou de la détérioration d'un infiltrat pulmonaire à la radiographie thoracique (Figure 3). Cependant, l'apparition de petits infiltrats ou opacités à la radiographie peuvent passer inaperçus et un scanner thoracique devrait être requis pour confirmer l'absence d'infiltrat [56], ce qui est exceptionnellement réalisé en routine. La plupart de ces éléments étant soumis à une certaine subjectivité, le diagnostic de la TAVM est donc sujet à l'appréciation du réanimateur.

La TAVM a néanmoins des effets sur le devenir du patient. Plusieurs études ont retrouvé que les patients développant une TAVM présentaient une durée de VM et une durée

de séjour en soins critiques augmentées ou encore un risque accru de survenue de PAVM [55,57–59].

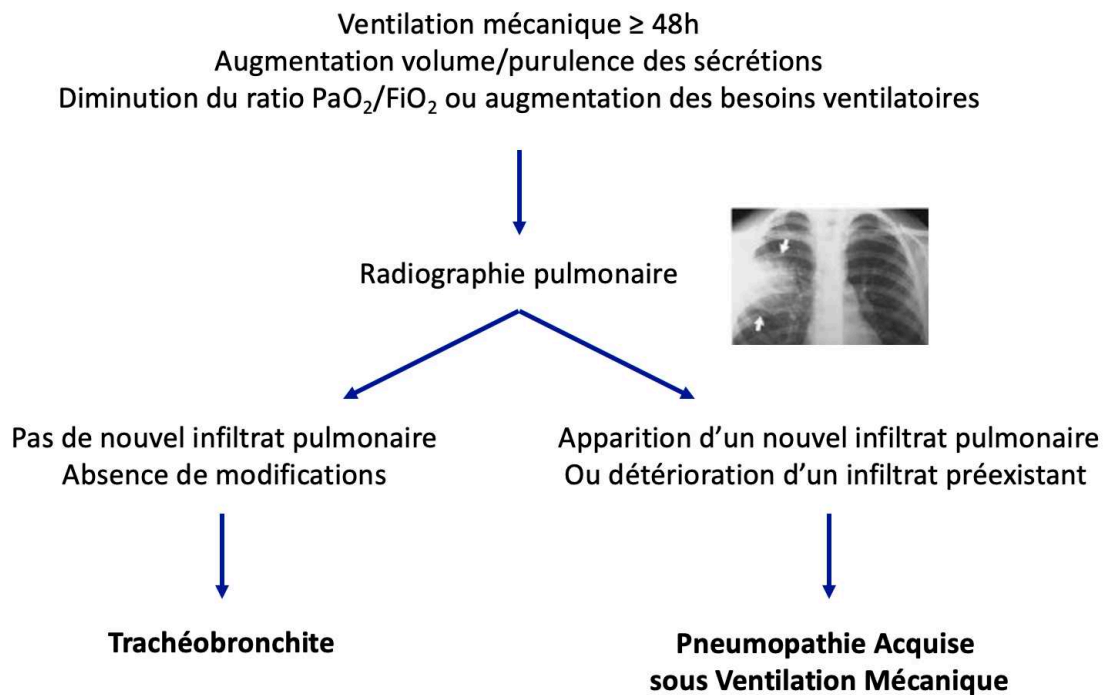


Figure 3 : Algorithme du diagnostic clinico-radiologique actuel permettant de différencier une TAVM d'une PAVM au lit du malade.

Adapté et traduit d'après [60]

I.2.3. Faut-il traiter une trachéobronchite ?

Après avoir démontré l'impact de la TAVM sur le devenir des patients, la question du traitement de la TAVM s'est naturellement posée dans le débat scientifique au cours du début du 21^{ème} siècle. Torres et Valencia suggèrent, en 2005, « qu'il existe des preuves indirectes soutenant l'administration d'antibiotiques aux patients atteints de TAVM » [56]. Par la suite, plusieurs études vont venir confirmer l'impact d'une antibiothérapie adaptée pour réduire la survenue de complications respiratoires chez ces patients [61–63]. L'étude TAVeM publiée en 2015 confirme sur une large cohorte l'impact d'une antibiothérapie adaptée sur la réduction du nombre de pneumopathies avec un odd ratio estimé à 0.21 [95%CI 0.11-0.41] [55]. L'utilisation d'antibiotiques en nébulisation a également été suggérée bien qu'elle ne fasse actuellement pas consensus [64,65].

En l'absence de consensus internationaux, le diagnostic tout comme l'instauration, le choix et la durée de traitement antibiotique de la TAVM restent à la discrétion du clinicien.

I.3. La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)

La complication infectieuse majeure du patient intubé-ventilé en Réanimation demeure la PAVM. Elle fait suite aux étapes de contamination, colonisation, multiplication et invasion des bactéries au niveau du parenchyme pulmonaire et constitue l'étape physiopathologique qui succède à la trachéobronchite (Figure 4).

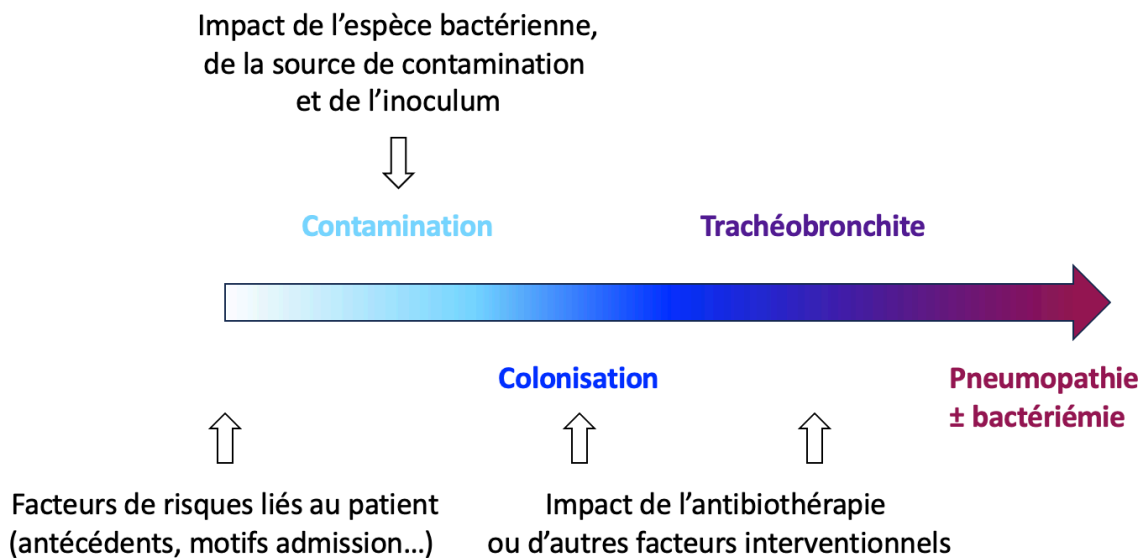


Figure 4 : Continuum conduisant classiquement au développement d'une PAVM chez le patient intubé-ventilé.

Chaque étape peut être plus ou moins longue et dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques (voir chapitre 1.3.5. Facteurs de risque et prévention du risque infectieux dans la PAVM).

I.3.1. Définition

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (ou PAVM) est avant tout la principale infection associée aux soins survenant en service de Réanimation chez les patients intubés-ventilés [66]. Elle représente environ 80% des pneumopathies nosocomiales contractées en Réanimation, les 20% restants étant principalement des pneumopathies acquises à l'hôpital chez des patients non intubés-ventilés [67]. La PAVM est définie comme toute infection du parenchyme pulmonaire survenant chez un patient placé depuis au minimum 48 heures sous VM ou au maximum 48 heures après son retrait. Ces délais sont issus de la définition même d'une infection associée aux soins établie par le CDC. Plus de 95% des PAVM décrites sont d'origine bactérienne, elles peuvent exceptionnellement être d'origine virale

(CMV, grippe), fongique (*Candida spp*) ou toxique, mais la littérature n'est pas claire sur ce sujet au vu du très faible nombre de cas rapportés [68,69].

La définition de la PAVM mais surtout les critères diagnostiques permettant de la suspecter ont depuis longtemps, et restent toujours, soumis à débat [66]. En effet, il n'existe toujours pas, en 2024, de gold standard pour la définition et le diagnostic de la PAVM. Cela complexifie grandement la comparaison des critères d'inclusion, des résultats et des éventuels impacts thérapeutiques des études cliniques portant sur la PAVM. Un travail conséquent d'harmonisation a été entrepris au début des années 2000s en Europe par le groupe de travail européen HELICS-ICU (*Hospitals in Europe Link for Infection Control through Surveillance*), ce qui a permis de réaliser un état des lieux de la PAVM et de générer de premières recommandations européennes [70]. Néanmoins, les définitions européennes et américaines ne sont pas complètement homogènes, ce qui peut biaiser les résultats de certaines études.

I.3.2. Critères diagnostiques

Le diagnostic de la PAVM est difficile. Il repose essentiellement sur une association de critères cliniques, radiologiques et microbiologiques. D'autres critères ont été décrits dans la littérature, mais ne permettant pas un diagnostic de certitude.

I.3.2.1. Diagnostic histologique

L'histologie a été un critère de diagnostic utilisé par certaines équipes et basé sur l'analyse histologique de biopsies pulmonaires. Les études histologiques conduites ont retrouvé dans la PAVM un infiltrat tissulaire de polynucléaires neutrophiles (PNN), un exsudat de fibrine ainsi que des débris cellulaires dans le compartiment intra-alvéolaire en particulier au niveau des bronchioles terminales. Ces modifications sont typiques de ce qui est retrouvé au niveau pulmonaire lors d'une invasion bactérienne [71]. Il s'agit très souvent d'analyses réalisées post-mortem sur une série de patients [72]. Ce type d'étude a permis de montrer que la PAVM a une localisation très souvent multifocale et implique généralement les deux poumons avec une prédominance des segments inférieurs et postérieurs [52,73]. De plus, la PAVM touche différents sites pulmonaires ayant différentes phases d'évolution de la maladie au même moment, ce qui démontre un caractère spatio-temporel très important dans la PAVM [67].

La difficulté de ce type de diagnostic est bien entendu la disponibilité des échantillons (caractère invasif) et la difficulté d'applicabilité à la routine hospitalière. La subjectivité du résultat lié à l'expérience et l'œil de l'anatomopathologiste est également un frein à son

utilisation. Enfin, le temps de rendu des résultats d'anatomopathologie n'est pas adapté à la situation de l'urgence, ce qui empêche l'utilisation en routine de l'histologie dans le diagnostic de la PAVM. De ce fait, ce type de diagnostic n'est aujourd'hui pas recommandé [67].

I.3.2.2. Diagnostic clinique

La PAVM est suspectée devant l'apparition de signes cliniques généraux témoignant d'un processus infectieux en cours. A cela est également associé des modifications de certains paramètres biologiques. Les recommandations européennes et américaines considèrent ainsi comme « évaluations cliniques » [74] :

- La mesure de la température corporelle,
- Le volume des sécrétions trachéales et leur aspect (purulence),
- La mesure du ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$,
- Le décompte des leucocytes sanguins.

Classiquement, une hyper- ou hypothermie, une augmentation de la purulence des sécrétions, une hyperleucocytose et une diminution du ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ sont observées durant la PAVM. Le ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ permet de classifier la sévérité d'une hypoxie lors de troubles du rapport ventilation/perfusion au niveau pulmonaire donnant lieu à un effet shunt. Une valeur inférieure à 300 mmHg signifie une altération des échanges gazeux dans les poumons.

Individuellement, ces paramètres ont une très mauvaise sensibilité et spécificité dans le diagnostic de la PAVM. En effet, dans la plupart des cas, la survenue d'une fièvre, d'une hyperleucocytose ou de modifications du ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ est consécutive à une cause non infectieuse. La majorité des patients gravement malades présentent des caractéristiques d'inflammation systémique quel que soit leur motif d'admission [75]. Une fièvre ou une hyperleucocytose sont ainsi des signes très fréquemment retrouvés chez les patients de réanimation.

I.3.2.3. Diagnostic radiologique

La radiologie est un critère important dans le diagnostic de la PAVM avec l'apparition ou la progression d'un infiltrat pulmonaire. Un exemple d'infiltrat est présenté Figure 5. L'évaluation radiologique est un des principaux arguments permettant de différencier une TAVM d'une PAVM. Il est admis que la performance de la radiographie portative est nettement inférieure au scanner thoracique, qui reste le gold standard dans le diagnostic de la PAVM [67,74]. Néanmoins la difficulté de transfert des patients intubés-ventilés vers le scanner continue de limiter son utilisation, en particulier du fait du nombre important de complications

hémodynamiques, respiratoires ou infectieuses pouvant survenir durant ou après le transfert [76].

La radiographie reste donc l'outil diagnostique le plus utilisé en pratique courante. Mais son interprétation est délicate et la détection d'un infiltrat peut varier selon l'expérience du clinicien. L'étude de Nseir *et al.* a retrouvé que la radiographie était anormale dans 38% des cas à l'admission, ce qui peut compliquer la détection d'un infiltrat [62]. De plus, une autre étude, dans les pneumonies communautaires cette fois, a retrouvé que près de 30% de résultats faux positifs ou faux négatifs sont rapportés avec la radiographie comparativement au scanner thoracique [77].

La radiographie n'est donc pas un outil diagnostique idéal bien qu'elle soit toujours massivement utilisée à défaut d'avoir d'autres outils plus performants et adaptables au patient de réanimation.

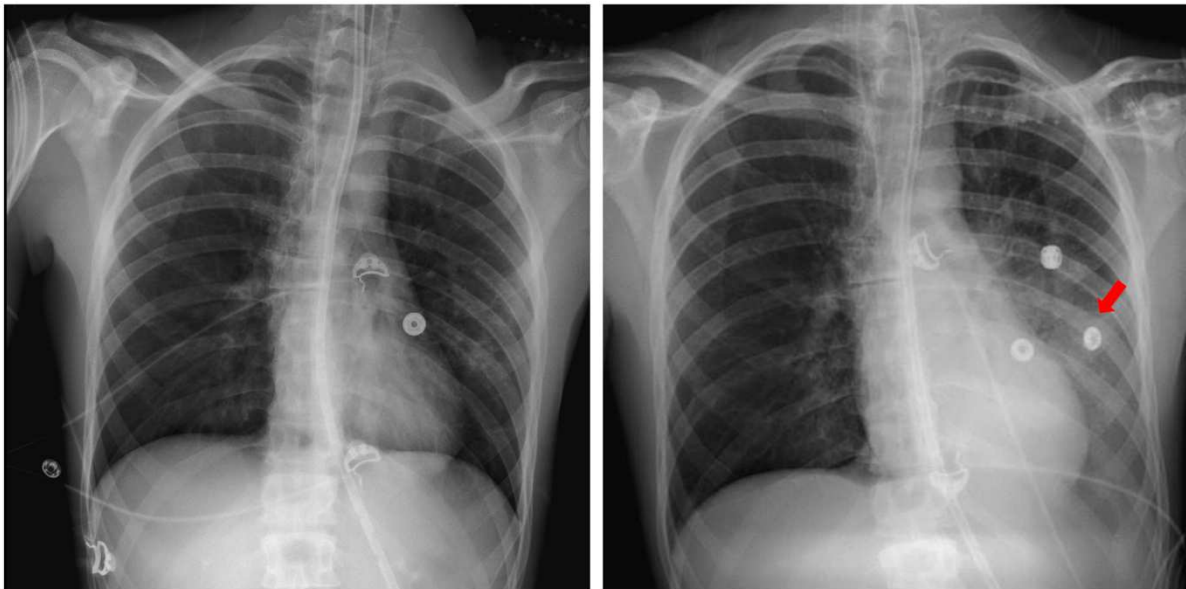


Figure 5 : Exemple de deux radiographies pulmonaires d'un même patient à l'admission (à gauche) et au moment du diagnostic de PAVM (à droite).

La flèche rouge montre l'apparition d'un foyer de condensation alvéolaire localisé en base gauche par rapport à la radiographie d'entrée. Cette image est typique d'une décompensation respiratoire observée notamment dans la PAVM.

1.3.2.4. Diagnostic microbiologique

Aux critères cliniques et radiologiques s'ajoutent des critères microbiologiques essentiels pour identifier le pathogène responsable de la survenue de la PAVM mais également pour obtenir l'antibiogramme permettant l'adaptation du traitement antibiotique (Figure 6). Le rendu du résultat est toujours limité par les temps de la culture bactérienne, bien

que des tests de PCR multiplex ont vu le jour pour essayer d'améliorer le rendu du résultat. Ici encore, peu de consensus font foi tant sur le type d'échantillon à prélever que sur le seuil de quantification microbiologique. L'intérêt des tests multiplex est également largement remis en question et peut conduire à une antibiothérapie abusive [78].

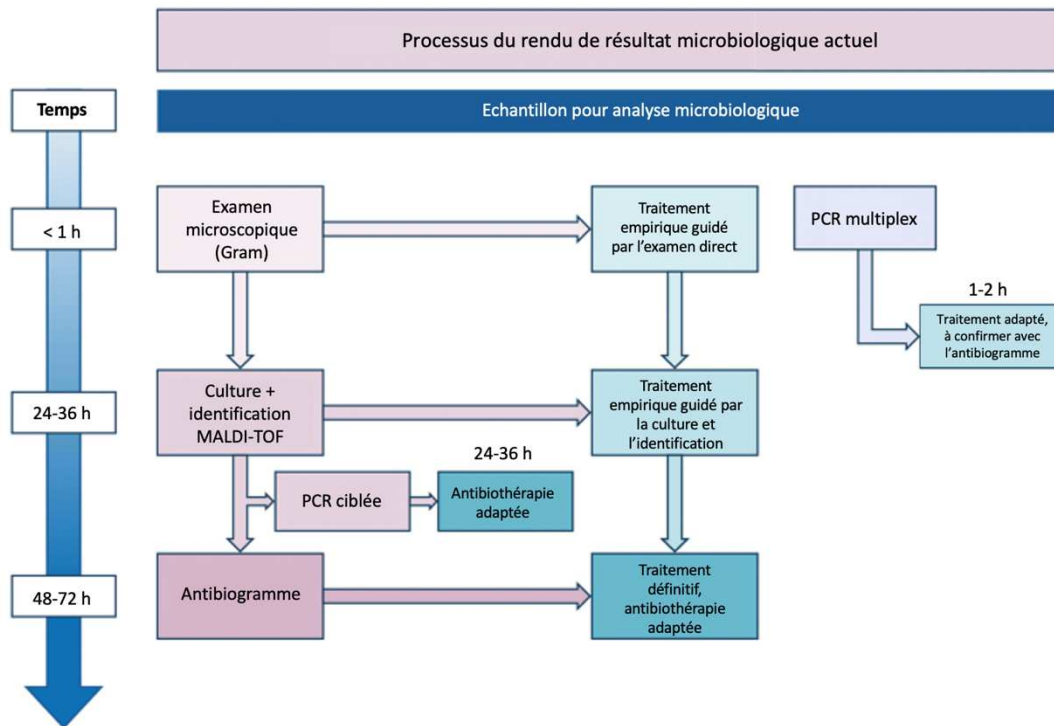


Figure 6 : Algorithme actuel de la prise en charge des prélèvements respiratoires au laboratoire de Microbiologie.

Figure adaptée et traduite d'après [66].

La culture microbiologique nécessite un temps d'identification et de rendu de l'antibiogramme important pour permettre l'incorporation de ces résultats dans l'algorithme décisionnel du diagnostic et du traitement de la PAVM. De nouvelles techniques de PCR multiplex ont vu le jour pour diminuer ce temps diagnostic mais leur coût, leur manque d'exhaustivité et le risque de surdiagnostic (et donc de surconsommation d'antibiotiques) sont un frein majeur à leur applicabilité.

1.3.2.4.1. Types de prélèvements nécessaires à la documentation microbiologique

Un prélèvement respiratoire est classiquement nécessaire pour documenter l'infection. Un prélèvement profond tel qu'un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) ou un brosseage télescopique protégé est en général recommandé pour documenter spécifiquement les bactéries présentes au niveau des bronches et des alvéoles pulmonaires infectées. Plusieurs études ont montré un avantage en termes de survie ou de consommation d'antibiotiques

lorsque le diagnostic était effectué par un prélèvement invasif [79–81]. Cependant, le caractère invasif chez des patients particulièrement instables peut contre-indiquer sa réalisation. Il peut également être difficile d'avoir accès 24h/24 à un personnel formé aux gestes de la bronchoscopie. De ce fait, d'autres équipes prônent plutôt la réalisation de prélèvements plus hauts dans les voies respiratoires tels qu'un prélèvement d'aspiration endo-trachéale (AET), pour notamment documenter la colonisation trachéo-bronchique [82,83]. La détection précoce des patients fortement colonisés au niveau respiratoire permettrait ainsi de mieux prédire les patients à risque de développer une PAVM [84]. Les recommandations internationales américaines et européennes illustrent parfaitement l'absence de consensus sur les critères microbiologiques : la première prônant des prélèvements d'AET et la seconde des prélèvements plus profonds type LBA pour diagnostiquer la PAVM [74,85,86]. Des différences de recommandations entre les institutions d'un même pays peuvent également exister (par exemple entre la FDA et la CDC aux États-Unis).

D'autres équipes ont émis l'hypothèse qu'une sonication des prélèvements respiratoires pourrait être envisagée pour améliorer le diagnostic [87], mais peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce point.

Au-delà du type de prélèvement, certaines études démontrent un biais important lié aux protocoles de prélèvement appliqués pouvant varier d'un hôpital à l'autre selon le niveau de recours à la bronchoscopie [88] ou encore selon la variabilité liée à l'opérateur. D'autres études ont également retrouvé une très faible reproductibilité des prélèvements respiratoires. Enfin, des valeurs de sensibilité et de spécificité inférieures à 80% pour le diagnostic de la PAVM ont été retrouvées, quel que soit le type de prélèvement effectué [85,89].

1.3.2.4.2. Seuils et quantifications des bactéries pathogènes

L'utilisation d'index et de seuils bactériologiques est ancienne. Dès 1985, de premiers travaux relatent la création d'un « index bactériologique » (IB) ou « index de Johanson » correspondant à la somme des logarithmes des quantifications des pathogènes retrouvés dans les prélèvements respiratoires [90]. Cet index a été repris dans la définition historique du CPIS participant au diagnostic de la PAVM si un $IB \geq 5$ était présent [91]. Néanmoins, cet index a rapidement été abandonné au profit de seuils de quantification fixes calculés selon le nombre de colonies bactériennes présentes sur les milieux gélosés et retrouvées à partir d'un volume fixe d'échantillon respiratoireensemencé (en général 10 μ L). Ces seuils ont été proposés en 1994 et 1995 et sont toujours les mêmes actuellement [92,93]. Les seuils retenus varient selon le type d'échantillon avec un seuil qui sera plus faible pour les prélèvements profonds. Ainsi Aubas *et al.* proposaient un seuil à 10^4 UFC/ml (Unité Formant Colonie) pour les prélèvements de LBA et Papazian *et al.* un seuil à 10^5 UFC/ml pour les prélèvements d'AET.

Aujourd'hui encore, les sociétés savantes européennes et francophones de Microbiologie préconisent ces seuils [94,95]. Par ailleurs, seule une culture en aérobose (atmosphère ambiante et atmosphère enrichie en CO₂) est recommandée, écartant l'analyse des bactéries anaérobies au niveau respiratoire. Peu de données sont ainsi disponibles quant à l'évolution de la flore respiratoire anaérobie au cours de l'intubation par manque de données microbiologiques.

Bien que ces valeurs de cut-off aient été fréquemment remises en question au vu de leurs faibles sensibilité et spécificité [96], elles continuent d'être utilisées à défaut de pouvoir se fier à d'autres critères microbiologiques. Pire, elles n'ont jamais vraiment été ré-évaluées alors que des progrès importants dans la détection des bactéries en microbiologie ont eu lieu ces vingt dernières années.

I.3.2.4.3. Les PAVM bactériémiques

Le parenchyme pulmonaire est un tissu extrêmement vascularisé qui permet l'oxygénation et les échanges gazeux du sang. Il est de ce fait, une porte d'entrée idéale pour les micro-organismes vers le compartiment sanguin. Lors d'une PAVM, les hémocultures sont retrouvées positives dans près de 10% des cas avec des variations allant de 8% à 20% selon les études réalisées [97,98].

La présence d'une bactériémie devant une suspicion de PAVM peut permettre de confirmer ou de conforter le diagnostic, en particulier si la bactérie est retrouvée conjointement dans les prélèvements respiratoires. Cela permet d'augmenter la précision du diagnostic et de l'antibiothérapie [99]. Néanmoins, la présence d'hémoculture positive isolée n'est pas un bon outil diagnostique dans la PAVM comme l'ont rappelé Luna *et al.* [100]. En effet, les hémocultures positives peuvent également révéler un autre point d'appel infectieux (autre que respiratoire) et infirmer le diagnostic de PAVM potentiellement suspecté devant la présence de signes cliniques aspécifiques (fièvre, hyperleucocytose, syndrome inflammatoire...).

I.3.2.5. Le score CPIS

En 1991, Pugin J. *et al.* ont décidé de combiner six des paramètres cliniques, radiologiques et microbiologiques dans un score diagnostique dénommé CPIS (*Clinical and Pulmonary Infection Score*). Le CPIS a initialement été créé afin de comparer les performances techniques des prélèvements invasifs versus les prélèvements non invasifs pour différencier la colonisation de la PAVM [91]. Ainsi, les patients ayant un CPIS ≥ 6 avaient simultanément un index bactériologique ≥ 5 , ce qui définissait le stade de l'infection. Il a par la suite été repris

et modifié (parfois appelé « CPIS modifié ») afin de réaliser le diagnostic clinique de la PAVM, en particulier pour mieux cibler l'antibiothérapie initiale, l'arrêt précoce de l'antibiothérapie et la prévision du pronostic clinique [101]. A la suite des premiers travaux portant sur le CPIS modifié, celui-ci a rapidement été repris par les sociétés savantes (telles l'ATS/IDSA) pour favoriser le diagnostic de la PAVM.

Le Tableau 1 reprend les différents critères utilisés ainsi que le score associé selon la présence de chaque paramètre. Le CPIS peut atteindre un maximum de 12 points et un score positif est considéré au-delà de 6 points. Dans les travaux initiaux de Pugin J. *et al.*, un score strictement supérieur à 6 était associé à une survenue de PAVM avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 100%, mais cette étude ne portait que sur 28 patients. D'autres travaux ont rapidement démontré que la sensibilité et la spécificité étaient bien plus basses - entre 70 et 80% pour la sensibilité et entre 40 et 80% pour la spécificité - [92,102]. Cela dépend également grandement de la population étudiée avec, chez des patients neuro-lésés ou chez les grands-brûlés, une sensibilité (61% et 30%, respectivement) et une spécificité (43% et 80% respectivement) bien plus faibles [103,104].

Malgré cela, le CPIS reste aujourd'hui encore un score très utilisé à défaut d'avoir d'autres outils plus performants. Il est régulièrement questionné, réévalué mais toujours enseigné et employé au lit du malade comme dans la littérature [105,106]. Son utilisation, bien que répandue, doit être soumise à la plus grande prudence. La littérature pointe particulièrement du doigt la grande variabilité liée à l'interprétation de certains paramètres du CPIS tels que la purulence des sécrétions, la lecture des radiographies ou encore le décompte des seuils microbiologiques [107]. Une des principales faiblesses du CPIS est qu'il est mesuré à un seul instant et non de façon cinétique. Gaudet *et al.* l'ont d'ailleurs souligné en questionnant l'intérêt du CPIS pour différencier, par exemple, une TAVM d'une PAVM et s'il pouvait apporter suffisamment d'information à un seul moment donné [106].

Tableau 1 : Critères utilisés pour calculer le CPIS.

Paramètre	Score
Température, en °C ≥ 36.5 et ≤ 38.4 ≥ 38.5 et ≤ 38.9 ≥ 39.0 ou ≤ 36.5	0 point 1 point 2 points
Décompte des leucocytes (/mm³) ≥ 4 000 et ≤ 11 000 < 4 000 ou > 11 000 Présence de leucocytes immatures (« <i>band cells</i> ») ≥ 500	0 point 1 point + 1 point
Aspect des sécrétions trachéales Absence de sécrétions Présence de sécrétions – non purulentes Présence de sécrétions – purulentes	0 point 1 point 2 points
Niveau d'oxygénation – ratio PaO₂/FiO₂ (en mmHg) >240 ou présence d'une détresse respiratoire aigüe ≤240 et pas de signe de syndrome de détresse respiratoire	0 point 2 points
Radiographie pulmonaire Absence d'infiltrat Présence d'un infiltrat diffus Présence d'un infiltrat localisé	0 point 1 point 2 points
Culture microbiologique de l'échantillon pulmonaire (en UFC/ml) Absence de bactérie pathogène ou culture < 10 ⁴ (LBA) ou < 10 ⁵ (AET) Culture positive ≥ 10 ⁴ (LBA) ou ≥ 10 ⁵ (AET) Même bactérie pathogène observée à la coloration de Gram	0 point 1 point + 1 point

I.3.3. PAVM : les difficultés diagnostiques actuelles

I.3.3.1. Grande variabilité des facteurs influençant la survenue de PAVM

Comme décrit précédemment, la PAVM n'est pas une entité franche mais est issue d'un continuum entre colonisation et infection, qui résulte d'une combinaison de facteurs liés :

- à l'hôte (motif d'admission, immunité, génétique du patient...),
- aux micro-organismes (pathogène(s) impliqué(s), facteurs de virulence exprimés, cinétique de colonisation...),
- à la ventilation mécanique (pression partielle en oxygène, positionnement et type de sonde endotrachéale...),
- aux co-infections potentielles (infections virales en particulier) et/ou aux traitements associés (antibiotiques utilisés pour autre infection, immunosuppresseurs, ...),
- à l'environnement (écologie microbienne du service).

Le nombre de facteurs influençant la survenue d'une PAVM est considérable et il est extrêmement difficile d'obtenir une population homogène lors d'études cliniques. Cette particularité du patient de Réanimation est un frein majeur à l'élaboration de consensus et de critères diagnostiques fiables.

I.3.3.2. Faible sensibilité et/ou spécificité des outils diagnostics

Une méta-analyse réalisée en 2020 conduite sur 25 études regroupant plus de 1600 patients a permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité des différents critères diagnostiques de la PAVM comme la présence d'une fièvre, de sécrétions purulentes, d'un infiltrat pulmonaire à la radiographie ou d'une culture microbiologique positive dans les aspirats endotrachéaux [89]. Il a été retrouvé des valeurs de sensibilité et de spécificité inférieures à 80% pour l'intégralité des paramètres cliniques étudiés, à l'exception de la sensibilité de la radiographie (sensibilité de 88,9%, spécificité de 26,1%), tandis que les valeurs de spécificité étaient très souvent catastrophiques (inférieures à 40%). La présence d'un CPIS > 6 était également associée à de faibles sensibilité et spécificité (73,8% et 66,4%, respectivement). La conclusion de cette méta-analyse est sans appel et démontre clairement qu'aucun outil diagnostique actuel n'est suffisamment performant pour poser efficacement un diagnostic de PAVM.

Par ailleurs, l'étude de Ego *et al.* a habilement démontré que selon les critères diagnostiques appliqués, le nombre de PAVM diagnostiquées variait fortement et qu'il était donc très difficile de comparer les centres entre eux et les études entre elles [108]. Quand bien même la plupart des critères utilisés sont similaires, il reste toujours une interprétation subjective de certains facteurs comme la radiographie ou l'aspect des sécrétions trachéales.

A côté de cela, d'autres paramètres biologiques ont été étudiés comme facteurs diagnostics de la PAVM. Néanmoins, les recommandations actuelles européennes et américaines déconseillent l'utilisation de ces paramètres biologiques comme la CRP, la procalcitonine, la copeptine, le MR-proANP (*mid-regional pro-atrial natriuretic peptide*) ou encore le sTREM-1 (*soluble triggering receptor expressed on myeloid cells*) dans le diagnostic de la PAVM. Ces marqueurs ont montré individuellement un bénéfice diagnostic mais trop peu d'études les ont véritablement évalués avec parfois des efficacités critiquables.

Ainsi en 2024, aucun paramètre suffisamment performant ne permet d'améliorer le diagnostic ni la prédiction de la PAVM.

I.3.3.3. PAVM ou EAVM ? Vers une complexification des définitions ?

Plutôt que de se focaliser sur le diagnostic de PAVM, plusieurs équipes ont conseillé de surveiller l'apparition d'évènements associés à la ventilation mécanique (EAVM) [109,110]. Cette définition a d'ailleurs été créée et publiée en 2013 par le CDC. Ces évènements seraient plus faciles à identifier et seraient soumis aux mêmes conditions de survenue que ceux de la PAVM. Une condition d'EAVM est identifiée lorsque survient une aggravation de la fonction pulmonaire (augmentation des niveaux de FiO₂ ou des pressions expiratoires positives sur plus de 2 jours) après une période de stabilité ou d'amélioration pulmonaire de plus de 3 jours [111]. Le diagnostic d'EAVM s'affranchit de la subjectivité d'interprétation de la radiographie. L'identification précoce de ces conditions permet de repérer plus rapidement les évènements et les complications infectieuses et non-infectieuses survenant chez les patients sous VM (par exemple : atélectasie, pneumothorax, embolie pulmonaire...). La définition même d'un EAVM était de pouvoir être objectif, reproductible, automatisable et de pouvoir fortement prédire les issues défavorables [112].

La concordance entre EAVM et PAVM reste cependant assez faible selon certaines études et son intérêt a été à plusieurs reprises remis en question [113–115]. Elle complexifie également les définitions actuelles et peut amener à une certaine confusion auprès des cliniciens et dans les études cliniques menées ou dans les méta-analyses.

I.3.4. Épidémiologie

I.3.4.1. Incidence en France et dans le monde

La PAVM représente 80% des épisodes de pneumonie nosocomiale en Réanimation [74]. Elle touche environ 5 à 40% des patients intubés-ventilés dans le monde avec de très grandes variations dépendantes de la région étudiée, des motifs d'admission ou encore des critères utilisés dans la définition même de la PAVM. Ainsi l'incidence rapportée est plus faible

aux Etats-Unis (1 à 4 cas pour 1000 jours de VM) qu'en Europe (10 à 20 cas pour 1000 jours de VM) [88,116]. Une étude du consortium international du contrôle des infections nosocomiales (INICC) a clairement démontré que le taux d'incidence des EAVM variait en fonction du type de Réanimation. Il a par exemple été retrouvé que les patients admis pour causes neurologiques telles que les traumatismes crâniens graves ou les hémorragies méningées, ont une incidence de PAVM pouvant atteindre 40% [117,118] mais avec une grande variabilité selon les études conduites [119]. Cook *et al.* ont estimé que l'incidence quotidienne varie dans le temps, avec un risque de PAVM plus élevé au début de l'intubation (risque estimé à 3% les cinq premiers jours de VM) qu'à la fin (risque estimé de 2% entre les jour cinq et dix puis de 1% au-delà) [120].

Il reste toutefois très difficile de connaître la vraie incidence de la PAVM aujourd'hui. Cela varie grandement selon les critères diagnostiques appliqués [121]. Certaines études décrivent des taux de PAVM, d'autres d'EAVM, parfois en nombre d'évènements pour 1000 jours de VM ou encore en pourcentage, ce qui complexifie la comparaison des données épidémiologiques. L'incidence de la PAVM semble cependant légèrement diminuer voire se stabiliser au fil du temps, probablement grâce à l'amélioration des stratégies de prévention au cours du temps.

En France, les dernières données du groupe REA-REZO sur l'année 2022 montrent une incidence cumulée de pneumopathies liées à l'intubation de 15,67% et une incidence cumulée de 21,80 pour 1000 jours d'intubation, ce qui suit l'épidémiologie mondiale (Figure 7)[122]. Cette incidence, restée constante pendant plusieurs années aux environs des 15%, a flambé lors de l'épidémie de SARS-CoV-2 depuis 2020, où le nombre d'EAVM a considérablement augmenté. Les patients intubés-ventilés admis pour détresse respiratoire aiguë consécutive à une infection au SARS-CoV-2 développent fréquemment des PAVM qui sont difficiles à différencier entre une décompensation respiratoire liée au virus ou à une véritable infection bactérienne [123]. Hors contexte épidémique, l'incidence de la PAVM reste globalement constante dans les services de Réanimation français.

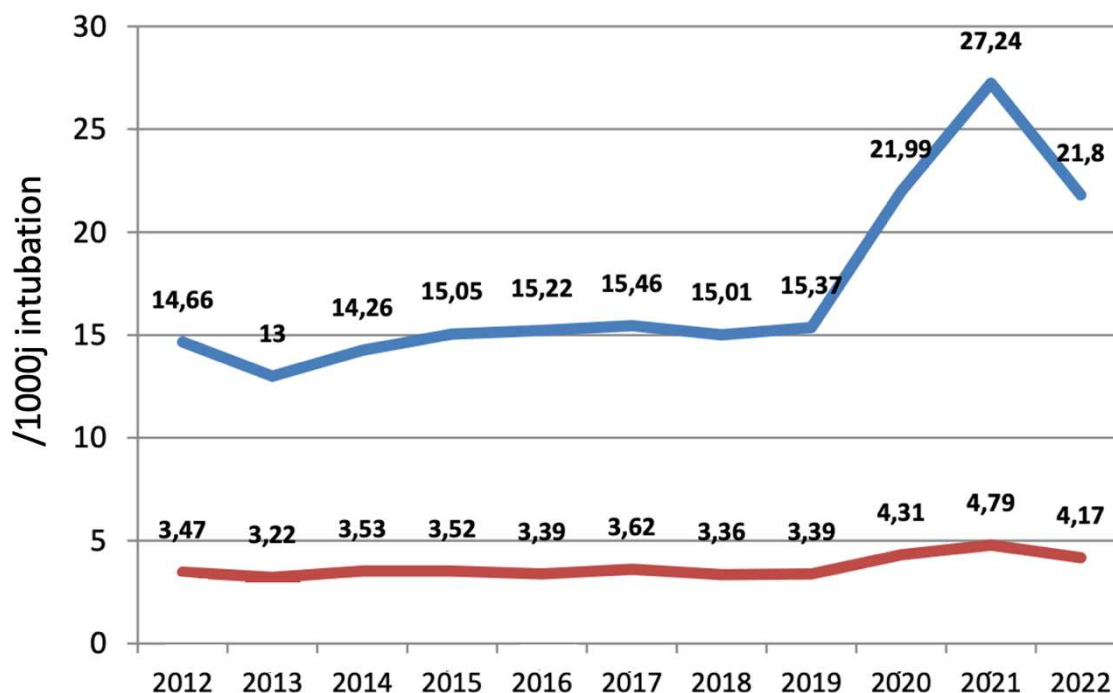


Figure 7 : Évolution de l'incidence des pneumopathies (en bleu) et des bactériémies (en rouge) dans les services de Réanimation en France.

Rapport publié en 2023 sur les données 2022 du réseau REA-REZO [122].

L'incidence des PAVM et des bactériémies reste stable en France aux alentours de 15%. On notera cependant l'augmentation de l'incidence liée à l'épidémie de SARS-CoV-2 entre 2020 et 2022.

1.3.4.2. PAVM précoce, PAVM tardive

Depuis la fin des années 1980s, la notion de temporalité dans la survenue de PAVM a émergé. En effet, Langer *et al.* ont démontré que l'incidence de survenue d'une PAVM était plus élevée lors des cinq premiers jours suivant l'intubation, ce qui a permis de distinguer et de définir les PAVM précoces (moins de 5 jours) et les PAVM tardives (plus de 7 jours), la transition entre 5 et 7 jours étant sujette à débat [124]. Ibrahim *et al.* ont rapporté un taux plus élevé de PAVM précoces (56%) que de PAVM tardives (44%)[125]. Par conséquent, le risque de PAVM semble être plus élevé au cours des premiers jours d'intubation en particulier chez les patients sédatisés ou admis pour un traumatisme crânien, bien qu'une PAVM puisse survenir à tout moment de l'intubation.

Cette distinction entre PAVM précoce et tardive a parfois été remise en question dans la littérature [126], mais elle reste toujours utilisée aujourd'hui. En revanche, le délai de différenciation entre ces deux entités reste très discuté, certaines études les différenciant à 4 jours [127], 5 jours [128], 6 jours [129], ou 7 jours après le début de l'intubation [130,131], voire même parfois après le début de l'hospitalisation [132].

La distinction PAVM précoce/PAVM tardive tient également du fait des bactéries pathogènes retrouvées. Classiquement, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae* ont plutôt tendance à être associés aux PAVM précoces, tandis que les Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii* sont plus fréquemment retrouvées lors de PAVM tardives [132]. Cependant, ceci n'est pas systématique [128,133], et s'explique probablement par la variabilité du cut-off permettant de distinguer PAVM précoce/PAVM tardive mais également du type de patients et de l'écologie des services de réanimations étudiées.

Enfin, cette distinction PAVM précoce/PAVM tardive a pendant longtemps permis d'estimer le risque de présence de bactéries multirésistantes (BMR). Cela a conduit à la mise en place de plusieurs recommandations thérapeutiques en fonction du délai de survenue de l'infection, et de l'écologie microbienne retrouvée dans chaque Réanimation [134,135]. Cependant, d'autres données sont venues contredire ces recommandations [128,136], ce qui précise la grande variabilité observée selon les pays, les critères d'inclusion et les populations de patients étudiées.

I.3.4.3. Principaux micro-organismes impliqués

La vaste cohorte SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program* – a investigué en Europe de l'Ouest, en Europe de l'Est et aux USA la prévalence des principales bactéries retrouvées dans différentes entités cliniques y compris dans la PAVM [137]. La Figure 8, adaptée de cette étude, décrit les proportions des 12 principaux pathogènes documentés dans les pneumonies acquises en Réanimation (principalement représentées par les PAVM). Ainsi, il apparaît que 10 de ces 12 bactéries sont des bacilles à Gram négatif représentant 61,5 à 76,1% des isolats retrouvés aux USA ou en Europe, respectivement.

En Europe, *Pseudomonas aeruginosa* est retrouvé à la première place, suivi de plusieurs Enterobacterales telles que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ou *Serratia marcescens* puis de *Haemophilus influenzae* et de *Acinetobacter baumannii*. Parmi les bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* sont retrouvés dans ce top 12. *S. aureus* est très fréquemment responsable de PAVM, notamment précoces, dans 20,1 à 27,3% des cas, occupant ainsi la deuxième (ou première place) selon les études. D'autres travaux réalisés dans différents pays et différents types de services de réanimation confirment ces données avec une prédominance de PAVM à *S. aureus* et *P. aeruginosa* [88,138,139]. Les données françaises de 2016 du réseau REA-RAISIN retrouvent des proportions similaires avec 20% de *P. aeruginosa*, 13,3% de *S. aureus* et 10,0% de *E. coli* [140].

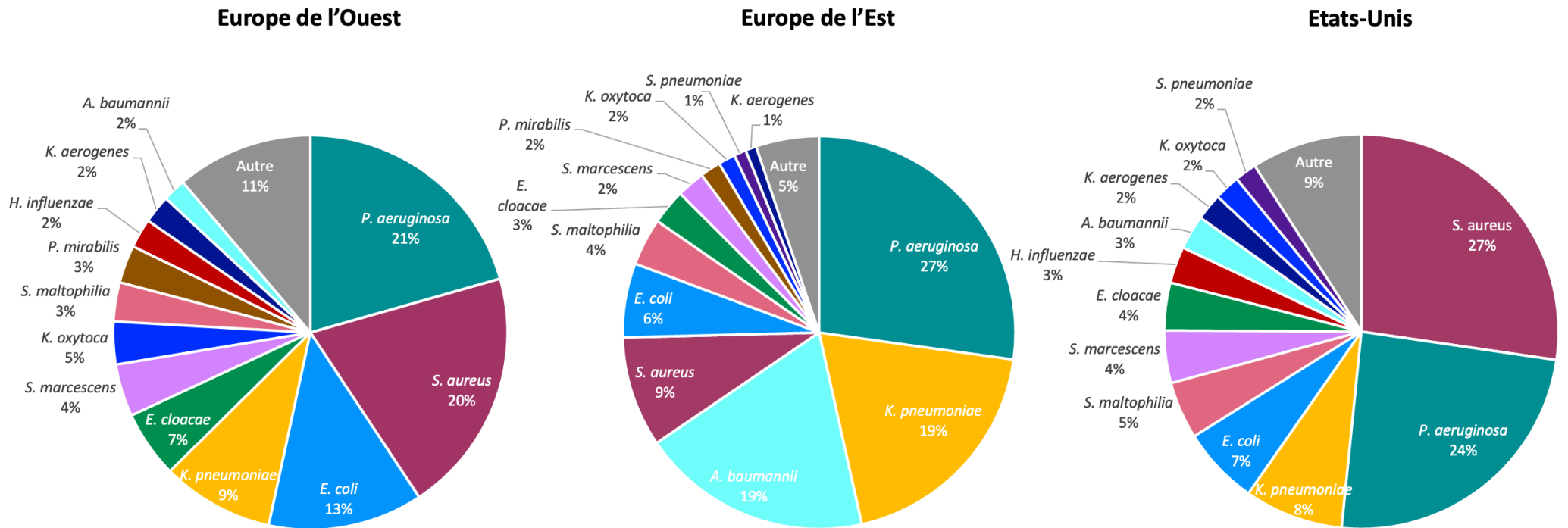


Figure 8 : Proportion de pathogènes retrouvés dans l'étude SENTRY en Europe de l'Ouest, en Europe de l'Est et aux Etats-Unis entre 2016 et 2019. Figure adaptée et traduite d'après [137].

I.3.4.4. Impact et pronostic

La survenue d'une PAVM est associée à une augmentation de la durée d'hospitalisation. Cela est vrai quelles que soient les études qui ont été conduites, avec une durée supplémentaire moyenne de VM estimée à au moins 7 jours [141] et pouvant aller jusqu'à plus de 20 jours selon les populations étudiées [142].

L'impact de la PAVM sur la mortalité reste cependant très débattu. En effet, peu d'études s'accordent sur le risque de mortalité induit. Certaines études retrouvent des taux supérieurs à 10%. C'est le cas par exemple d'une méta-analyse réalisée en 2013 sur plus de 6000 patients qui retrouvait un risque de mortalité de 13% [143]. A contrario, d'autres études cliniques plus récentes montrent une augmentation très faible de la mortalité aux alentours de 1% [144] voire ne montrent pas d'excès de mortalité [118,145]. La mortalité est, dans tous les cas, fortement influencée par la pathologie justifiant l'hospitalisation en service de Réanimation et sa sévérité [146]. L'étude de Melsen *et al.* conclut que la mortalité est principalement liée à l'augmentation du séjour en Réanimation et de tous les risques qui y sont associés.

I.3.5. Facteurs de risque et prévention du risque infectieux dans la PAVM

La compréhension des facteurs influençant la survenue d'une PAVM ou permettant de prévenir le risque d'apparition d'une PAVM n'est pas récente. Elle fait suite aux nombreux travaux réalisés durant les années 1980-90s afin de mieux comprendre la physiopathologie de la PAVM. L'objectif de ce chapitre est de détailler les connaissances actuelles en termes de prévention du risque infectieux chez le patient intubé-ventilé.

I.3.5.1. Facteurs de risques de survenue de PAVM

Plusieurs facteurs de risques de survenue de la PAVM ont été identifiés dans la littérature. Chastre et Fagon distinguent les principaux facteurs de risques selon qu'ils soient associés au patient ou bien aux différentes interventions effectuées ou traitements administrés (Tableau 2) [147]. D'autres facteurs de risques de survenue de PAVM ont été décrits au fil du temps comme, par exemple, la présence d'une hyperoxie ($\text{PaO}_2 > 120 \text{ mmHg}$) [148]. Néanmoins, il est très difficile d'évaluer l'impact d'un seul facteur sur la survenue d'une PAVM tant son développement est multifactoriel.

Tableau 2 : Principaux facteurs de risque de survenue d'une PAVM.

Adapté et traduit d'après [147]

Facteurs liés au patient	Facteurs interventionnels
<ul style="list-style-type: none"> • Age > 65 ans • Présence d'un SDRA • Antécédent de BPCO • Défaillance d'organe • Sévérité de la pathologie pré-existante • Coma ou troubles de la conscience • Traumatismes graves • Brûlures • Inhalations importantes • Colonisation bactérienne gastrique et/ou trachéobronchique importante • Sinusite • Hypoalbuminémie 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation d'anti-acides, d'anti-histaminiques H2 (en particulier les IPP) • Curarisation, sédation intraveineuse continue • Transfusion > 4 unités • Monitoring de la pression intracrânienne • Valeur de pression expiratoire positive (PEEP) • Changements fréquents des circuits du respirateur • Durée de ventilation mécanique > 2 jours • Réintubation • Présence d'une sonde nasogastrique • Patient en décubitus dorsal • Durée de transport hors de la réa • Présence d'une antibiothérapie préalable

Parmi les facteurs de risque identifiés, beaucoup ont fait l'objet de recommandations de prévention pour diminuer l'incidence de survenue de la PAVM. Ces dernières sont également dénommées les « *VAP bundles* » (ensemble de recommandations pour lutter contre la PAVM) au même titre par exemple que les « *sepsis bundles* » pour lutter contre le sepsis.

1.3.5.2. Prévention de la survenue de PAVM : les « *VAP bundles* »

Le concept de « *bundle* » a été élaboré par l'*Institute for Healthcare Improvement*. Il est défini comme un petit ensemble simple et cohérent de plusieurs pratiques cliniques, bien définies, fondées sur des preuves scientifiques solides et qui, mises en œuvre correctement avec un objectif d'adhérence aux pratiques de 95 %, se traduit par un meilleur résultat sur le pronostic des patients que lorsque chaque mesure est utilisée individuellement [149]. Bien appliquées, ces mesures permettent de prévenir le risque de survenue de la PAVM, et cela a été prouvé scientifiquement à plusieurs reprises [150,151]. Les principales mesures actuelles sont présentées et regroupées dans le Tableau 3. Elles s'articulent essentiellement autour de mesures permettant :

- De limiter la transcolonisation bactérienne des voies respiratoires supérieures (hygiène des mains du personnel soignant, soins dentaires et décontamination oro-pharyngée à la chlorhexidine),
- De limiter la microaspiration de sécrétions trachéales (inclinaison du lit supérieure à 30°, aspiration sous-glottique et maintien de la pression du ballonnet pour limiter le passage des sécrétions trachéales vers les voies respiratoires inférieures, réévaluation du niveau de sédation),

- De limiter le temps d'exposition à la VM (épreuves de sevrage, réévaluation du devenir du patient).

La plupart de ces mesures ont un niveau de preuve haut voire suffisant, à l'exception de la position à 30-40° dans le lit qui n'a jamais vraiment été démontré dans une étude randomisée.

Certaines mesures font toujours l'objet de débats dans la littérature et ne sont, de ce fait, pas recommandées en l'état actuel des connaissances pour prévenir la PAVM. Celles-ci sont regroupées dans le Tableau 4. C'est par exemple le cas de la décontamination oropharyngée à la chlorhexidine qui a pendant longtemps été recommandée mais de nouvelles études ont montré que la chlorhexidine était incriminée dans l'apparition d'infections secondaires locales ou d'ulcérations [152]. D'autres études ont montré de façon inquiétante une augmentation de la mortalité liée à l'administration de soins buccaux à base de chlorhexidine probablement en lien avec des réactions allergiques [153].

L'application stricte de ces mesures préventives peut rester inhomogène entre certains services en particulier selon le degré de compliance à leur application.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, l'incidence de la PAVM reste constante (autour de 15%) dans les services de Réanimation français, et cela malgré l'instauration des « *VAP bundles* ». Les mécanismes physiopathologiques de survenue de la PAVM ne sont donc pas encore entièrement compris. Les impacts de la relation hôte-pathogène au niveau pulmonaire, de la réponse immunologique locale ainsi que de l'évolution du microbiote pulmonaire au cours de l'intubation restent globalement peu compris. L'arrivée des technologies de séquençage de haut-débit au début des années 2010 a fait émerger un nouveau champ de recherche qui s'est progressivement imposé dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la PAVM.

Tableau 3 : Présentation des « *VAP bundles* » ou actions préventives mises en place pour prévenir l'apparition de la PAVM en service de soins critiques.

Tableau adapté et traduit d'après [29].

Catégorie	Rationnel	Intervention	Niveau de preuve
Pratiques essentielles	Bonnes preuves permettant de diminuer la durée de ventilation mécanique, la durée d'hospitalisation, la mortalité et/ou les coûts. Bénéfices supérieurs aux risques	Limiter l'intubation (préférer la ventilation non invasive) Limiter les tentatives de ré-intubation	Haut
		Diminuer la sédation (éviter les benzodiazépines, utiliser un protocole pour minimiser les sédations)	Modéré
		Mobiliser précocement le patient et maintenir la condition physique	Modéré
		Élever la tête de lit à 30-45°	Bas
		Effectuer des soins dentaires <i>sans</i> chlorhexidine	Modéré
		Instaurer une nutrition entérale	Haut
		Ne changer le circuit de ventilation que si souillé ou présence d'un dysfonctionnement	Haut
Approches additionnelles	Bonnes preuves pour améliorer le pronostic mais peut conférer d'autres risques Impact possible pour diminuer le taux de PAVM mais données insuffisantes sur la durée de ventilation mécanique, la durée d'hospitalisation ou la mortalité	Utiliser une décontamination sélective orale ou digestive dans les Réanimations à faible prévalence de résistance aux antibiotiques	Haut
		Utiliser des tubes endotrachéaux permettant l'aspiration des sécrétions trachéales pour les patients avec une durée de ventilation mécanique > 48-72h	Modéré
		Envisager une trachéostomie précoce	Modéré
		Utiliser une nutrition post-pylorique pour les patients à risque d'aspiration	Modéré

Tableau 4 : Actions remises en question et généralement non recommandées pour prévenir l'apparition de la PAVM.

Tableau adapté et traduit d'après [29].

Catégorie	Rationnel	Intervention	Niveau de preuve
Généralement non recommandé	Données contradictoires ou n'ayant pas d'impact sur le taux de PAVM, la durée de ventilation mécanique, la durée d'hospitalisation ou la mortalité	Effectuer des soins oraux ou bains à la chlorhexidine	Modéré
		Utiliser des probiotiques	Modéré
		Utiliser des tubes endotrachéaux en polyuréthane fins	Modéré
		Utiliser des tubes endotrachéaux coniques	Modéré
		Contrôler automatiquement ou monitoring fréquent de la pression du ballonnet	Modéré
		Utiliser des tubes endotrachéaux recouverts d'argent	Modéré
		Favoriser la position allongée	Modéré
	Pas d'impact	Effectuer une prophylaxie anti-ulcère gastrique	Modéré
		Suivre le volume gastrique résiduel	Modéré
		Fournir une nutrition parentérale précoce	Modéré
Absence de recommandations	Pas d'impact, coûts incertains	Utiliser un système clos d'aspiration endotrachéale	Modéré

Chapitre II. Évolution du microbiote respiratoire au cours de l'intubation

II.1. Définitions et méthodologies d'étude du microbiote respiratoire

II.1.1. Origine du mot « microbiome » et « microbiote »

Le terme « microbiome » est issu des mots grecs *micros* et *bios* qui signifient respectivement « petit » et « vie ». Le terme microbiome a été employé et défini pour la première fois en 2001 par Lederberg et McCray, qui insistaient sur l'importance des microorganismes colonisant le corps humain en conditions saines et pathologiques [154]. La définition a beaucoup évolué depuis l'essor des technologies haut-débit, et continue constamment d'être améliorée. En effet, plusieurs définitions existent dans la littérature, mettant en avant plutôt une vision écologique, génomique ou axée sur les interactions hôtes-pathogènes (Tableau 5)[155]. Aucune définition ne fait actuellement vraiment consensus mais chacune représente une vision différente selon la discipline, l'hôte et l'environnement étudiés. En recherche clinique, la définition génomique est prédominante [156]. Cette dernière sera principalement utilisée ici, bien qu'elle soit critiquable à bien des égards.

Tableau 5 : Différentes définitions physiologiques du terme « microbiome ».

Tableau adapté d'après [155].

Définition écologique

« Communauté microbienne caractéristique occupant un habitat raisonnablement bien défini et possédant des propriétés physico-chimiques distinctes. Le terme désigne ainsi non seulement les micro-organismes impliqués mais englobe également leur théâtre d'activité »

Définition génomique

« Ensemble des gènes et des génomes des membres d'un microbiote, présents dans un environnement donné. Le microbiome est caractérisé par l'application d'une ou de combinaisons de métagénomique, métabolomique, métatranscriptomique et métaprotéomique associées à des métadonnées cliniques ou environnementales ».

« Totalité des génomes d'un microbiote. Souvent utilisé pour décrire l'entité des traits microbiens (= fonctions) codés par un microbiote ».

Définition relation hôte-pathogène

« Communauté de micro-organismes (tels que des bactéries, des champignons et des virus) qui habitent un environnement particulier et capables d'interagir avec leur hôte de façon symbiotique, commensale ou pathogène ».

Le terme microbiote quant-à-lui, est une combinaison des mots grecs *micros* et *biota* qui signifient « l'ensemble des organismes vivants dans un écosystème donné » [157]. La compréhension de la composition des microbiotes a clairement pris un tournant majeur depuis le lancement du « *Human Microbiome Project* » en 2008 par l'Institut National de la Santé (NIH) des Etats-Unis [158]. Dans le cadre de ce projet, des échantillons prélevés sur différentes parties du corps (peau, muqueuses, selles, salive...) ont été analysés en métagénomique ciblée et les données générées sont accessibles gratuitement sur le web (<https://portal.hmpdacc.org>). A ce jour plus de 31 000 échantillons analysés et provenant de diverses origines sont disponibles.

II.1.2. Taxonomie bactérienne

La compréhension de la taxonomie bactérienne est primordiale pour pouvoir analyser et classer correctement les différents taxons bactériens retrouvés au sein d'un microbiote. La première classification taxonomique de Carl von Linné en 1735 ne décrivait que deux règnes (végétal et animal). Il faudra attendre 1925 pour que le domaine des procaryotes intègre la classification par le Pr Edouard Pierre Léon Chatton. La taxonomie ayant beaucoup évolué, elle se décompose en plusieurs rangs taxonomiques présentés dans la Figure 9. Le monde du vivant est composé de deux domaines à savoir les Eucaryotes et les Procaryotes. Ce dernier regroupe deux règnes que sont les Archeae et les Bactéries. Nous ne nous intéresserons ici qu'au règne des Bactéries. Parmi les rangs taxonomiques d'intérêts pour classer les bactéries se trouvent le Phylum, la Classe, l'Ordre, la Famille, le Genre et enfin l'Espèce. Les techniques de séquençages permettent en général d'accéder au moins jusqu'à l'échelle de la Famille bactérienne, classiquement jusqu'au Genre bactérien mais beaucoup de données sont perdues à l'échelle de l'Espèce, ce qui complexifie l'analyse à ce rang taxonomique.

La taxonomie bactérienne évolue rapidement en fonction de l'amélioration continue des techniques d'analyse du génome bactérien et en particulier de l'étude des microbiotes. La découverte de nouveaux taxons change l'architecture des arbres phylogénétiques et nécessite le changement de noms de certains rangs taxonomiques. En 2023, la taxonomie a bénéficié d'une modification importante des principaux phylums, classes et ordres bactériens. Afin de pouvoir continuer à comprendre et surtout comparer la littérature scientifique, le Tableau 6 reprend les principales modifications ayant affecté récemment la taxonomie microbienne.

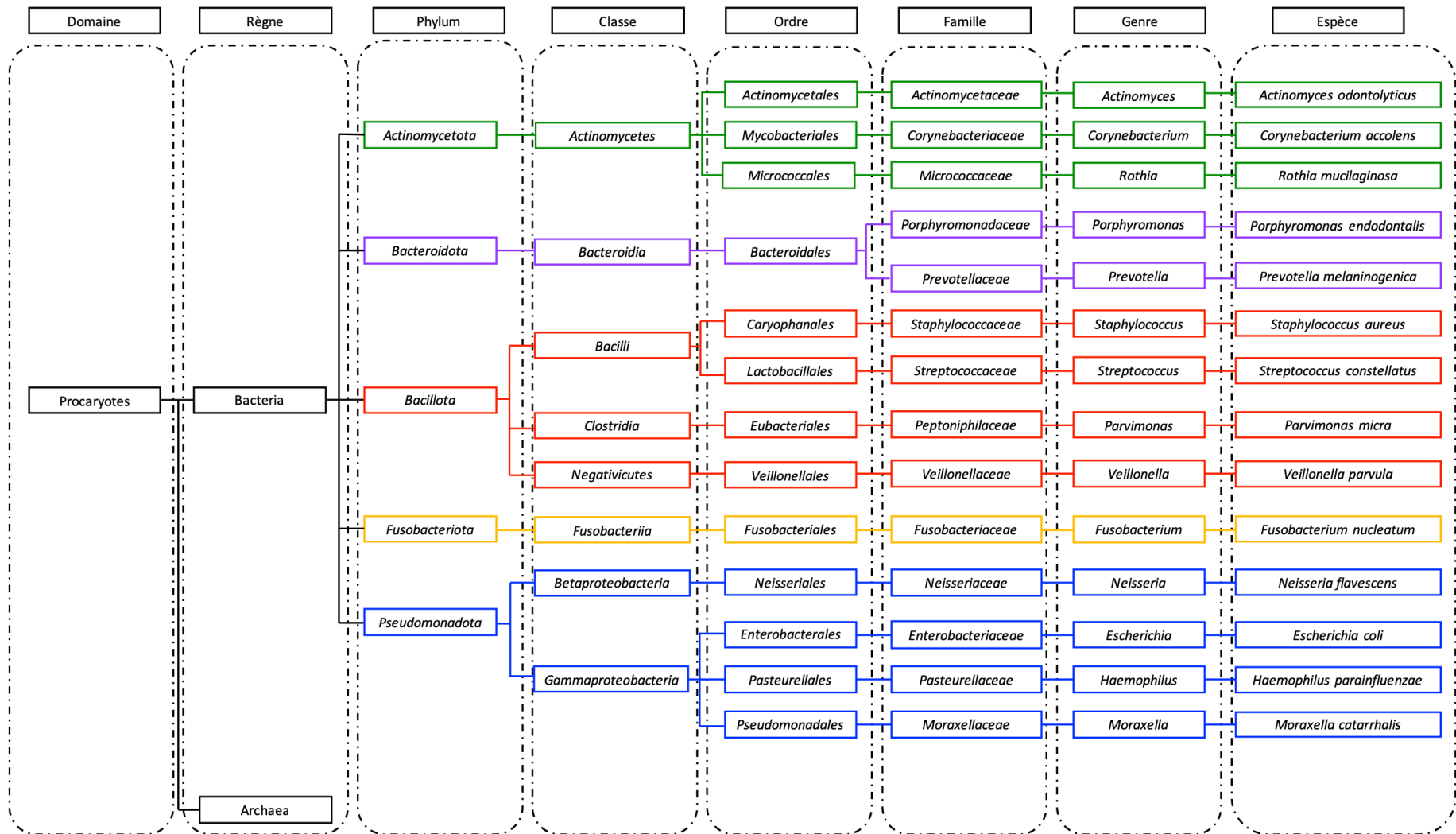


Figure 9 : Différents rangs taxonomiques du domaine des procaryotes et exemples des principaux taxons retrouvés au niveau du microbiote respiratoire.

Les 5 principaux phylums retrouvés au niveau respiratoire sont représentés par une couleur différente.

Tableau 6 : Principales modifications taxonomiques ayant eu un impact sur l'interprétation des études de microbiote conduites dans la littérature scientifique

Ancien nom (<i>avant 2023</i>)	Nom actuel (<i>en 2024</i>)
Phylum	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetota</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidota</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillota</i>
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriota</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadota</i>
Classe	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetes</i>
Ordre	
<i>Bacillales</i>	<i>Caryophanales</i>
<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriales</i>

II.1.3. Méthodologies d'étude du microbiote respiratoire

II.1.3.1. La métagénomique ciblée et la métagénomique *shotgun*

Pour toute analyse de microbiote, deux principales techniques existent pour obtenir la composition bactérienne d'un échantillon : la métagénomique ciblée et la métagénomique *shotgun* (Figure 10). La métagénomique *shotgun*, qui permet de séquencer les ADN et/ou ARN présents dans un échantillon biologique sans amplification préalable, demeure, encore aujourd'hui, difficile à appliquer sur les échantillons respiratoires du fait d'une trop grande quantité d'ADN humain par rapport à la quantité d'ADN bactérien. Cet ADN humain est préférentiellement séquencé et empêche d'obtenir une profondeur de séquençage suffisante pour fournir suffisamment d'information quant à la composition du microbiote. De ce fait, les technologies de séquençage du microbiote respiratoire se basent quasi uniquement sur les technologies de métagénomique ciblée. Pour ces raisons, nous ne développerons par la suite que la technologie de métagénomique ciblée, que nous avons utilisée lors de nos expériences, mais qui présente certaines limites qui seront exposées par la suite.

La métagénomique ciblée consiste à amplifier une certaine partie d'un ou de plusieurs gènes qui permettent l'identification précise des micro-organismes après comparaison à une base de données. L'amplification du gène codant l'ARNr16S est la plus fréquemment réalisée pour l'analyse de la composition des bactéries, tandis que les ITS ou l'ARNr18S peuvent être utilisés pour analyser le mycobiote.

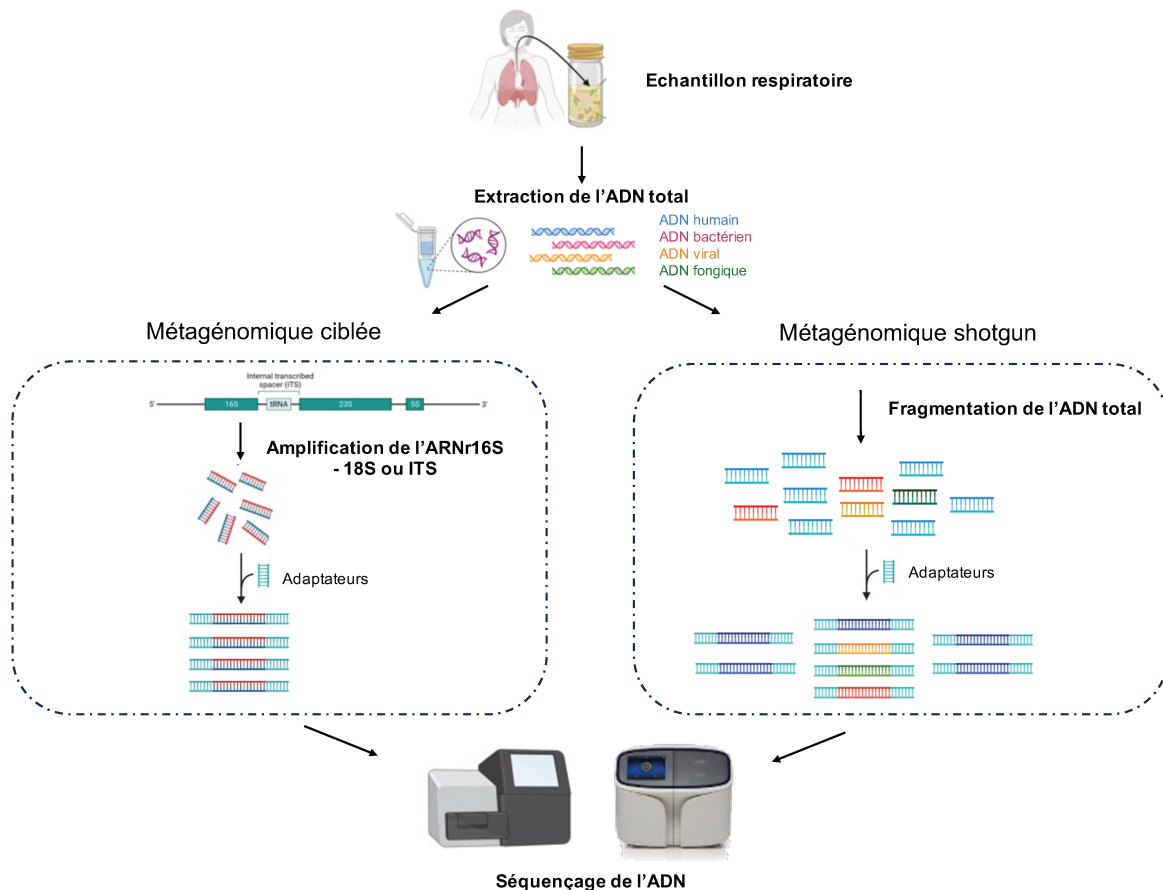


Figure 10 : Différence de préparation des bibliothèques entre métagénomique ciblée (à gauche) et métagénomique *shotgun* (à droite).

II.1.3.2. Les régions variables de l'ARNr16S et stratégie d'amplification

Dans les années 1980s, l'apparition de la biologie moléculaire et l'essor de la PCR permettent le développement de nouvelles stratégies diagnostiques pour identifier les infections bactériennes. Dans le laboratoire de Woese *et al.* aux USA, il a été montré que les liens phylogénétiques des bactéries pouvaient être déterminés en comparant une portion de certains gènes d'intérêt [159]. Parmi ces candidats figuraient les gènes codant les ARN ribosomiques 5S, 16S et 23S ainsi que les régions séparant ces gènes (ITS). Rapidement, il s'est avéré que le gène de l'ARNr16S était le plus discriminant et il a donc été utilisé à des fins de classification taxonomique [160].

Le gène de l'ARNr16S est un gène composé d'environ 1550 pb, qui est constitué de 10 régions constantes et de 9 régions variables (Figure 11). Ces dernières contiennent des régions dites hypervariables composées de quelques bases très différentes d'une espèce à l'autre. Le gène de l'ARNr16S est universel chez les procaryotes et il est présent très souvent en plusieurs copies sur un même génome. Le gène est suffisamment grand, avec suffisamment de polymorphismes pour pouvoir différencier les taxons de façon valide, en particulier au sein de ces régions hypervariables. Des amorces universelles sont généralement choisies comme complémentaires des régions conservées afin d'amplifier une ou plusieurs régions variables utilisées pour la taxonomie comparative. En général, la comparaison des séquences du gène de l'ARNr16S permet la différenciation entre les organismes au moins jusqu'à l'échelle du genre et très souvent jusqu'à l'échelle de l'espèce. Certaines espèces très proches génétiquement et taxonomiquement peuvent toutefois être difficiles à différencier (par exemple, les espèces du genre *Streptococcus*). Un des avantages à séquencer le gène de l'ARNr16S réside dans la très grande quantité d'informations contenues dans les databases mondiales car cette séquence a été déterminée pour un très grand nombre de souches bactériennes. A titre d'exemple, la GenBank contient près de 250 millions de séquences déposées dont plus de 99 millions concernent les génomes bactériens et plus de 27000 séquences de référence de l'ARNr16S y sont référencées (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

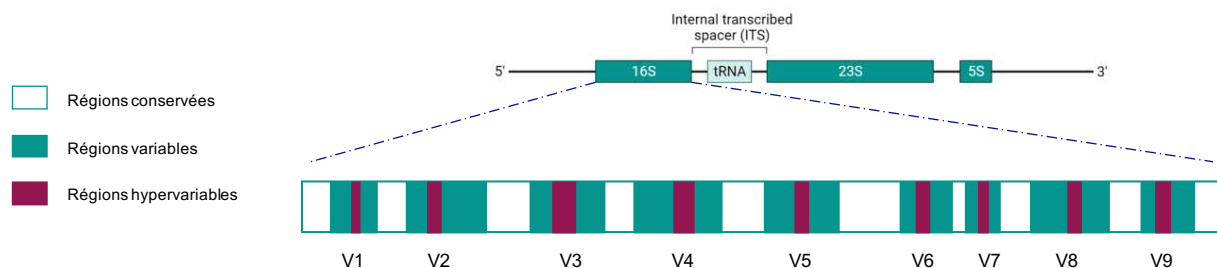


Figure 11 : Structure et organisation du gène codant l'ARNr 16S.

Avec les technologies de séquençage haut-débit de deuxième génération (Ion Torrent ou Illumina), des amplicons de longueur allant de 200 à 400 pb sont nécessaires pour pouvoir être correctement amplifiés et séquencés. Il est donc nécessaire de choisir une ou deux régions variables pour obtenir l'affiliation taxonomique. Il est certain que l'utilisation d'une seule région variable diminue la fiabilité de l'affiliation et, très souvent, empêche d'identifier le taxon jusqu'à l'échelle du genre ou de l'espèce. Il n'existe pas de consensus quant à l'utilisation préférentielle d'une région variable donnée. La littérature est très hétérogène sur

le sujet, certains auteurs préconisent l'utilisation des régions variables V2-V3 [161], d'autres des régions variables V3-V4 [162], V4 seule [163] ou encore V4-V6 [164]. Plus récemment, López-Aladid *et al.* ont montré pour le microbiote respiratoire que la région variable V1-V2 montrait de meilleures performances résolutive pour l'affiliation taxonomique [165], tandis que pour Soriano-Lerma *et al.*, il s'agissait de la région V1-V3 [166]. Dans tous les cas, l'augmentation du nombre de régions variables séquencées augmente et affine l'information taxonomique collectée, l'idéal étant de pouvoir séquencer l'entièreté du gène [167]. Johnson *et al.* ont démontré une nette augmentation de résolution lorsque le gène codant l'ARNr16S était séquencé entièrement par technologie de séquençage de troisième génération tel que PacBio ou Nanopore [168].

Par ailleurs, de façon plus inquiétante, l'identification taxonomique dépend également fortement de la séquence des amorces utilisées comme cela a été très récemment démontré par Deissová *et al.* La modification d'une ou deux paires de bases dans des amorces couramment utilisées en métagénomique ciblée modifie de façon importante les résultats finaux [169]. Cela a également été rapporté récemment par l'équipe de Fromentin M *et al.*, qui a montré qu'une modification de deux paires de bases dans les amorces ciblant la région variable V4 entraînait des modifications très importantes de l'affiliation taxonomique avec perte d'identification des *Staphylococcus* ou de certaines Enterobacterales [170]. Il est donc nécessaire de bien choisir quelle région variable cibler en amont de tout travail de recherche. Néanmoins, ces variabilités limitent la comparaison des données entre les études ayant ciblé des régions variables différentes et/ou utilisé des amorces différentes.

II.1.3.3. Les limites de la métagénomique ciblée

Outre la difficulté d'analyse comparative des résultats obtenus entre différentes études de métagénomique ciblée n'utilisant pas les mêmes protocoles, d'autres limites s'ajoutent et doivent être considérées lors de l'utilisation de la métagénomique ciblée. En premier lieu, la métagénomique ciblée sur l'ARNr 16S ne permet que la détection des bactéries, et écarte les champignons, virus et parasites de l'analyse. Par cette technique, il n'est pas possible non plus de détecter les gènes de résistance ou de virulence des taxons identifiés, à l'inverse de la métagénomique *shotgun*.

De plus, l'étape d'amplification du gène de l'ARNr16S propre à la technique engendre un certain nombre de biais pouvant affecter l'identification et la diversité des bactéries présentes dans l'échantillon. La polymérase utilisée dans la PCR peut par exemple insérer des erreurs ou créer des chimères dans les amplicons, qui pourront fausser l'affiliation taxonomique. L'utilisation de polymérases hautement fidèles limite néanmoins ce phénomène.

En revanche, la PCR a tendance à favoriser intrinsèquement les taxons présents en grande quantité et peut diminuer l'abondance voire faire disparaître certains taxons présents en faible quantité. Cela est notamment dû à la variation du nombre de copies du gène de l'ARNr16S entre les espèces bactériennes avec certains taxons pouvant contenir de 1 à 15 copies du gène par génome, la plupart ayant toutefois entre 1 et 4 copies du gène par génome [171]. Pour contrer cet effet, des méthodes de correction ont été développées. L'étude de Gao et Wu montre toutefois que ce biais est minime en particulier lors des analyses de diversité [172] [173]. De façon plus contraignante, certains taxons possèdent une variabilité de séquences entre les différentes copies d'ARN16S portées sur un même génome pouvant atteindre jusqu'à 10% [174].

Enfin, la technique est soumise aux risques de contaminations, spécialement pour les échantillons à faible concentration bactérienne (ce qui est le cas des échantillons respiratoires). En effet, les réactifs utilisés pour les étapes de fluidification, d'extraction voire d'amplification peuvent contenir des traces d'ADN bactérien qui viennent fausser les abondances et induire une contamination de l'échantillon par de l'ADN exogène. Ce type de contamination est également appelé « kitome ». Parmi les principaux contaminants, les genres *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Pelomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* sont fréquemment retrouvés [175]. Plusieurs études ont démontré l'impact de ces contaminations dans l'interprétation des résultats qui peuvent conduire à des conclusions erronées [175][176][177]. Les espèces bactériennes dont les abondances relatives sont en dessous du contaminant principal sont difficiles à interpréter et la différenciation entre contaminants et espèces présentes en faibles proportions devient très délicate.

Une des techniques les plus fréquemment utilisées pour essayer de contrôler ces contaminations consiste à ajouter des témoins négatifs constitués d'eau stérile et qui suivent le même processus analytique que les échantillons. Cela permet d'observer et d'évaluer la contamination basale bien qu'elle soit hautement variable d'un échantillon à l'autre. Néanmoins, cette technique peut conduire à la suppression de taxons intéressants car liés à une contamination inter-échantillons de la série et ne provenant pas du « kitome » (170). D'autres techniques bioinformatiques ont été mises en place pour distinguer la contamination comme par exemple le package Decontam disponible sur R [176].

La présence de contaminants n'est pas forcément que négative. Elle permet par exemple d'estimer une profondeur de séquençage suffisante. Dyrhovden *et al.* suggèrent effectivement que la profondeur de séquençage n'est suffisante que lorsque les premiers contaminants apparaissent [178]. Il est donc primordial de bien les détecter et de les éliminer

en amont de l'étape de l'analyse bioinformatique et de l'analyse statistique, au risque de mal interpréter les résultats de l'étude.

II.1.4. Analyse bioinformatique et génération des abondances relatives

II.1.4.1. Regroupement des OTUs ou des ASVs

L'assignation taxonomique de chaque séquence est primordiale. Elle s'effectue par des approches de *clustering*, qui sont principalement utilisées en métagénomique ciblée. Ces approches consistent à regrouper les séquences identiques sous forme de clusters avant confrontation aux bases de données.

La Figure 12 reprend les différentes étapes générales nécessaires à l'analyse des données brutes. Premièrement, le contrôle de la qualité de séquençage et le nettoyage des données est essentiel pour filtrer les *reads* de mauvaise qualité, les *reads* trop courts et les chimères. Puis l'assignation taxonomique est effectuée ; elle est clairement l'étape clef permettant la génération des résultats. Actuellement il existe deux stratégies différentes pour la réaliser : l'analyse en *Operational Taxonomic Unit* (OTU) ou l'analyse basée sur les *Amplicons Sequence Variants* (ASV). L'approche par *clustering* d'OTUs se base sur le regroupement des séquences selon leur similarité, avec un cut-off très souvent fixé à 97%. Les différents clusters sont ensuite confrontés à une base de données permettant l'assignation taxonomique [179]. C'est typiquement ce que propose une analyse conduite sous le logiciel QIIME.

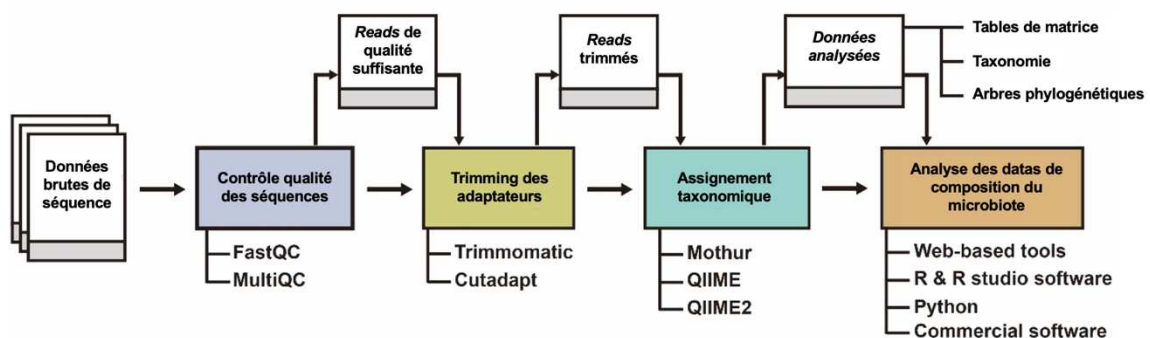


Figure 12 : Pipeline général d'analyse des données de métagénomique ciblée.

Figure adaptée et traduite d'après [180].

L'approche par ASVs utilise non pas un niveau de similarité de séquences mais une approche basée sur les différences mononucléotidiques sur la région du gène séquencé [181]. En effet, l'amélioration des techniques de séquençage a permis de mieux contrôler les erreurs de séquençage ce qui permet de différencier les séquences à l'échelle d'un nucléotide. Il est estimé que les approches par ASVs sont ainsi capables de fournir une meilleure résolution si et seulement si les technologies sont suffisamment performantes. Plusieurs logiciels utilisant les ASVs ont été développées et notamment DADA2.

Les bases de données sont primordiales pour obtenir une affiliation taxonomique juste et précise. Il en existe plusieurs mais il est essentiel qu'elles soient entretenues, c'est-à-dire mises régulièrement à jour en fonction des nouveaux taxons décrits dans la littérature et régulièrement curées en fonction de l'évolution de la taxonomie. Plusieurs bases de données sont fréquemment utilisées dans l'analyse de données de microbiote à savoir Greengenes, Silva, EzBioCloud ou encore MicroSeq [182].

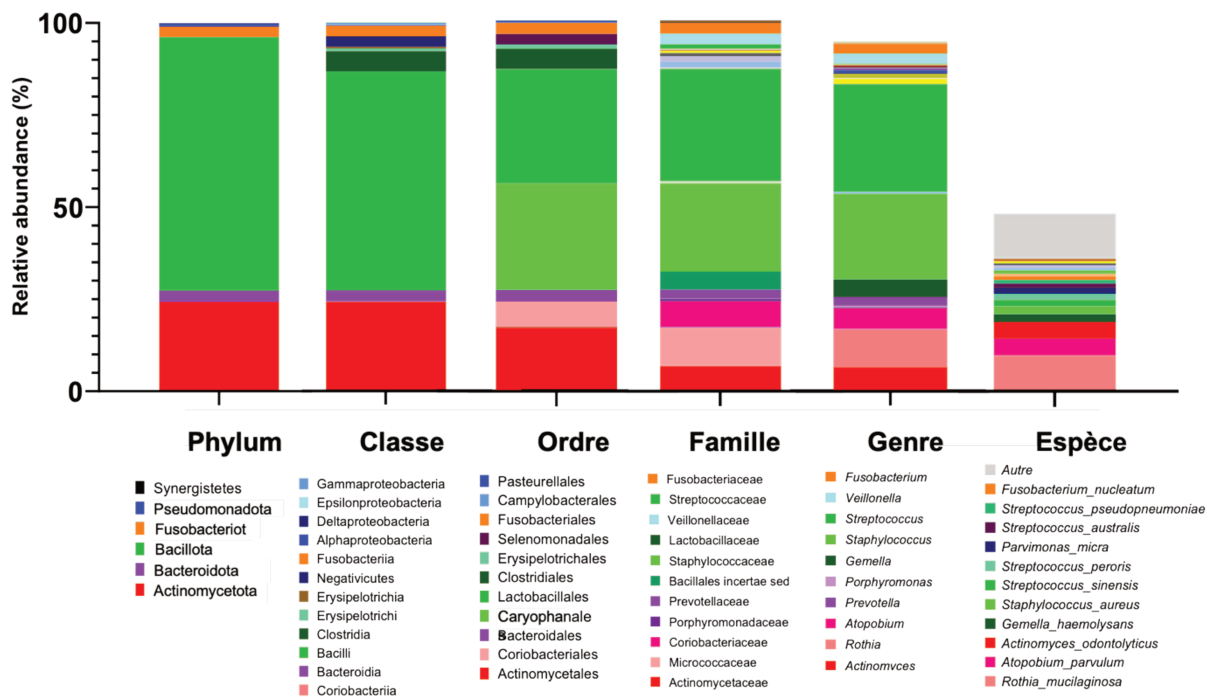


Figure 13 : Exemple d'affiliation taxonomique obtenue pour un échantillon respiratoire après amplification du gène de l'ARNr16S par la technologie Ion Torrent.

Les affiliations taxonomiques obtenues après comparaison des séquences amplifiées à la base de données sont classifiées selon chaque rang taxonomique (du phylum à l'espèce) et comparées en fonction du nombre total de séquences générées. A noter que l'on commence à perdre de l'information à partir du rang taxonomique du Genre (perte d'environ 10 à 15% de l'information taxonomique) et beaucoup plus au niveau de l'Espèce (perte d'environ 50% de l'information taxonomique). Certains taxons s'identifient très bien à l'échelle de l'espèce comme c'est le cas par exemple des Actinomycetota, a contrario les Bacillota s'identifient très mal à l'échelle de l'espèce.

A l'issue de cette étape un nombre de *reads* affiliés à chaque OTU ou ASV est rendu disponible dans un tableur pour analyse de la composition des échantillons et en particulier de la diversité microbienne. Un exemple de résultat obtenu pour un échantillon respiratoire est présenté sur la Figure 13.

II.1.4.2. Analyse de la diversité

II.1.4.2.1. La diversité alpha

La diversité alpha est définie comme une mesure de la richesse (nombre de taxa) et de la fréquence (abondance relative de ces taxa) à l'échelle d'un échantillon. Elle est évaluée par l'intermédiaire de différents paramètres : la richesse, l'index de Chao1, l'index de Shannon ou encore l'index de Simpson. Ces deux derniers index sont considérés plus robustes et moins sensibles aux nombres de séquences générées pour chaque échantillon, puisqu'ils tiennent compte de l'abondance relative de chaque OTU [183]. L'index de Shannon varie essentiellement en fonction des modifications d'OTUs rares tandis que l'index de Simpson est dépendant des variations d'OTUs majoritaires [184]. Un exemple de résultat de comparaison des différents paramètres de diversité alpha est présenté dans la Figure 14.

La diversité alpha permet également d'estimer la profondeur de séquençage en générant par exemple des courbes de raréfactions pour chaque échantillon. Si ces courbes atteignent un plateau, il est estimé que la profondeur était suffisante pour détecter tous les genres bactériens présents. Ces courbes permettent de rapidement donner une estimation de l'état de la biodiversité.

II.1.4.2.2. La diversité beta

La diversité beta est l'étude de la variabilité de composition d'une communauté microbienne parmi les échantillons collectés au sein d'un habitat. Elle permet de comparer les échantillons entre eux et de déterminer lesquels sont les plus proches en termes de diversité. Sur la base de l'analyse de la diversité bêta, il est possible de relier le modèle global de diversité taxonomique ou fonctionnelle aux caractéristiques environnementales, puis de prédire les propriétés de l'écosystème, de l'état sain ou malade de l'hôte. Cette diversité est classiquement estimée en générant une matrice de dissimilarité (ou de similarité) entre chaque paire d'échantillons. Pour cela, les distances de dissimilarité de Bray Curtis sont habituellement utilisées (Figure 14). Cet indice est compris entre 0 (les deux échantillons

partagent tous les mêmes taxons) et 1 (les deux échantillons ne partagent aucun taxon en commun) et sa valeur, calculée par paire, donne plus de poids aux taxons communs [185].

D'autres analyses de beta-diversité permettent, par exemple, de générer des arbres phylogénétiques en calculant les distances phylogénétiques entre deux échantillons (distances Unifrac). Les logiciels permettant de calculer les diversités alpha et beta sont inclus dans différents pipelines bioinformatiques fréquemment utilisés tels que QIIME, Mothur ou encore dans le package VEGAN sous R.

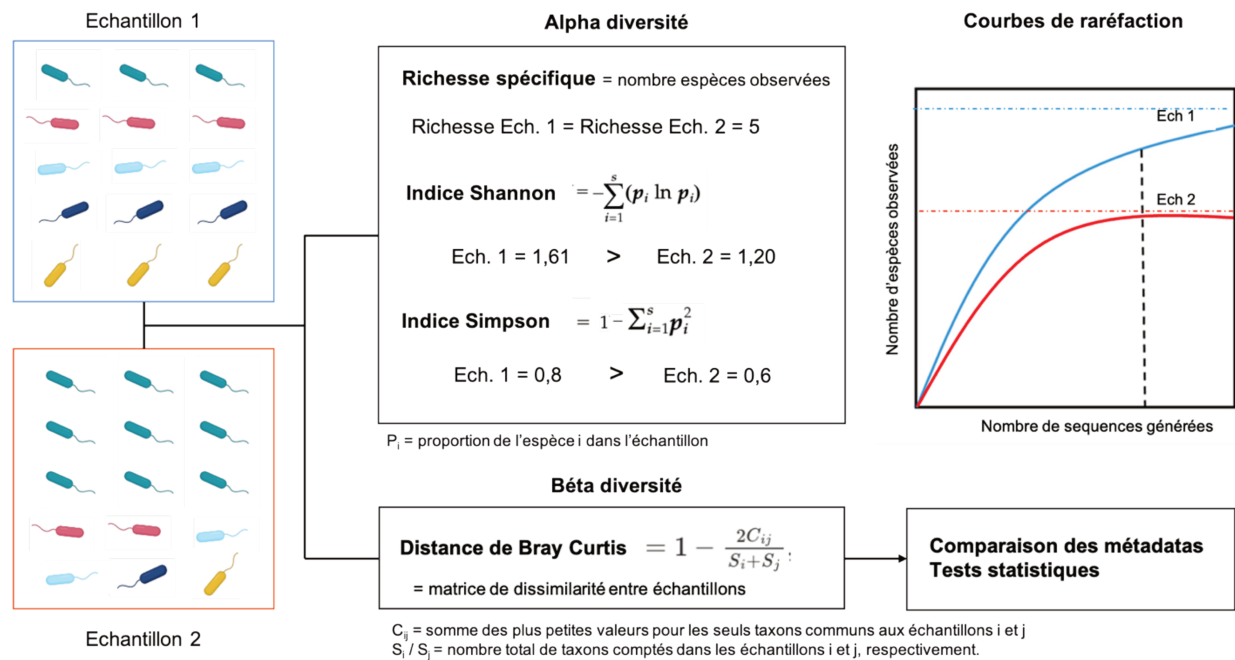


Figure 14 : Exemple de calcul de richesse et de diversité pour deux échantillons.

Les deux échantillons présentent une richesse identique (même nombre de taxons) mais une diversité différente objectivée par les valeurs d'index de Shannon et de Simpson augmentées pour l'échantillon 1. Une valeur élevée de l'index de Shannon ou une valeur de Simpson proche de 1 signifient une plus grande diversité.

Les courbes de raréfactions permettent d'objectiver la diversité et d'estimer la profondeur de séquençage pour chaque échantillon selon le plateau atteint pour la valeur de séquences générées par le séquenceur.

II.1.5. Analyse statistique des résultats d'assignation taxonomique

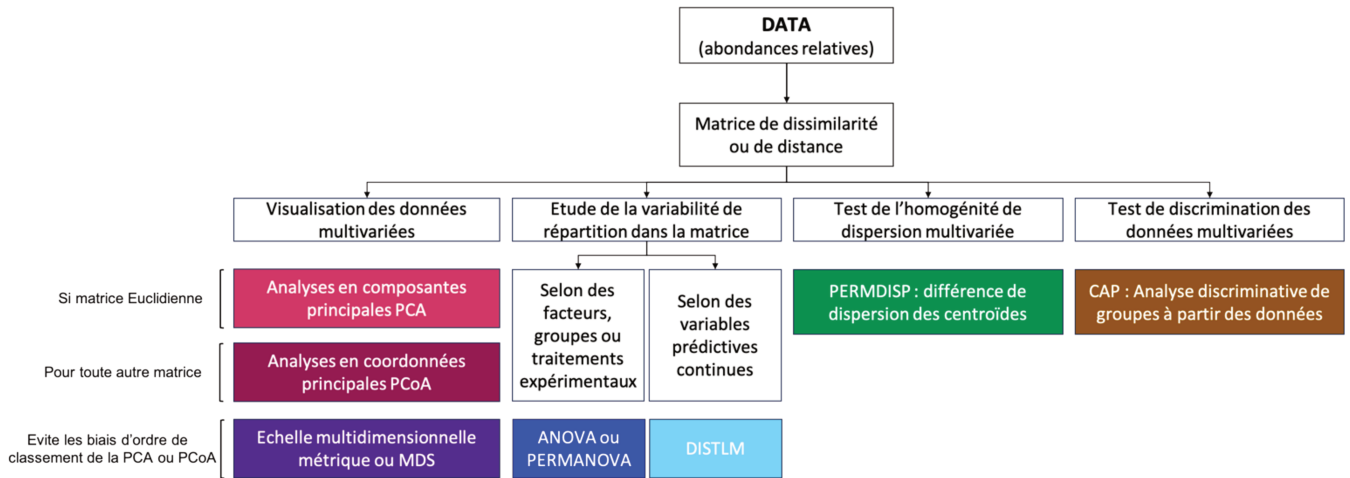


Figure 15 : Exemple d'analyses statistiques couramment effectuées à partir des distances de Bray-Curtis pour évaluer l'impact d'une ou plusieurs métadatas.

A partir des données d'abondance relative de chaque OTU ou taxons, il est nécessaire de caractériser et de comparer les résultats selon les différentes métadatas collectées et conditions à tester pour répondre à l'hypothèse scientifique. Pour ce faire, plusieurs représentations ou tests peuvent être effectués en se basant sur les matrices de dissimilarité ou de similarité générées grâce aux analyses de bêta-diversité. Ces tests statistiques représentés Figure 15 permettent par exemple :

- De visualiser la répartition des données dans l'espace (Analyse en composante principale PCA ou en coordonnées principales PCoA)
- D'étudier la variabilité de répartition des valeurs dans la matrice (analyse ANOVA - *Analysis of variance* - si un seul facteur ou analyse PERMANOVA - *Permutational multivariate analysis of variance* - si multifactoriel)
- De tester l'homogénéité de dispersion des échantillons en les regroupant sous forme de centroïdes (PERMDISP)
- De prédire la ou les variables en fonction de la composition des données (analyse CAP ou *Canonical analysis of principal coordinates*)

Chacune de ces analyses peut être conduite dans R ou dans le logiciel Primer-e.

II.2. Composition et variation du microbiote respiratoire sain

II.2.1. Découverte du microbiote respiratoire

Au niveau des voies respiratoires, il existe un microbiote s'étendant du rhinopharynx jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Celui-ci varie en composition, diversité et quantité le long des voies respiratoires. La présence de microorganismes vivant dans la sphère respiratoire haute a été admise par la communauté scientifique depuis longtemps mais n'a principalement été étudiée que lors d'évènements infectieux tels que la rhinosinusite chronique ou la BPCO [186]. Néanmoins, la présence de bactéries au niveau des voies respiratoires inférieures (bronches, bronchioles et alvéoles pulmonaires) n'a été suggérée qu'à partir des années 2010 (Figure 16). En effet, les poumons ont auparavant toujours été considérés comme « stériles », héritage d'un dogme enseigné de génération en génération [187]. Très vite, les techniques de métagénomique appliquée à l'étude de poumons de patients sains vont mettre en évidence une signature microbienne spécifique [188–190]. Depuis, l'intérêt pour ce microbiote est manifeste mais la faible masse bactérienne le composant, la complexité d'accès et d'analyse des prélèvements retardent son étude et sa compréhension en comparaison au microbiote digestif, cutané ou vaginal. La grande proportion d'ADN humain par rapport à la faible quantité d'ADN bactérien est en outre un frein majeur à l'utilisation de la technique de métagénomique *shotgun* sur les échantillons respiratoires.

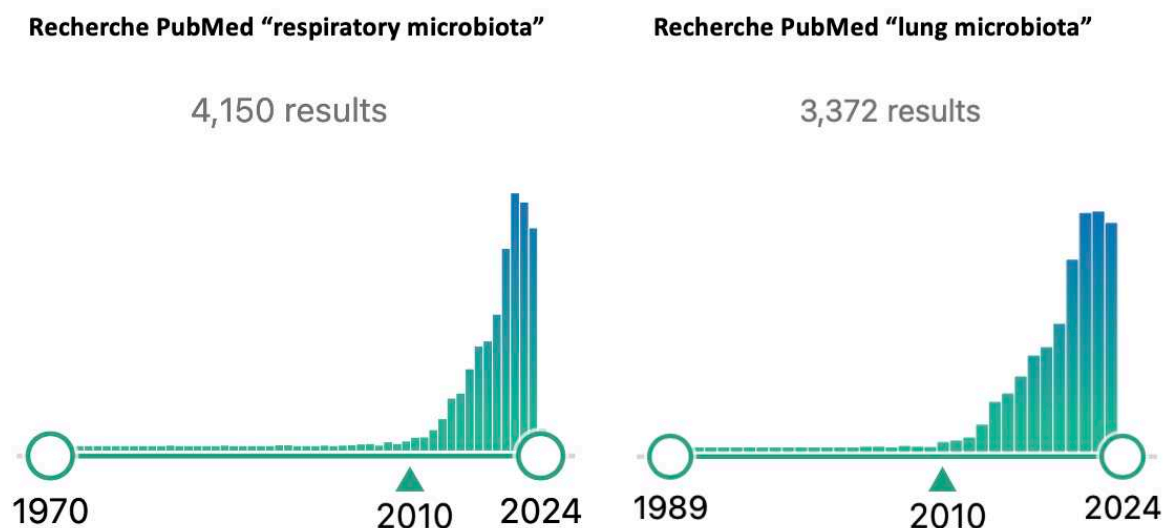


Figure 16 : Nombre de recherches Pubmed comprenant les mots « *respiratory microbiota* » et « *lung microbiota* », effectué en Janvier 2024.

A noter l’augmentation franche du nombre de publications à partir des années 2010.

II.2.2. Facteurs influençant le développement du microbiote respiratoire

Le développement et la richesse d'un microbiote sont inévitablement liés aux conditions physiologiques de l'environnement et de l'organe l'hébergeant. La température, le pH, la pression partielle en oxygène mais avant tout la présence et le type de nutriments sont des éléments clefs qui varient d'un environnement à l'autre. Le microbiote pulmonaire est soumis à un gradient de pH, d'humidité, de pression partielle en oxygène et en dioxyde de carbone (pO_2 et pCO_2) tout au long de l'arbre pulmonaire (Figure 17)[191].

D'autre part, la quantité de nutriments présents est plus importante dans les voies oropharyngées que dans les cavités nasales ou pulmonaires. En effet, les sources nutritives des microorganismes dans ces environnements sont beaucoup plus pauvres et reposent essentiellement sur les sucres composant le mucus tandis que le microbiote oropharyngé profite des débris et apports en nutriments issus de l'alimentation [192]. Il en résulte que le microbiote respiratoire évolue grandement le long du tractus pulmonaire tant en quantité qu'en composition. Près de 10^6 bactéries/mL de sécrétions sont présentes au niveau oropharyngé mais cette concentration diminue jusqu'à 10^2 - 10^3 bactéries/ml dans les alvéoles pulmonaires. Cependant, la surface d'évolution du microbiote augmente drastiquement passant de quelques cm^2 dans les voies respiratoires supérieures à plus de 10^5 cm^2 au niveau pulmonaire [193,194]. Le microbiote pulmonaire est ouvert sur l'environnement et celui-ci influence sa composition. L'exposition aux allergènes, aux polluants ou autres particules peut altérer la structure de ce microbiote et favoriser le basculement vers un état pré-pathologique.

Tous ces facteurs peuvent donc influencer la composition et le développement des différentes espèces bactériennes locales et peuvent modifier l'évolution de ce microbiote au cours de la vie.

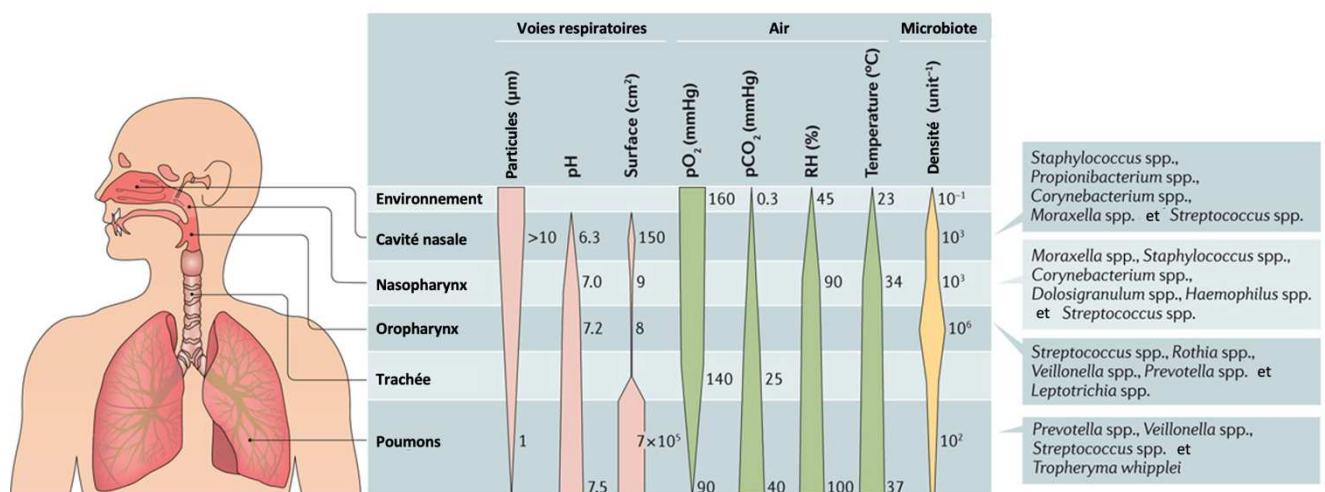


Figure 17 : Physiologie et variation de l'environnement le long du tractus respiratoire.

Figure extraite et traduite d'après [191]. RH = humidité relative

II.2.3. Composition et évolution au cours de la vie

Bien que beaucoup d'études se soient désormais intéressées au microbiote respiratoire en pathologie humaine (mucoviscidose, asthme, BPCO, cancer...), peu de travaux de recherche concernent le microbiote respiratoire bas et pulmonaire sain. A titre d'exemple, il n'y a aucune donnée du microbiote pulmonaire disponible au sein du *Human Microbiota Project*. Seules des données concernant les microbiotes buccal et nasal sont disponibles [195]. Il est néanmoins admis qu'une prédominance de Streptocoques, de *Moraxella*, de *Neisseria* et d'*Haemophilus* est retrouvée au niveau des voies respiratoires hautes et qu'une prédominance de bactéries anaérobies-aérotolérantes telles que les Streptocoques, ou de bactéries anaérobies strictes telles que les *Prevotella*, les *Fusobacterium* ou les *Veillonella* sont majoritairement retrouvées au niveau pulmonaire [189,196][197][198][199][200]. Cela peut paraître paradoxal mais une flore anaérobie est principalement présente dans les voies respiratoires profondes en particulier au niveau des replis et des cryptes de la muqueuse respiratoire. La pression partielle en oxygène diminue le long de l'arbre pulmonaire tandis que la surface augmente, ce qui favorise le mode de vie anaérobie. La structuration du microbiote sous forme de biofilm favorise également le métabolisme anaérobie.

Concernant les champignons, *Candida*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Malassezia* sont principalement retrouvés au niveau du tractus respiratoire bas dans des proportions toutefois plus faibles que les espèces bactériennes [201].

Les microbiotes respiratoires haut et bas sont très étroitement liés, principalement du fait de la proximité et continuité anatomique entre le rhinopharynx et les poumons. De façon tout à fait physiologique, un apport de micro-organismes est quotidiennement effectué dans les poumons par des phénomènes de micro-aspirations salivaires [202]. C'est d'ailleurs à ce jour la principale source de colonisation pulmonaire chez le patient sain [196].

Toutefois, une grande hétérogénéité du microbiote respiratoire demeure entre individus, consécutive aux nombreux facteurs environnementaux influençant son développement et sa composition tels que l'alimentation, le tabac, la génétique ou encore l'exposition aux antibiotiques [191][203][204]. La composition et le développement du microbiote respiratoire sont également directement dépendants de la voie d'accouchement [200,205]. Il a par exemple été démontré qu'un retard de maturation du microbiote survenait à 6 mois de vie, lorsqu'un enfant était né par césarienne. Cela serait dû à une diminution de colonisation des voies respiratoires par certaines bactéries commensales comme les *Corynebacterium* ou les *Dolosigranulum*, qui ont un effet bénéfique sur le développement pulmonaire [206].

Le mode de vie impacte aussi la composition et la richesse de ce microbiote, et il a été montré qu'une enfance dans un environnement fermier, qui permet l'exposition à une plus grande diversité de microorganismes, pouvait protéger du développement de l'asthme et des allergies [207]. Cette hypothèse « hygiéniste » se base sur différents mécanismes dont le rôle central du système immunitaire et en particulier le rôle protecteur des cellules T NK activées par l'exposition à ces antigènes, et donc à ces bactéries environnementales [208].

Ainsi, la composition et l'évolution du microbiote pulmonaire dépend de nombreux facteurs dont l'exposition et l'immigration microbienne (micro-aspiration, micro-inhalation), l'élimination microbienne (ascenseur muco-ciliaire, réflexe de la toux, réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte) et des conditions locales de colonisation et de croissance microbienne (nutriments disponibles, température, pression en O₂...).

II.2.4. Structuration du microbiote respiratoire

Bien que la composition du microbiote respiratoire et les facteurs influençant son développement commencent à être décrits, il reste encore de grandes parts d'ombre sur la structuration de ce microbiote au sein du parenchyme pulmonaire et des interactions existantes entre microorganismes. Deux études, bien que réalisées chez des patients atteints de mucoviscidose ou de BPCO, apportent néanmoins quelques éléments de réponses avec la mise en évidence d'une structuration de ce microbiote en micro-niches au sein des poumons d'un même patient [203] [209]. Les travaux de cette équipe ont permis d'émettre l'hypothèse d'une structuration du microbiote respiratoire bas sur un « modèle insulaire », c'est-à-dire qu'il existerait une multitude de microenvironnements locaux dont la richesse dépendrait de la localisation anatomique et de l'évolution migratoire des espèces présentes mais également de la vitesse de réplication de ces espèces [210] (Figure 18). Les auteurs avancent également que pour l'ensemble des conditions d'un microenvironnement donné, il existerait un point d'équilibre de richesse en espèces au-dessus ou en dessous duquel le système reviendra s'il est perturbé. Ce point d'équilibre étant constant, la population est néanmoins extrêmement dynamique avec un renouvellement constant d'espèces nouvellement immigrées ou disparues.

Appliqué au microbiote respiratoire, ce modèle suggère que la richesse des microniches pulmonaires dépend des conditions liées à la migration bactérienne (proximité avec l'oropharynx, quantités de bactéries présentes dans l'oropharynx, reflux gastro-œsophagiens, position couchée du patient, dysfonction laryngée...) et à l'élimination bactérienne (fonctionnalité du réflexe de la toux et de l'ascenseur muco-ciliaire, niveau d'obstruction bronchique, capacités des réponses immunitaires, traitements influençant ces réponses...). Par ailleurs, la physiologie pulmonaire est telle qu'il existe des différences

régionales importantes en termes de densité cellulaire (cellules productrices de mucus, cellules ciliées, cellules épithéliales, cellules immunitaires...), de production de mucus, de dépôts de particules... impactant les densités et richesses microbiennes locales. Le développement d'une pathologie pulmonaire ne serait donc « qu'une modification ponctuelle de ce point d'équilibre ».

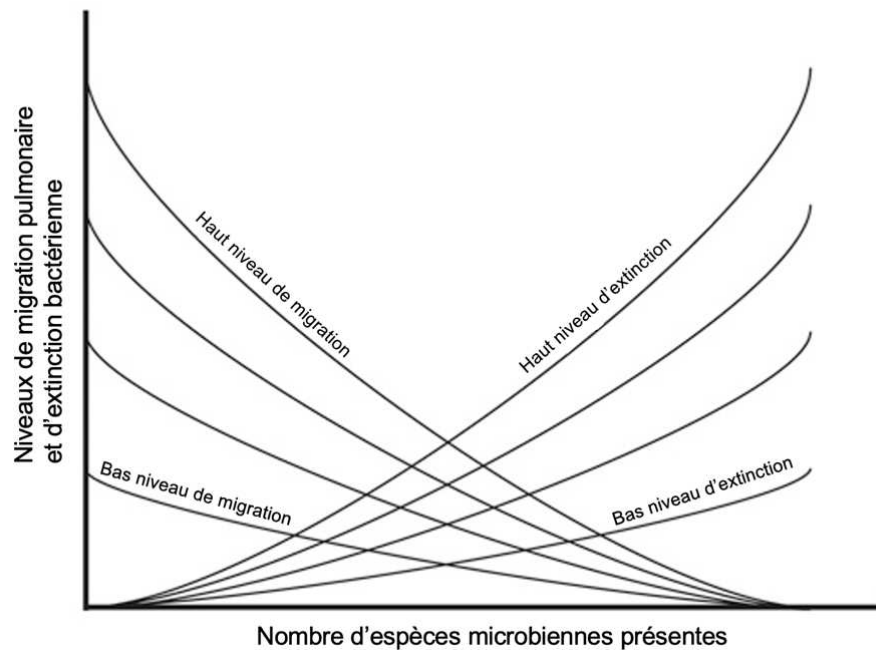


Figure 18 : Graphique schématisant l'hypothèse du « modèle insulaire ». Traduit et adapté d'après [210]

Lorsqu'une microniche a une faible richesse, le taux d'immigration est élevé car chaque espèce arrivante est susceptible d'être nouvelle, en revanche lorsque la richesse est élevée, le taux de migration est plus faible car moins d'espèces nouvelles sont susceptibles de coloniser cette niche. Dans les zones à faible richesse en espèces, le taux d'extinction est faible en raison du petit nombre d'espèces potentielles susceptibles de disparaître mais à mesure que la richesse spécifique s'accroît, le nombre d'espèces menacées d'extinction augmente et la compétition entre les espèces pour les nutriments augmente, entraînant ainsi une augmentation du taux d'extinction. De ce fait, une relation inverse entre taux d'extinction et richesse en espèces s'établit au sein d'un espace donné.

Ainsi, il est fort probable que le microbiote pulmonaire sain soit structuré sous forme de microniches, bien que cela n'ait pas été formellement démontré du fait de la difficulté d'échantillonnage. Il n'existerait donc probablement pas un seul microbiote mais une multitude de microbiotes selon les espaces pulmonaires délimités par les conditions environnementales présentes. Si cette hypothèse est vérifiée, cela impliquerait que le microbiote pulmonaire serait très difficile à explorer. L'analyse des prélèvements locaux (type LBA) ne pourrait donc pas être extrapolée à l'ensemble des poumons.

II.3. Le microbiote respiratoire chez le patient intubé-ventilé

II.3.1. Intérêt de l'exploration du microbiote respiratoire

L'étude du microbiote respiratoire en Réanimation est récente. Les premiers articles utilisant les technologies de clonage de fragments amplifiés du gène de l'ARNr16S ont été effectués en 2012 sur des biofilms récupérés à la surface des tubes endotrachéaux [211]. Simultanément, les premières études utilisant les techniques de séquençage à haut débit arrivèrent dans les années 2012-2013 et portèrent sur l'évaluation du microbiote pulmonaire dans des liquides de lavage broncho-alvéolaires ou des tubes endotrachéaux de patients intubés-ventilés par technologie 454 [211][212]. La mise en évidence d'un microbiote très variable a rapidement été démontrée. Le dogme des « poumons stériles » prenait définitivement fin !

L'intérêt notable pour la métagénomique ciblée dans le poumon ne viendra qu'en 2016-2017 avec en particulier les travaux de l'équipe de Williams DW qui ont porté sur l'évaluation et la correspondance entre les microbiotes respiratoires et oropharyngés [37,213,214]. La découverte du lien étroit entre microbiote pulmonaire et microbiote buccal a renforcé l'attention à porter aux soins buccaux durant l'intubation mais a surtout permis de redonner un souffle nouveau à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la PAVM. L'étude des biofilms présents à la surface de la plaque dentaire et des tubes endotrachéaux récupérés chez des patients intubés-ventilés a permis de corréliser le niveau de diversité microbienne à la surface du tube ou de la plaque dentaire avec la durée de VM [37,215]. Ainsi, une perte de diversité est observée à mesure que la durée de VM augmente.

A la suite de ces différents travaux, l'étude du microbiote respiratoire va très vite prendre de l'ampleur et actuellement une dizaine d'articles scientifiques voient le jour chaque année, la plupart du temps sur de petites cohortes vu le coût du séquençage (Tableau Annexe 1). La totalité des études indique l'intérêt et l'importance du séquençage de l'ARNr16S pour identifier les pathogènes pulmonaires avec la découverte de bactéries parfois atypiques (mycoplasmes, mycobactéries, *Tropheryma whipplei*...).

Parallèlement, les avancées simultanées sur le microbiote respiratoire dans des pathologies chroniques telles que la mucoviscidose, l'asthme, la BPCO ou la tuberculose ont permis de mieux comprendre le lien entre modifications du microbiote et pathologie. Ces différentes études ont encouragé la recherche sur les infections respiratoires aiguës telles que la PAVM.

II.3.2. La cinétique du microbiote respiratoire

Beaucoup d'études chez les patients intubés-ventilés ont exploré la modification du microbiote respiratoire au moment du diagnostic de la PAVM et l'ont corrélé au microbiote retrouvé chez des patients sains ou chez des patients intubés-ventilés ne développant pas de processus infectieux au cours de leur séjour. Les principaux résultats ont permis de mettre en évidence une diminution de la flore locale (*Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Prevotella*) et une augmentation de certaines bactéries pathogènes appartenant aux Enterobacterales, ou aux genres *Staphylococcus*, *Burkholderia* ou *Pseudomonas* [212,216,217].

Dans l'objectif de prédire quels patients sont à risque de développer une PAVM, plusieurs équipes ont essayé de comparer le microbiote présent à l'intubation avec celui au cours de la VM et au moment du diagnostic, afin de trouver un ou plusieurs marqueurs permettant la discrimination des patients développant une PAVM de ceux n'en développant pas. Malgré l'intensification de la recherche actuelle, le rôle du microbiote respiratoire dans la survenue de la PAVM reste globalement incompris [218]. L'objectif de cette partie est de synthétiser l'ensemble des résultats retrouvés.

II.3.2.1. Le concept de dysbiose

Le premier article s'intéressant à l'évolution du microbiote respiratoire chez les patients intubés-ventilés a été publié en 2016 par Kelly *et al.* [219]. Puis d'autres études notables ont essayé d'étudier la cinétique du microbiote au cours de l'intubation [220](224). Parmi les principaux résultats identifiés, plusieurs auteurs pointent une diminution de la diversité bactérienne au cours de l'intubation par rapport au microbiote respiratoire des patients sains non intubés. Ce phénomène est lié à l'émergence de bactéries pathogènes présentes souvent en grandes quantités (Enterobacterales, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*), ainsi qu'à la diminution, voire à la disparition, des bactéries commensales usuelles (210)(211). Ces résultats seront confirmés ultérieurement par d'autres études définissant ainsi le concept de dysbiose pulmonaire.

La dysbiose correspond à la perturbation des flores microbiennes locales au profit d'une ou plusieurs espèces majoritaires, très souvent responsables de la pathologie. Ce concept, similaire à ce qui a été décrit au niveau du microbiote digestif ou vaginal, symbolise l'état de transition et de perturbation des flores microbiennes habituelles des voies respiratoires [225]. Il correspond à une modification importante du point d'équilibre explicité dans l'hypothèse du « modèle insulaire ». L'étude de Fenn *et al.* observe même un lien significatif entre présence d'une dysbiose microbienne et présence d'une culture

microbiologique significative dans les LBA [227]. C'est la seule étude à avoir évalué et retrouvé cette corrélation.

L'origine de cette dysbiose proviendrait des modifications survenant au niveau des microbiotes oropharyngés et digestifs, mettant en avant un rôle important de l'intestin dans la physiopathologie de cette dysbiose pulmonaire [228]. Ce lien étroit entre ces microbiotes est très souvent explicité sous le terme de « *gut-lung axis* » ou axe intestins-poumons et est principalement issu des travaux effectués dans la BPCO, la mucoviscidose ou l'asthme [229,230]. Peu de données quant au rôle de cet axe ont été pour l'instant mises en évidence chez le patient intubé-ventilé. Seule l'étude de Dickson *et al.*, portant sur des modèles murins de sepsis d'origine digestive avec un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) associé, a montré un enrichissement de certaines bactéries digestives (*Bacteroides*, *Enterococcus*, *Lachnospiraceae sp*) dans les poumons de ces souris. Ce lien n'a pas été mis en évidence à l'heure actuelle dans la survenue de PAVM.

II.3.2.2. Évolution de la diversité et de la composition du microbiote au cours de l'intubation

L'évolution de la diversité mesurée principalement par l'index de Shannon dans les études pulmonaires a montré une très grande variabilité inter-individuelle, cet index allant de presque 0 (très faible diversité dominée par un seul taxon bactérien) à plus de 6 (diversité identique à un microbiote sain). Bien que la perte de richesse semble avérée, Emonet *et al.* ont également mis en évidence une diminution de la diversité bactérienne au cours de la VM avec une modification du microbiote respiratoire chez les patients intubés-ventilés liée à l'augmentation des bactéries à Gram négatif et des Mycoplasmes [223]. D'autres études ont montré une perte de diversité au cours du temps d'intubation [222,231]. Cependant, ce phénomène ne fait pas consensus et plusieurs études n'ont pas retrouvé de diminution de la diversité alpha au cours de l'intubation [220](225,227,233,234). Ces différentes études ont été réalisées sur de faibles effectifs et un manque de puissance peut éventuellement masquer ce phénomène.

La diminution de la richesse de la flore respiratoire au cours de l'intubation semble faire consensus au sein de la bibliographie avec une nette diminution en proportion relative des *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Rothia*, et *Veillonella*. Le rôle de plusieurs genres bactériens, parfois augmentés, parfois diminués dans certaines études, reste encore à investiguer. Par exemple, Huebinger *et al.* ou encore Emonet *et al.* ont retrouvé une augmentation des Mycoplasmes chez les patients développant une PAVM, alors que l'équipe

de Woo *et al.* observait une augmentation dans le groupe non PAVM. De façon similaire, des résultats discordants ont également été retrouvés pour d'autres genres tels que *Neisseria*, *Corynebacterium* ou *Staphylococcus*. Il est donc extrêmement difficile d'interpréter les résultats de ces études car elles dépendent grandement de nombreux facteurs confondants tels que le motif d'admission, les antécédents du patient ou encore la prise d'antibiotiques.

II.3.2.3. Étude du microbiote dans la PAVM : de nouveaux outils prédictifs ?

L'un des objectifs avancés dans la plupart des études sur le microbiote respiratoire chez le patient intubé-ventilé est la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs pour prédire la survenue de la PAVM. A l'heure actuelle, aucun marqueur ne montre de performances suffisantes ou ne fait consensus entre les différentes études. Néanmoins, plusieurs signaux intéressants ont été observés et nécessitent d'avantage d'évaluation pour pouvoir pleinement être corrélés à l'évolution clinique.

Le principal signal détecté par Emonet *et al.* concerne l'augmentation de la quantité d'ADN présent dans les prélèvements respiratoires (principalement les AETs) de patients développant une PAVM. En effet, une augmentation significative de la quantité d'ADN humain et bactérien a été détectée entre le prélèvement à l'admission et le jour du diagnostic de la PAVM. Un cut-off de 124,7 ng/μL a même pu être défini pour une sensibilité et une spécificité évaluée à 94,1% et 83,3% respectivement. Ces résultats avaient déjà été suggérés par Conway Morris *et al.* en 2016 où la présence d'un C(t) inférieur à un cut-off (non précisé dans l'étude) était associée à une sensibilité >99% et une spécificité à 72% [234]. La charge bactérienne globale semble donc être augmentée chez les patients développant une PAVM, mais cela ne semble pas être systématique puisque d'autres études n'ont pas retrouvé de tendances similaires [217].

D'autre part, deux équipes différentes ont retrouvé un lien significatif entre proportion de *Streptococcus* et survenue de pneumopathie ou de mortalité à 28 jours [220][237]. La faible abondance de *Streptococcus* chez les patients intubés-ventilés, et remarquée dans plusieurs études, était corrélée à la mortalité ou à la survenue de PAVM. La présence d'une diminution de *Streptococcus* étant couramment décrite, elle n'était significativement retrouvée que dans ces deux études à faibles effectifs (19 patients et 10 patients PAVM, respectivement). Au-delà de l'abondance spécifique des *Streptococcus*, la présence d'une dysbiose est, elle, plus fréquemment associée à un pronostic péjoratif d'évolution sous VM voire de décès [236]. La faible diversité bactérienne associée à la diminution des taxons de la flore oro-pharyngée est un facteur de risque important de développement de processus infectieux ou de mortalité [236].

Une méta-analyse publiée en 2023 et regroupant les données de plusieurs études d'intérêt vient renforcer le rôle prédictif des faibles abondances des bactéries oro-pharyngées dans le pronostic de survenue de pneumopathies [237]. Un score associant les abondances relatives de *Streptococcus*, *Atopobium*, *Oribacterium* et *Veillonella* montre des performances diagnostiques modestes (sensibilité = 73% et spécificité = 71%), mais qui viennent confirmer le rôle de la dysbiose respiratoire dans la survenue de pneumopathies (Figure 19A). Dans cette même étude, un score similaire associant les abondances relatives de *Lactobacillus*, de *Rothia* et de *Streptococcus* a permis de corrélérer le succès d'extubation en fonction de la composition du microbiote avec une sensibilité et une spécificité de 85% et de 60%, respectivement (Figure 19B). Ces résultats, prouvent que l'évolution du microbiote respiratoire est importante, mais probablement pas unique, dans le développement d'évènements infectieux et dans la durée de VM.

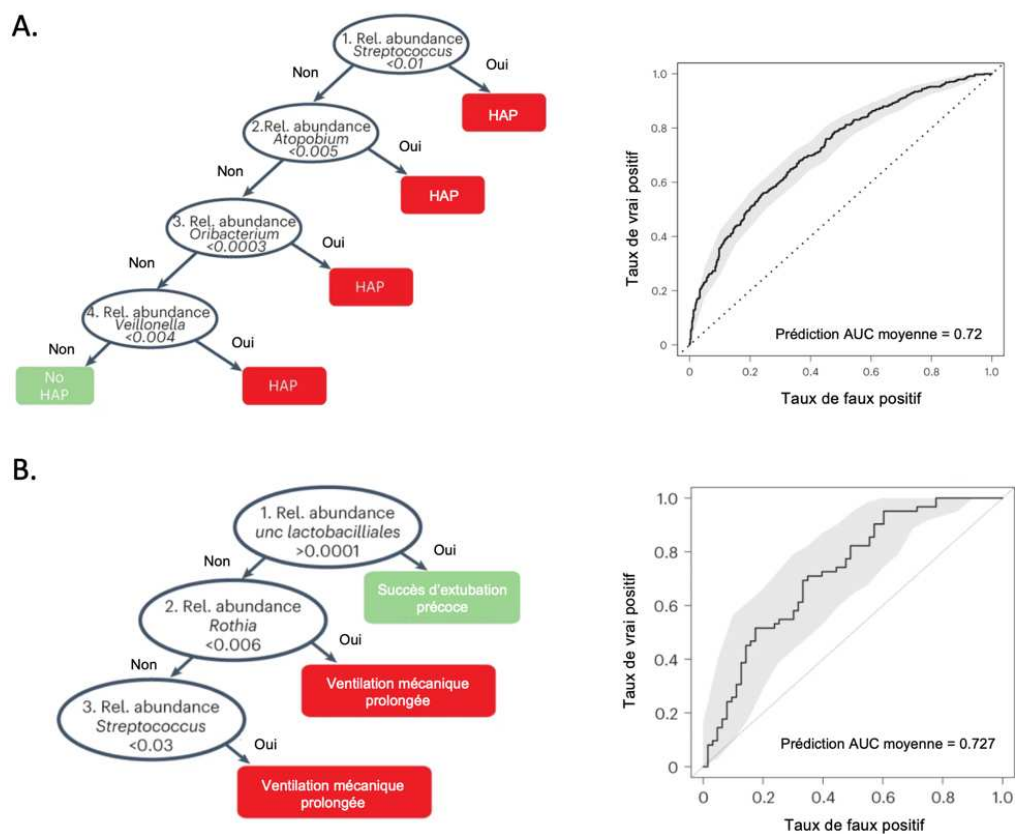


Figure 19 : Scores pronostics et courbes de ROC basés sur les abondances relatives de certains genres bactériens de la flore oro-pharyngée retrouvés dans le microbiote respiratoire des patients intubés-ventilés pour (A) le diagnostic de pneumopathie acquise à l'hôpital et (B) pour le pronostic d'extubation.

Figure adaptée d'après [237].

Il est également important de souligner que la dysbiose pulmonaire s'est avérée importante dans la physiopathologie d'autres modèles d'infection respiratoire. C'est par exemple le cas de la pneumopathie aiguë communautaire à *Legionella pneumophila* [238], à *Streptococcus pneumoniae* [239], chez l'enfant, chez l'adulte ou encore chez la personne âgée [240]. Il apparaît donc évident que des résultats similaires soient retrouvés chez le patient intubé-ventilé. En revanche, une diminution de la diversité n'a pas été observée lors de pneumopathies d'origines virales (grippe ou SARS-CoV-2) [239].

II.3.3. Modification du microbiote : intérêt des probiotiques ?

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les probiotiques comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte » [241,242]. Au niveau digestif, l'administration de probiotiques a notamment montré jouer un rôle sur la diminution de production de cytokines pro-inflammatoires, la stimulation de production de mucus, la prévention de l'apoptose cellulaire. Dans un modèle murin, l'administration digestive de *Lactobacillus rhamnosus* a permis de réduire la quantité de bactéries pathogènes dans les poumons telles que *P. aeruginosa* [243]. L'administration de *Bifidobacterium* a également permis de diminuer l'adhésion de *P. aeruginosa* sur les cellules épithéliales.

Sur le même principe que ce qui a été réalisé pour le microbiote digestif, de premières études chez l'Homme ont tenté d'observer les effets des probiotiques sur la survenue des PAVM. La majorité des études a utilisé des souches de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ou des souches de *Streptococcus* pour contrebalancer l'effet de la dysbiose respiratoire observée chez les patients intubés-ventilés. Une méta-analyse regroupant 35 études ayant administré par voie orale différents probiotiques retrouvait un risque diminué de développement de PAVM dans le groupe probiotique (6,9% de réduction), mais aucun effet sur la mortalité, les résultats de chaque étude étant néanmoins très hétérogènes [244]. L'étude récente de Johnstone *et al.* sur l'administration préventive de *Lactobacillus rhamnosus*, vient cependant confirmer les résultats décevants des probiotiques. Cette étude randomisée en double aveugle n'a pas permis de diminuer l'incidence des PAVM dans le groupe probiotique par rapport au groupe placebo [245].

De façon tout à fait intéressante, Montassier *et al.* suggèrent que la faible abondance de *Streptococcus* retrouvée dans les voies respiratoires pourrait être mise à contribution pour développer de nouveaux probiotiques. Une hypothèse physiopathologique avancée par cette équipe concerne la sécrétion d'une peptidoglycane hydrolase par les *Streptococcus* qui pourrait diminuer la gravité des infections à bactéries à Gram négatif. Les Streptocoques ou

leurs métabolites pourraient être directement utilisés dans les poumons pour apporter cet effet protecteur.

II.3.4. Limites de l'étude du microbiote respiratoire

Les études portant sur l'évaluation du microbiote respiratoire chez le patient intubé-ventilé comportent cependant un nombre important de limites et de biais qu'il est nécessaire de prendre en compte lors de l'analyse des résultats.

Premièrement, les patients inclus dans les différentes études sont extrêmement hétérogènes, en particulier les motifs d'admission, les comorbidités, les critères d'inclusion/d'exclusion ou encore les outils diagnostiques utilisés pour évaluer le critère de jugement sont très différents, ce qui influence très probablement les résultats. A titre d'exemple, l'inclusion de patients ayant des pathologies chroniques (BPCO, asthme, cancer...) influence les résultats puisque ce type de patient a plus de risque d'avoir un microbiote respiratoire altéré à l'admission. L'inclusion de patients présentant une infection respiratoire aiguë lors de l'intubation (pneumopathie aiguë communautaire, sepsis d'origine respiratoire...) ou une pneumopathie d'inhalation, comme c'est par exemple le cas de l'article de Kelly *et al.*, fausse l'interprétation des résultats [219]. La présence ou non d'une trachéostomie impacte également la survenue d'évènements infectieux puisque le tube endotrachéal ne passe pas par les voies oropharyngées. C'est par exemple le cas de l'étude de Harrigan *et al.* où tous les patients inclus étaient trachéotomisés. Enfin, les critères d'inclusion/exclusion dans les études sont peu précisés (Tableau Annexe 1).

Deuxièmement, la durée moyenne de VM des patients inclus varie grandement entre études mais également au sein d'une même étude, et influence forcément le développement ou non d'un évènement infectieux. A titre d'exemple, Kelly *et al.* ont inclus des patients sous VM de 1 à 15 jours contre 25 à 60 jours pour l'étude de Harrigan *et al.* Il est admis que plus le temps de VM est prolongé, plus le risque de survenue d'une PAVM est élevé de par le risque cumulé (bien que ce risque décroisse au cours de la VM). Mais cela dépend également des facteurs de risque du patient et de l'écologie du service de Réanimation. Dans tous les cas, ces différences importantes de durée de VM empêchent de comparer les études entre elles. Les études conduites sur le microbiote incluent actuellement des patients développant préférentiellement des pneumopathies tardives mais à des jours différents, ce qui complique également la comparaison des profils de microbiote. Il est cependant très difficile d'harmoniser les durées de VM ou de survenue de PAVM dans les études, à moins d'inclure un nombre conséquent de patients.

Troisièmement, les types d'échantillons analysés sont rarement homogènes. L'analyse du microbiote est en effet, parfois réalisée sur des LBA, parfois sur des AET ou encore sur des prélèvements oropharyngés de différentes origines (salivaires, plaque dentaire ou rétro-pharyngés). L'écosystème, la composition du microbiote ne sont pas similaires et il est très difficile de corrélérer les résultats des différents sites anatomiques.

Quatrièmement, les documentations microbiologiques en culture des prélèvements respiratoires sont extrêmement diverses. L'analyse du microbiote de patients développant des pneumopathies à *S. aureus*, à *P. aeruginosa*, à Enterobacterales ou à *Acinetobacter* n'ont probablement pas les mêmes signatures car les interactions microbiennes pulmonaires ne sont pas les mêmes selon l'agent infectieux. L'interprétation d'une documentation microbiologique des prélèvements respiratoires reste difficile lors de la survenue d'un événement infectieux. Elle est bien entendue interprétée selon la clinique mais, il peut être ardu de différencier la colonisation de l'infection d'un point de vue microbiologique surtout devant la présence de prélèvements plurimicrobiens. L'utilisation de seuils microbiologiques a essayé de contourner cette problématique mais les études sur le microbiote nous ont montré les limites d'interprétation de ces seuils.

Cinquièmement, l'utilisation d'antibiotiques dans les différentes cohortes est extrêmement variable : certaines études excluant leur administration dans les jours/semaines ou mois précédant l'inclusion, d'autres (la plupart) incluant des patients sous antibiothérapie dans différentes proportions (de quelques patients à la totalité !) [225,226] [212]. Le rôle des antibiotiques sur le microbiote respiratoire reste encore débattu mais il apparaît évident qu'il s'agit d'un biais non négligeable, le type d'antibiotique utilisé n'ayant pas le même poids sur la destruction de la flore locale. Ren *et al.* ont récemment démontré le rôle des antibiotiques sur la composition du microbiote respiratoire et en particulier sur les abondances relatives de *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Fusobacteria* et *Lactobacillus* [235].

Sixièmement, le type d'échantillons utilisés comme contrôles n'est pas identique. Il s'agit parfois de patients sains non intubés-ventilés, ou de patients intubés-ventilés n'ayant pas développé de PAVM. Il est certain que la comparaison et les résultats obtenus n'ont pas la même interprétation entre un microbiote sain et un microbiote altéré par la VM. Il est difficile d'affirmer que tous les patients intubés-ventilés inclus comme patients témoins n'aient pas développé de pneumopathie s'ils n'avaient pas été intubés plus longtemps. La comparaison du critère PAVM / non PAVM apparaît donc difficile à maintenir dans les futures études, et plusieurs équipes analysent dorénavant la mortalité, la durée de VM ou la probabilité de succès d'extubation.

Enfin, septièmement, la profondeur de séquençage, l'analyse bioinformatique et la gestion des taxons contaminants n'est pas du tout similaire entre les études. La différence du nombre d'échantillons séquencés par puce peut être important avec à la clef un nombre de

séquences générées par échantillon qui peut être variable. Par exemple, dans l'étude de Sole *et al.*, un nombre de *reads* allant de 1942 à 2 654 519 a par exemple été généré. Il apparaît évident que la détection des taxons minoritaires n'est pas homogène entre les échantillons avec ce type d'écart et peut compromettre l'interprétation des données. Pour s'affranchir de telles discordances, la génération des courbes de raréfaction et l'exclusion des échantillons n'atteignant pas l'asymptote peut/doit être envisagée. Par ailleurs, les contaminants sont un problème important dans les études sur le microbiote respiratoire du fait de la faible biomasse bactérienne des échantillons et persistent dans de nombreuses études. La mise en évidence de certains contaminants fréquents comme significativement associés à la survenue de PAVM ou à la mortalité est clairement une limite importante. L'interprétation des données bioinformatiques doit être réalisée par un microbiologiste expérimenté et remise en question lorsque certains contaminants fréquemment retrouvés dans la littérature sont présents. L'étude de Smith *et al.* ou encore de Qi *et al.* sont un exemple de la présence massive de contaminants dans l'analyse statistique (*Pedobacter*, *Hydrogenaphaga*, *Thauera*...) [246][226]. L'utilisation de *Ralstonia* - un contaminant fréquemment retrouvé dans les témoins négatifs et pouvant traverser les filtres de quelques microns - dans le score prédictif de survenue de SDRA par Montassier *et al.*, montre toute la difficulté d'analyse et d'interprétation de ces données [237]. La mise en place d'outils statistiques et bioinformatiques standardisés pour filtrer ces contaminants est donc absolument nécessaire ! Certaines études ont même supprimé les OTUs retrouvés moins de 1000 fois pour s'affranchir de ces contaminants mais au risque de perdre des données importantes de taxons minoritaires du microbiote [224]. Cette limite doit être particulièrement considérée et améliorée dans le futur.

Toutes ces variables (profils de patients inclus, utilisation d'antibiotiques, jours et types de prélèvements collectés, échantillons contrôles, gestion des contaminants...) influencent énormément l'interprétation finale des données de microbiote et brouillent les messages observés. Il est nécessaire d'interpréter chaque profil de patient indépendamment. Il apparaît donc extrêmement difficile de comparer les études entre-elles. La méta-analyse réalisée par Montassier *et al.* montre d'ailleurs dans l'interprétation du lien entre microbiote et survenue de SDRA, qu'il y a un effet de l'étude sur les données comparées. Cet effet lié aux profils de patients inclus perturbe la comparaison des études entre-elles [237].

Chapitre III. *Staphylococcus aureus* et PAVM

La documentation microbiologique fait partie du diagnostic de la PAVM, mais elle est surtout essentielle dans la prise en charge thérapeutique et le choix de l'antibiothérapie. La culture, l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF et surtout l'antibiogramme permettent l'adaptation du traitement antibiotique au(x) microorganisme(s) présent(s).

Comme nous l'avons vu précédemment, les PAVM peuvent être causées par différents bactéries avec une incidence importante (jusqu'à 40%) en Europe de l'Ouest liée notamment à *Staphylococcus aureus* particulièrement dans le contexte des PAVM précoces [137].

III.1. De la contamination autogène à l'infection

III.1.1. Caractéristiques générales

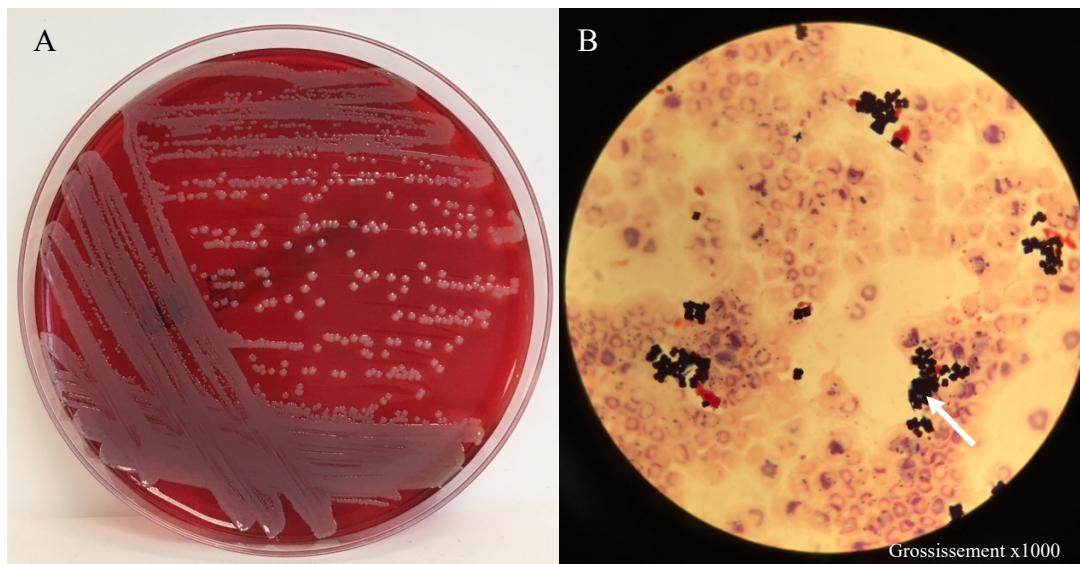


Figure 20 : (A) Photographie d'une culture pure de *Staphylococcus aureus* sur milieu gélosé au sang de mouton après 24h d'incubation. A noter la franche hémolyse bêta autour des colonies. (B) Photographie d'une coloration de Gram d'une hémoculture positive à *S. aureus* avec un regroupement typique de cocci à Gram positif en amas.

Photos collection personnelle. D'après [247].

Staphylococcus aureus est un cocci à Gram positif qui se regroupe habituellement en amas (Figure 20). D'un point de vue taxonomique, l'espèce *S. aureus* appartient au règne des Bactéries, au phylum des Bacillota, à la classe des Bacilli, à l'ordre des Caryophanales, à la famille des *Staphylococcaceae* et au genre *Staphylococcus*. *S. aureus* se distingue des autres espèces par la présence d'une coagulase libre (Staphylocoque à coagulase positive), ce qui

augmente le pouvoir pathogène de la bactérie par sa capacité à générer des coagulums dans le plasma.

Cette bactérie est composée d'un chromosome unique et circulaire évalué entre 2,7 et 2,9 Mb avec près de 2800 gènes. La diversité génétique est faible chez cette espèce bactérienne, elle s'explique essentiellement par l'acquisition de mutations ponctuelles ou d'éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou transposons) [248].

III.1.2. Impact de la virulence chez *S. aureus*

La virulence bactérienne est définie comme « toute protéine, glycoprotéine ou lipide exprimé ou sécrété par la bactérie qui l'aide à envahir et franchir les barrières de l'hôte , à provoquer la maladie ou à échapper au système immunitaire » [247].

Classiquement, les facteurs de virulence sont différenciés en plusieurs catégories [249]:

- les protéines de surface et d'adhésion,
- les enzymes dégradant la matrice extracellulaire,
- les protéines participant à la formation du biofilm,
- les systèmes d'acquisition du fer,
- les systèmes permettant la mobilité bactérienne,
- les exotoxines et cytotoxines responsables de dommages cellulaires,
- les protéines permettant l'échappement à la réponse immunitaire.

S. aureus possède un arsenal de facteurs de virulence permettant le déclenchement d'une infection même chez le patient immunocompétent. La Figure 21 reprend les principaux facteurs de virulence présents chez *S. aureus*. Il n'existe pas de système permettant la mobilité chez *S. aureus* (bactérie immobile). En revanche, de nombreuses protéines permettant l'adhésion ont été décrites telles que les MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), les SERAMs (*Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules*) et la protéine A. Les fonctions et les effets de ces protéines sur la virulence sont répertoriés dans le Tableau 7.

Parmi les autres facteurs de virulence, les protéines permettant d'échapper au système immunitaire (Tableau 7), les enzymes (Tableau 8) ou encore les toxines (Tableau 9) permettent de leurrer le système immunitaire tout en protégeant la bactérie et en induisant des lésions aux cellules hôtes. Cette grande capacité d'adaptation fait de *S. aureus* un pathogène notable en médecine humaine.

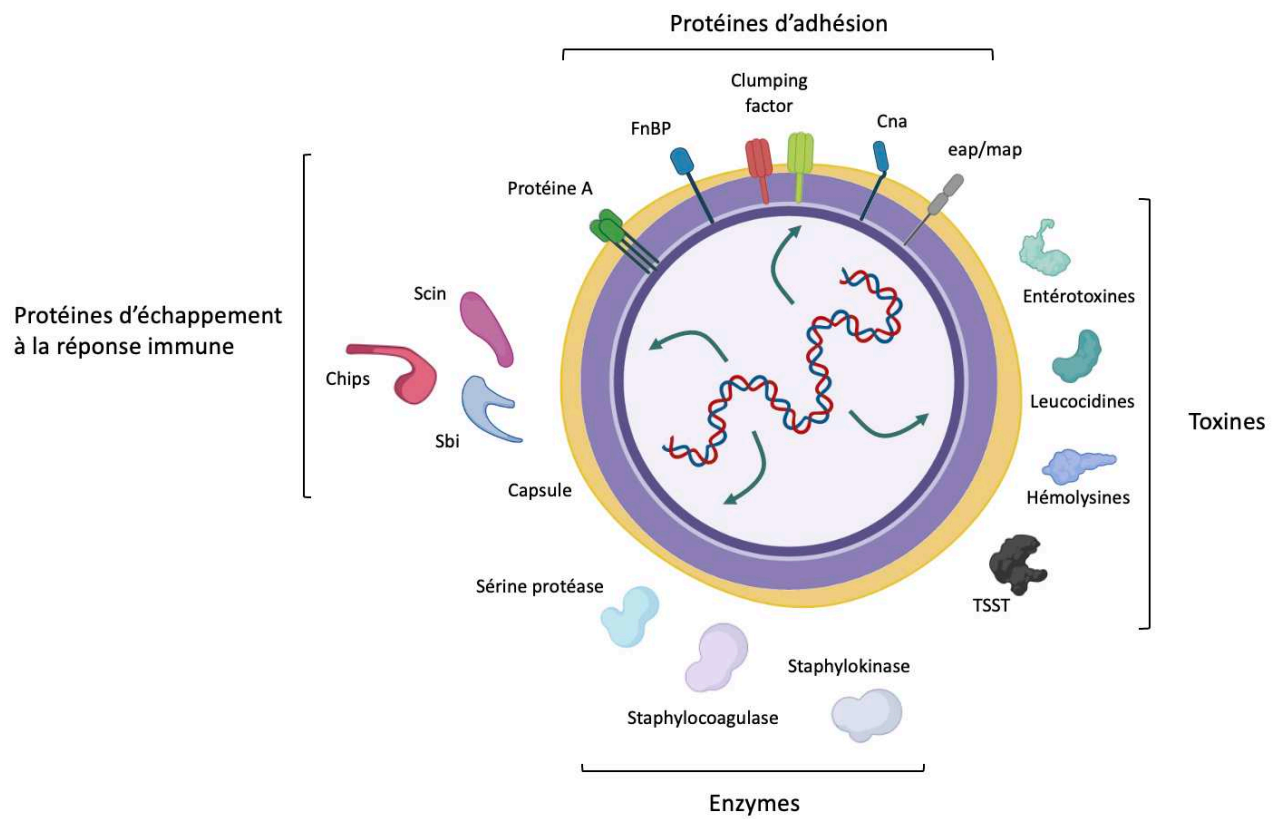


Figure 21 : Principaux facteurs de virulence retrouvés chez *S. aureus*.

Tableau 7 : Principales protéines de surface permettant l'adhésion et l'échappement à la réponse immune chez *S. aureus*.

Famille	Protéine d'adhésion	Gène	Fonctions	Effet sur la virulence
	Clumping factor A Clumping factor B	<i>clfA</i> <i>clfB</i>	Liaison au fibrinogène et adhésion aux surfaces abiotiques (matériaux, plastiques) ClfB est également impliqué dans la colonisation nasale	Adhésion aux surfaces Agglutination du sérum (protection, activité antiphagocytaire)
MSCRAMMs	Protéines liant le fibronectine Protéine liant le collagène	<i>fnbA fnbB</i> <i>cna</i>	Liaison à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ via la fibronectine Liaison au collagène et séquestration de la protéine C1q du complément	Réarrangements du cytosquelette et internalisation de la bactérie Participation à la dissémination osseuse et tissulaire
	Coagulase libre	<i>coa</i>	Liaison de la prothrombine et activation de la cascade de la coagulation	Formation de caillots sanguins, échappement au système immunitaire
	Autolysines	<i>atlE</i>	Dégradation de la paroi bactérienne, liaison aux acides teichoïques et différents plastiques	Colonisation des matériaux
SERAMs	Protéines d'adhérence extracellulaire Protéines liant le fibrinogène Protéines liant l'élastine	<i>eap/map</i> <i>efb</i> <i>ebp</i>	Forte affinité pour le fibrinogène, la vitronectine ou les sialoprotéines. Agrégation de l'ADN libre Liaison au fibrinogène et au facteur C3 du complément Liaison à l'élastine	Augmentation de l'adhésion bactérienne à la MEC et dégradation des NETs Participation à la colonisation des tissus tels que le poumon, la vessie ou la peau
Autres protéines d'adhésion	Protéine A	<i>spa</i>	Liaison au fragment Fc des IgG et blocage de l'opsonisation Liaison possible au facteur de Willebrand	Diminution de la phagocytose, Augmentation de la liaison aux cellules endothéliales
	Capsule	<i>cap</i>	Résistance à l'opsonisation des polynucléaires	
Échappement à la réponse immune	Protéine liant les Igs Protéines inhibant la chimiotaxie Protéine inhibant le complément Staphylokinase	<i>sbi</i> <i>chips</i> <i>scin</i> <i>sak</i>	Inhibition de la liaison des immunoglobulines Liaison et masque le récepteur C5aR du complément Inhibition de la chimiokine C5a par séquestration du complexe C3-convertase Activation de la formation de plasmine	Diminution de la phagocytose, de la migration cellulaire et de l'efficacité du complexe d'attaque membranaire Participation à la dissémination de <i>S. aureus</i> dans l'organisme

Fc = fragment constant des immunoglobulines, Igs = immunoglobulines, MEC = matrice extracellulaire, NETs = *Neutrophil extracellular trap*

Tableau 8 : Principales enzymes et impact sur la virulence chez *S. aureus*.

Tableau adapté d'après [247] et [250]

Enzyme	Gène	Fonctions	Effet sur la virulence
Sérine protéase A	<i>spIA</i>	Maturation des protéines de surface Modulation de la production des facteurs de virulence (clivage)	Favorise la colonisation Impact global sur l'expression de la virulence
Sérine protéase B	<i>spIB</i>		
Sérine protéase C	<i>spIC</i>		
Sérine protéase D	<i>spID</i>		
Sérine protéase E	<i>spIE</i>		
Sérine protéase F	<i>spIF</i>		
Sérine protéase V8	<i>sspA</i>	Nécessaire à la survie et à la croissance de <i>S. aureus</i> Participe à la maturation de SspB et SspC	Dégradation des immunoglobulines humaines Implication dans le choc septique
Cystéine protéase B	<i>sspB</i>	Cystéine endopeptidase	Destruction tissulaire, ulcération
Cystéine protéase C	<i>sspC</i>	Inhibiteur de SspB	Inhibition de l'activation des polynucléaires neutrophiles
Métalloprotéase	<i>aur</i>	Maturation et clivage de diverses protéines de surface / sécrétées	Clivage de la protéine C3 du complément Clivage de peptides antimicrobiens
Thermonucléase	<i>nuc</i>	Activité d'endo et d'exo-nucléase	Relâchement du biofilm par dégradation de l'ADN libre. Dégradation et échappement aux NETs Induction de l'apoptose des macrophages
Hyaluronidase	<i>hysA</i>	Dégradation des polymères d'acides hyaluroniques	Dégradation de la MEC : dommages tissulaires (rôle avéré dans la pneumopathie chez la souris) Dissémination de la bactérie
Lipases	<i>lip1/geh</i>	Production d'acides gras à chaînes courtes	Colonisation de sites riches en acides gras (sébum, peau) Empêche le développement de la flore locale

MEC = matrice extracellulaire, NETs = *Neutrophil extracellular trap*

Tableau 9 : Principales toxines observées chez *S. aureus* responsables de la cytotoxicité.

Toxines	Gène	Fonctions	Effet sur la virulence
Hémolysines	<i>hla</i> <i>hlb</i> <i>hld</i> <i>hlg</i>	Formation de pores dans la membrane	Action pro-inflammatoire et cytotoxique
Leucocidine de Panton Valentine	<i>lukPV, lukS</i>	Insertion dans la membrane cytoplasmique des polynucléaires neutrophiles et formation de pores	Nécrose cellulaire
Leucocidine à deux composés D et E	<i>lukD</i>	Lyse des cellules immunitaires par formation de pores	Cytolyse et action pro-inflammatoire importante
	<i>lukE</i>	Lyse des érythrocytes pour faciliter la disponibilité de fer	
Exfoliatines	<i>eta</i> <i>etb</i> <i>etd</i>	Forte affinité pour la desmogléine-1 localisée dans les jonctions des épithéliums cellulaires	Actions épidermolytiques
Entérotoxines	<i>sea</i> <i>seb</i> <i>sec</i> <i>seg, sei, sem,</i> <i>sen, seo, seu</i> <i>seq, sek</i>	Toxines superantigéniques	Responsables des manifestations digestives lors d'intoxications alimentaires
Toxine du syndrome du choc toxique	<i>tst</i>	Toxine superantigénique Reconnaissance de la chaîne V β du TCR des lymphocytes	Activation de la réponse immunitaire et génération d'une décharge cytokinique avec défaillance d'organes Effet pro-inflammatoire et cytotoxique direct

III.1.3. Les PAVM à *S. aureus*

S. aureus colonise de façon naturelle les voies respiratoires supérieures (nez, rhinopharynx) de près d'un tiers de la population humaine [251]. C'est d'ailleurs sa niche écologique chez l'Homme. La présence d'une colonisation nasale est considérée comme un facteur de risque important de développer une infection [252]. Chez un même patient, les isolats retrouvés au niveau nasal appartiennent très souvent au même complexe clonal [253], bien que plusieurs types de séquences (ST) peuvent être retrouvés dans moins de 10% des cas [254].

Chez le patient intubé-ventilé, la présence du tube endotrachéal est un facteur propice au développement de *S. aureus* dans les poumons. La translocation de la bactérie des voies respiratoires supérieures vers les voies respiratoires inférieures par la micro-aspiration de sécrétions contribue à la colonisation des poumons. L'expression d'une multitude de molécules d'adhésion facilite l'attachement et la persistance de la bactérie au niveau pulmonaire [255]. Bien qu'il soit un pathogène principalement aérobic et extracellulaire, *S. aureus* peut persister et croître dans des conditions moins favorables (anaérobiose locale, milieu intracellulaire), qui sont importantes dans le poumon où une atmosphère anaérobic est fréquente. La persistance au sein de divers types cellulaires tels que les macrophages, les polynucléaires ou les cellules épithéliales complique également son éradication et favorise sa dissémination systémique [255].

S. aureus est une cause peu fréquente d'infection pulmonaire en milieu communautaire (environ 1 à 2% des infections nécessitant une hospitalisation), c'est un pathogène bien plus redoutable en service de Réanimation [256]. Dans l'étude de Paling *et al.*, le taux de PAVM à *S. aureus* en Europe de l'Ouest a été clairement associé au portage nasal [257]. Les auteurs retrouvaient un risque de PAVM de 15,9 pour 1000 jours de ventilation chez les patients colonisés contre 2,2 pour 1000 jours de ventilation chez les patients non colonisés. La survenue d'un tel évènement est généralement précoce (aux alentours de 3 à 4 jours), ce qui tend à démontrer que les patients s'infectent à partir de leur propre souche de portage après translocation des voies respiratoires supérieures vers les voies inférieures. La transmission de *S. aureus* en services de soins critiques est, de ce fait, essentiellement autogène et beaucoup plus exceptionnelle par transmission croisée (hygiène des mains, des surfaces) [258]. Dancer *et al.* ont étudié par séquençage haut-débit la transmission des souches de *S. aureus* en service de Réanimation et ont mis en évidence une majorité de souches transmises de manière autogène, certaines souches transmises plus rarement de patients à patients, par le personnel soignant ou par le matériel et les surfaces [259].

S. aureus est fréquemment responsable de PAVM en particulier précoces. La pneumopathie à *S. aureus* survient lorsque la bactérie accède à l'épithélium respiratoire bas et induit une activation accrue des réponses immunitaires innées (activation des PNN et recrutement des macrophages). Cette étape peut être facilitée si une infection virale (grippe, SARS-CoV-2...) ou une lésion de l'épithélium est déjà présente. *S. aureus* a notamment été responsable de nombreuses surinfections lors de la pandémie à SARS-CoV-2 [260].

Par ailleurs, c'est la première cause de PAVM chez le patient traumatisé crânien. Plusieurs études ont montré une incidence accrue de PAVM précoce dans cette population et en particulier dans les traumatismes crâniens sévères [117,119]. Le mécanisme d'action n'est pas encore totalement compris, mais il semblerait que le traumatisme tissulaire impacterait la clairance des PNN et des macrophages par l'augmentation du niveau d'hème plasmatique [261]. Plusieurs facteurs protecteurs sembleraient toutefois limiter la survenue de PAVM dans cette population comme un âge avancé ou la consommation de tabac [117]. Cependant, la mortalité de ces formes de PAVM est beaucoup plus faible que celles des patients admis pour d'autres causes que des traumatismes, sans que cela ne soit vraiment élucidé [262]. Le risque de rechutes de pneumopathies à *S. aureus* demeure haut malgré la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. L'étude de Decavèle *et al.* montre de manière rétrospective et monocentrique, un pourcentage de rechute évalué à 33% post PAVM à *S. aureus*, la plupart de ces PAVM étant liées à des échecs de traitement et à la persistance de la bactérie dans les voies respiratoires malgré une antibiothérapie adaptée [263]. Dans cette même étude, la présence de streptocoques ou de flore oro-pharyngée dans les prélèvements respiratoires bas au moment du diagnostic était associée à un taux de rechute plus important (62% contre 13%).

La persistance de *S. aureus* dans les voies respiratoires malgré l'utilisation d'une antibiothérapie adaptée et le risque de rechute élevé font apparaître toutes les limites de l'utilisation des antibiotiques au niveau respiratoire. A cela s'ajoute également tous les événements indésirables liés à l'utilisation prolongée de certains antibiotiques (insuffisance rénale aiguë, thrombocytopenie, allergies...) ainsi qu'au risque de perturbation des flores microbiennes déjà lourdement impactées par l'hospitalisation en service de soins critiques et par l'utilisation d'autres thérapeutiques (risque d'acquisition de BMR ou d'infection à *Clostridioides difficile*)[80]. De ce fait, d'autres stratégies ont été développées ou sont en cours de développement. Parmi celles-ci, le développement d'anticorps ciblés contre certains facteurs de virulence [264,265], de vaccins à ARNm [266], de phages lytiques ou encore de peptides antimicrobiens promettent de possibles nouvelles thérapeutiques dans le traitement des PAVM à *S. aureus* (Figure 22). Une meilleure compréhension des isolats responsables de PAVM est donc nécessaire pour optimiser de nouveaux traitements anti-staphylococciques.

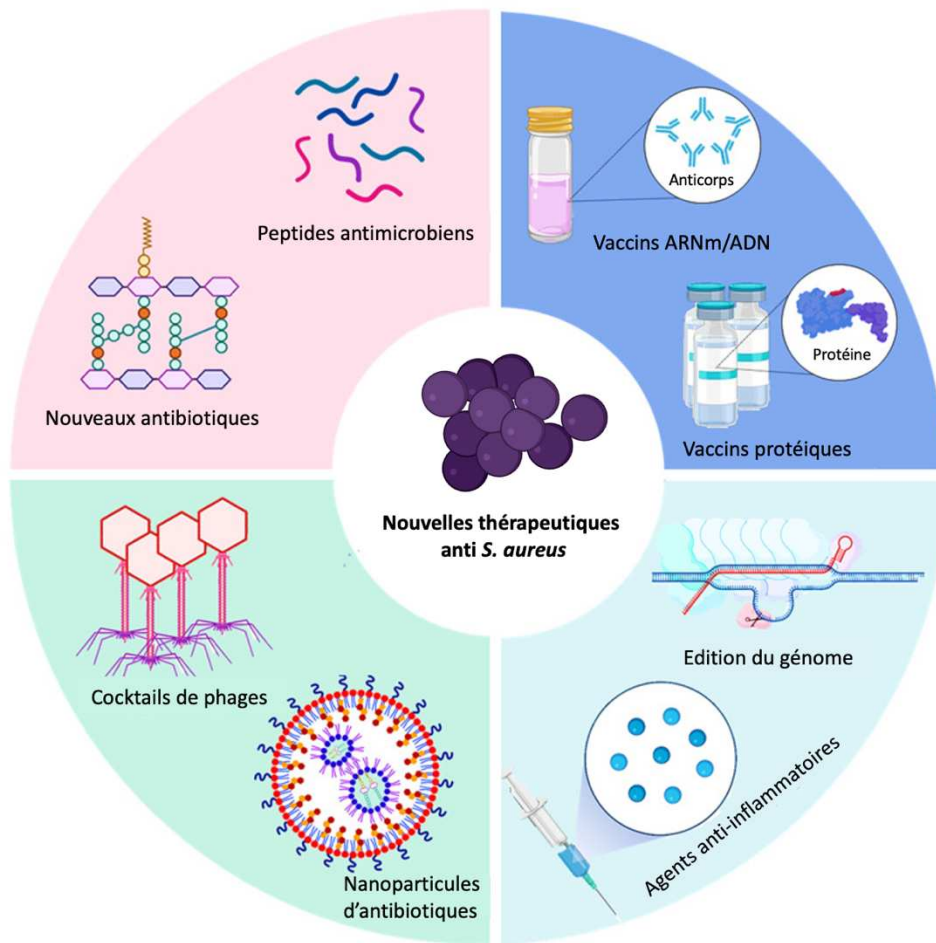


Figure 22 : Nouvelles stratégies thérapeutiques anti *S. aureus* en développement.
 Figure adaptée et traduite d'après [267].

Objectifs du travail de thèse

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la PAVM, ce travail de thèse s'est déroulé en utilisant trois approches différentes et complémentaires permettant de mieux comprendre la transition de l'étape de colonisation vers l'étape d'infection.

Premièrement, nous avons suivi la cinétique d'évolution du microbiote respiratoire par amplification et séquençage de l'ADN codant l'ARNr16S durant les sept premiers jours d'intubation dans une cohorte homogène de patients intubés-ventilés n'ayant pas reçu d'antibiotiques dans les 2 semaines précédentes : étude SCORPIUS. L'objectif était de suivre l'évolution quotidienne du microbiote durant l'intubation, en comparaison aux résultats de la culture microbiologique, et de corrélérer ces résultats à l'évolution naturelle de la PAVM.

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer les différents outils cliniques et microbiologiques utilisés classiquement dans le diagnostic d'une PAVM au lit du malade. Nous avons collecté et analysé microbiologiquement la totalité des sécrétions respiratoires de patients intubés-ventilés, à raison de plusieurs aspirats endotrachéaux journaliers, afin de mieux comprendre les liens entre résultats microbiologiques et cliniques : étude INSPIRE. Le microbiote d'une partie de ces aspirats a également été déterminé de façon beaucoup plus fine afin de mieux comprendre les variations nyctémérales du microbiote.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques génomiques du principal pathogène responsable de la survenue de PAVM précoces, à savoir *Staphylococcus aureus*, et à son implication dans la survenue d'une PAVM. Le séquençage complet de près de 180 génomes a été effectué rétrospectivement sur une période de plus de deux ans au niveau du service de Réanimation du CHU de Limoges et les résultats génomiques ont été comparés à la survenue d'une pneumopathie : étude SSUPREM.

Premier travail : Suivi cinétique du microbiote respiratoire chez les patients intubés-ventilés en Réanimation : étude SCORPIUS

L'objectif de ce premier travail était de décrire l'évolution quotidienne du microbiote respiratoire dans une cohorte de patients intubés-ventilés du jour de l'intubation jusqu'à J7 ou jusqu'à l'extubation ou la survenue d'une PAVM.

1. Protocole de l'étude

Nous avons inclus des patients adultes intubés-ventilés sur cause neurologique, c'est-à-dire des patients admis pour traumatisme crânien, accident vasculaire cérébral hémorragique, ou coma. Cette population a été préférentiellement ciblée afin de limiter les comorbidités, l'exposition aux antibiotiques (pas d'infection active à l'admission et pas de comorbidités). La Figure 23 reprend les principales caractéristiques du protocole réalisé pour l'analyse du microbiote respiratoire. Les AET de chaque patient ont été collectés le premier jour après l'intubation puis tous les matins, dès lors que le patient était suffisamment sécrétant.

Dès l'arrivée du prélèvement au laboratoire, l'échantillon était séparé en plusieurs aliquotes d'environ 500 μ L. Un aliquote était utilisé pour la culture microbienne et les autres étaient congelés pour analyse ultérieure du microbiote. La culture microbiologique sur échantillon respiratoire a été réalisée selon les recommandations françaises et européennes [94,95]. Un exemple de culture positive est présenté en Figure 24. Chaque bactérie retrouvée en culture a été semi-quantifiée dans les différents prélèvements.

La technique d'analyse du microbiote a été mise en place et effectuée au laboratoire au cours de ce travail. Une aliquote de 500 μ L d'AET a été décongelée, puis l'ADN humain a été déplété en utilisant le kit MoLYsis Basic 5 (Molzym) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit permet de spécifiquement dépléter l'ADN humain grâce à l'utilisation d'une DNase ciblant l'ADN eucaryote mais également de concentrer l'échantillon en bactéries par centrifugation. Plusieurs études ont montré précédemment que l'utilisation de ce kit n'impactait pas la composition bactérienne, et qu'il permettait de relarguer efficacement l'ADN bactérien tant pour les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif [268–270].

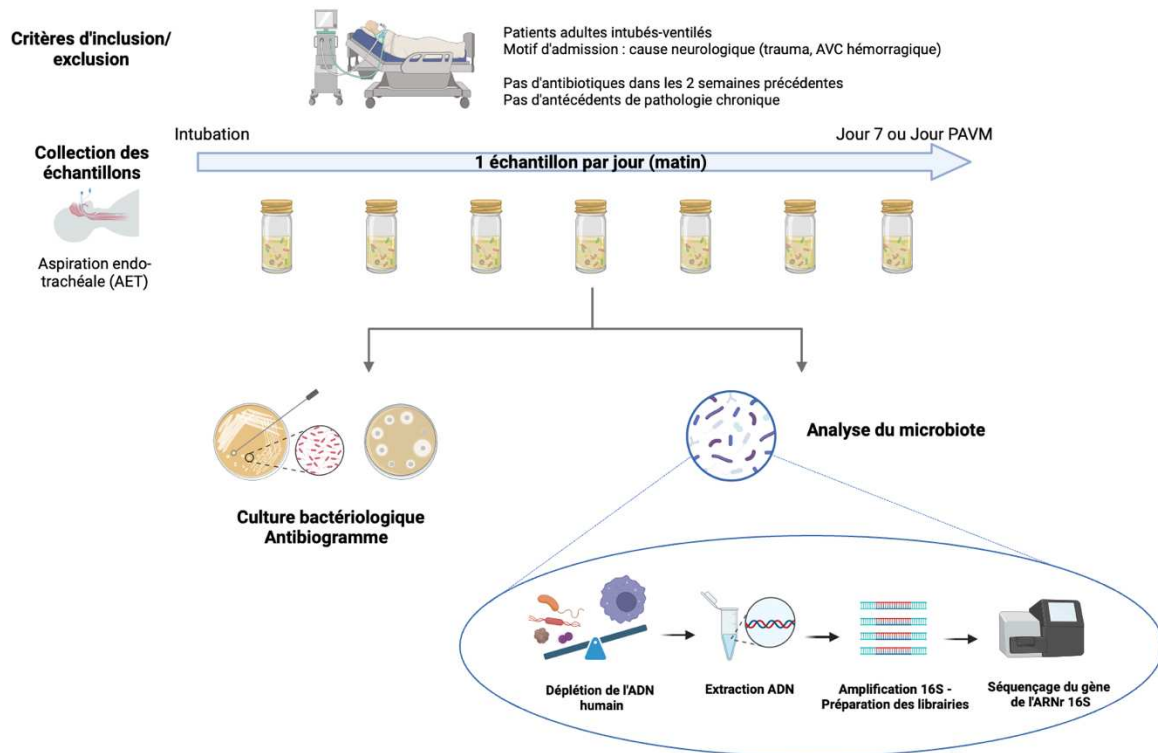


Figure 23 : Présentation du protocole global de l'étude SCORPIUS, du recueil à l'analyse des échantillons.

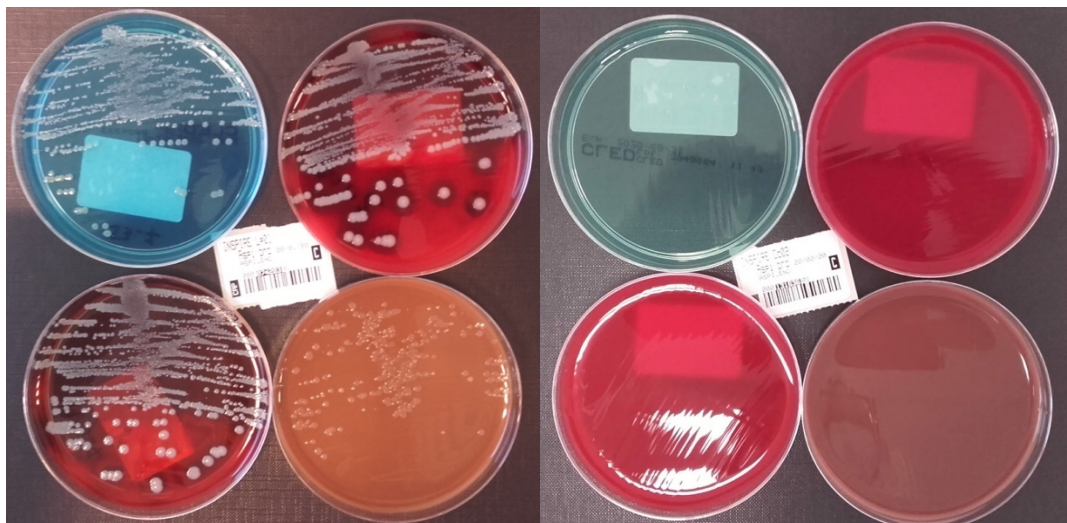


Figure 24 : Exemple d'une culture positive à *S. aureus* et *H. influenzae* (à gauche) et d'une culture négative (à droite).

Deux géloses non sélectives (une gélose au sang et une gélose CLED - cystéine, lactose, électrolyte déficient -) et deux géloses sélectives (une gélose au sang additionnée de colistine et d'aztréonam pour sélectionner les bactéries à Gram positif et une gélose chocolat additionnée de bacitracine, de vancomycine et d'amphotéricine B pour sélectionner les bactéries à Gram négatif) ont été ensemencées pour chaque prélèvement.

L'extraction de l'ADN a ensuite été réalisée sur l'automate d'extraction SaMag (Sacace Biotechnologies) avec le kit *Bacterial DNA extraction*. L'amplification du gène codant l'ARN16S a été effectuée avec le kit Ion 16S Metagenomics® Kit qui permet l'amplification de 6 fragments contenant 7 des 9 régions variables du gène de l'ARN16S (Figure 25). Puis les librairies ont été préparées avec le kit recommandé Ion Core Plus Fragment sur l'automate Library Builder.

Enfin, le séquençage haut-débit a été généré sur la plateforme Ion GeneStudio S5 utilisant la technologie Ion Torrent.

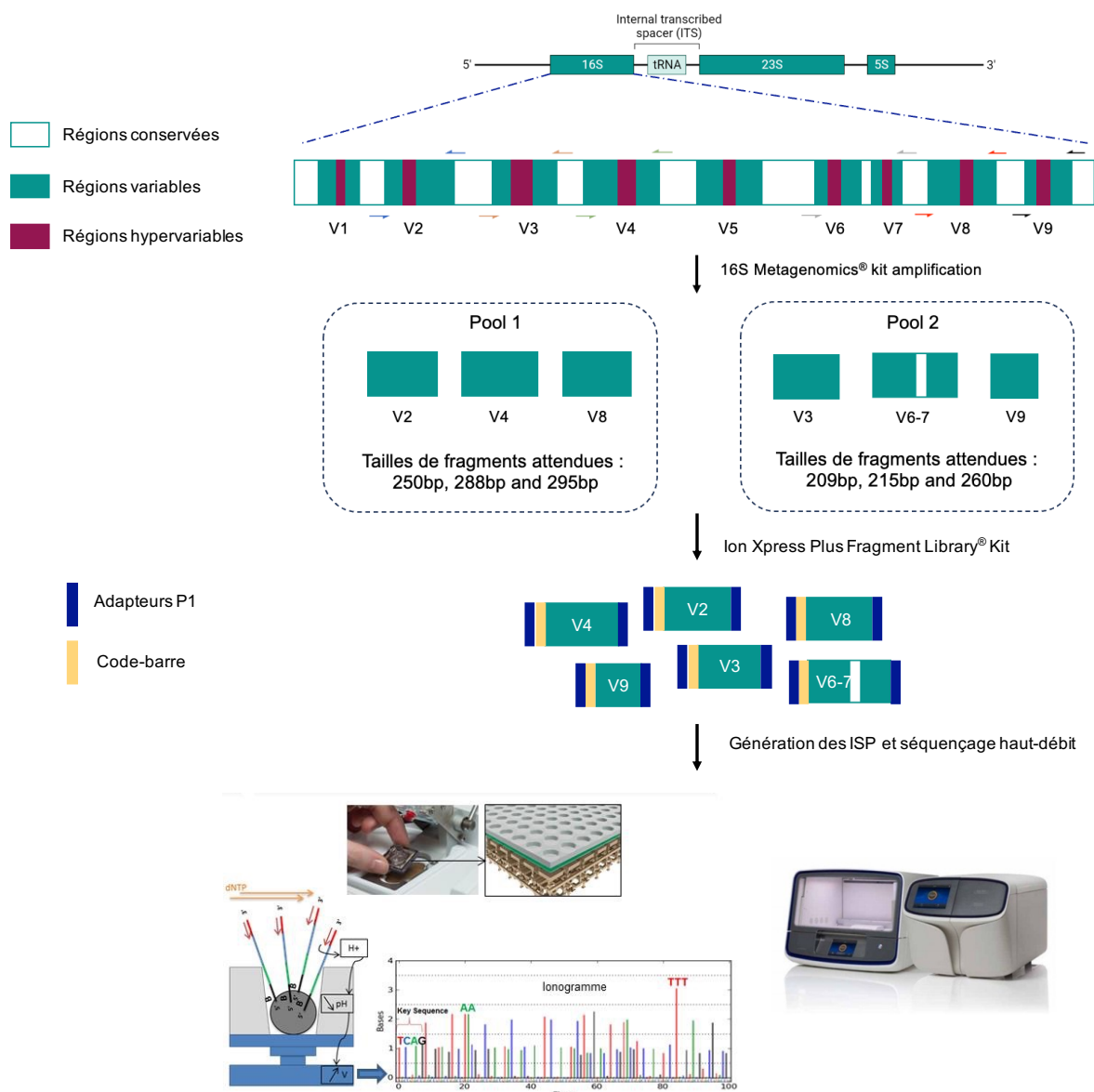


Figure 25 : Protocole général d'amplification et de séquençage des régions variables du gène codant l'ARNr16S.

L'analyse bioinformatique a été conduite à partir des fichiers BAM sur la suite Ion Reporter v5.16 mise à disposition par le fournisseur. Une fois les OTUs générées, elles ont été confrontées à la base de données MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 (seuil de confiance > 99%). La richesse, la diversité alpha (indice de Shannon) et la diversité bêta ont été évaluées à l'aide des indices de dissimilarité de Bray Curtis avec le logiciel Primer-e v7.

À J1, pour comparer le microbiote respiratoire des patients développant une PAVM ou non, les tests DistLM et PERMANOVA ont été utilisés. Pour mieux comprendre les changements de microbiote au cours de la PAVM, deux scénarios ont été créés car tous les patients n'avaient pas développé une PAVM au même jour :

- Scénario 1 : en prenant le jour 3 comme point comparatif (« Day_{end} = Day₃ »)
- Scénario 2 : en prenant le jour de la PAVM comme point comparatif (« Day_{end} = Day_{VAP} »)

Les profils taxonomiques comparatifs ont été évalués avec le test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Une valeur de $p < 0,05$ a été utilisée comme seuil de signification statistique. L'analyse canonique des coordonnées principales (CAP) a été utilisée à partir de l'ensemble du microbiote ou d'espèces significatives pour prédire la PAVM ou l'absence de survenue de PAVM.

2. Principaux résultats de l'étude

Douze patients ont été inclus dans ce premier travail, avec un total de 62 échantillons collectés de façon quotidienne. Quatre patients ont développé une PAVM documentée microbiologiquement à *S. aureus*, quatre patients étaient colonisés à *S. aureus* et quatre patients n'étaient pas colonisés à *S. aureus*. D'autres bactéries colonisant les voies respiratoires ont été mises en évidence comme des Enterobacterales (6 patients), *Haemophilus influenzae* (2 patients), *Moraxella catarrhalis* (2 patients) ou encore *Streptococcus pneumoniae* (1 patient). Trois PAVM ont été documentées à J3 et une PAVM à J7.

2.1. Composition du microbiote respiratoire

Nous avons premièrement mis en évidence une évolution très hétérogène du microbiote respiratoire qui différait grandement selon les patients. Un même patient pouvait présenter des variations très importantes du microbiote ou bien conserver un microbiote

similaire au cours de l'intubation. Les résultats retrouvés en culture microbiologique et en séquençage haut débit étaient globalement concordants.

La diversité alpha était extrêmement variable entre patients mais également entre échantillons pour un même patient, sans aucune tendance évolutive au cours de la VM.

Enfin, l'analyse de la diversité bêta a permis de montrer que la composition du microbiote à J1 était similaire entre tous les patients (test PERMANOVA, $p > 0,05$) mais également qu'aucune caractéristique clinique (sexe, âge, IMC, motif d'admission) n'impactait la composition du microbiote.

2.2. Comparaison selon le statut infectieux

La comparaison du microbiote selon le diagnostic de PAVM a été réalisée grâce à l'analyse des centroïdes, qui regroupent ensemble les résultats de chaque groupe selon le jour de prélèvement (Figure 26). L'analyse des centroïdes a permis de mettre en évidence que, dès le deuxième jour après l'intubation, une différence significative dans la composition du microbiote était observée entre les patients qui allaient développer une PAVM et ceux qui restaient colonisés (PERMANOVA : $p < 0.001$).

Afin d'identifier quels taxons étaient à l'origine de cette modification du microbiote entre nos deux groupes, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney-Wilcoxon. De façon tout à fait intéressante, nous avons détecté une augmentation de certaines bactéries anaérobies (bactéries du genre *Prevotella*) dans le groupe PAVM et cela qu'importe le scénario étudié (selon le jour 3 ou le jour de la PAVM). Une tendance à la diminution de certains taxons comme les bactéries des genres *Rothia* ou *Actinomyces* a également été observée dans le groupe PAVM.

Enfin, à partir de ces résultats nous avons souhaité prédire le diagnostic selon la composition du microbiote. L'analyse canonique en coordonnée principale (CAP) a permis de correctement classer les patients du groupe PAVM un jour avant la survenue de la PAVM et qu'importe le scénario étudié (Figure 27). Le pourcentage de classification était cependant plus faible dans le groupe non-PAVM.

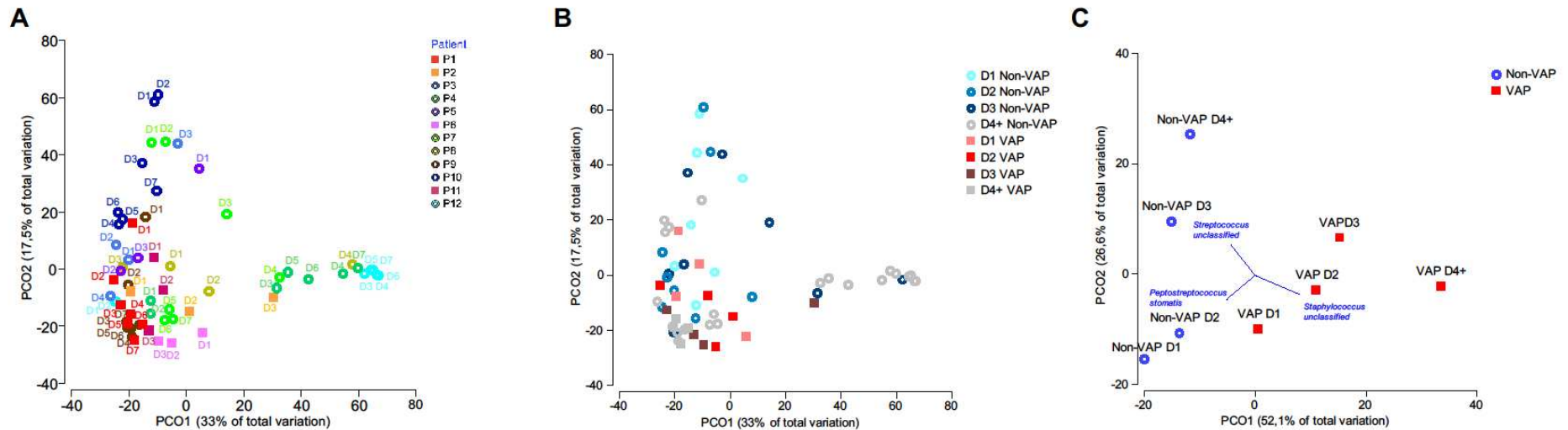


Figure 26 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) de la composition du microbiote respiratoire.

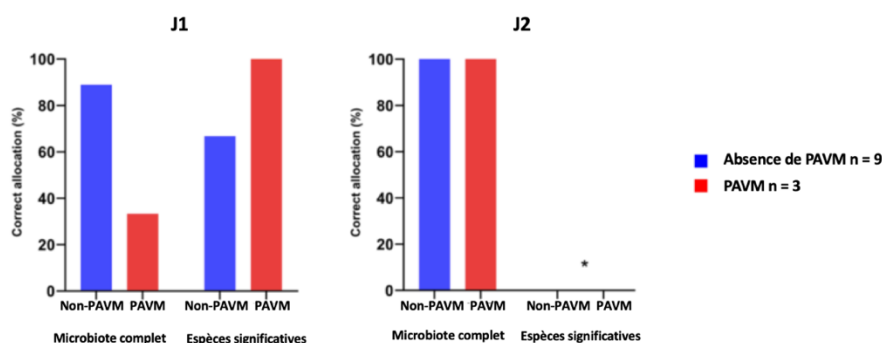
A. Comparaison des profils selon le jour de prélèvement.

B. Comparaison selon le statut infectieux et le jour de prélèvement. A noter que pour tous les patients, les échantillons étaient disponibles pour les jours 1 à 3, mais pas au-delà et ont donc été combinés sous l'appellation « D4+ ».

C. Les communautés bactériennes définies par le jour d'échantillonnage et l'apparition de VAP ont été regroupées en centroïdes. La différence n'était pas significative au jour 1 (PERMANOVA $p > 0,05$). Les vecteurs de corrélation de Pearson ($> 0,7$) entre l'abondance relative des espèces et les axes PCo sont présentés à l'origine de la PCoA.

D: jour post intubation; VAP: pneumopathie acquise sous ventilation mécanique.

A. Scénario 1 : analyse selon statut à J3



B. Scénario 2 : analyse selon statut PAVM (J3 ou J7)

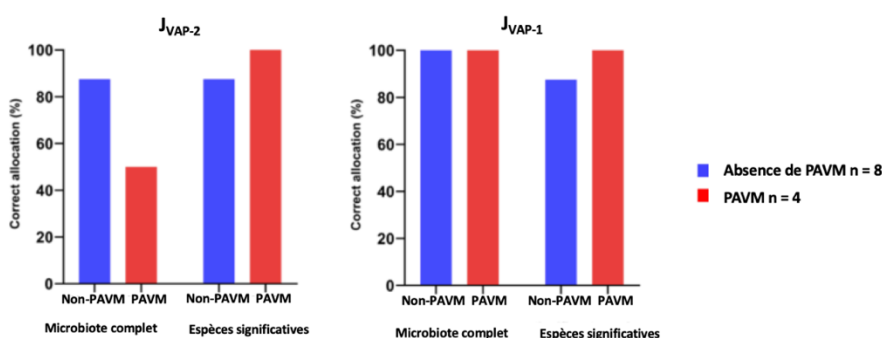


Figure 27 : Analyse canonique en coordonnée principale (CAP) selon (A) le scénario au troisième jour ou selon (B) le scénario au jour de survenue de la PAVM.

Chaque barre représente le pourcentage d'allocation correct des échantillons aux groupes PAVM ou non-PAVM après validation croisée soit sur toutes les abondances relatives du microbiote, soit uniquement sur les abondances relatives des espèces significatives identifiées grâce aux tests de Mann-Whitney-Wilcoxon (à savoir *Prevotella spp*, *Pasteurellaceae*, *Howardella spp*, *Catonella morbi*, *Neisseria flavescens*). Lors du suivi de ces espèces spécifiques, la CAP a autorisé une allocation de 100 % dans le groupe PAVM (rouge) qu'importe le scénario et le jour d'étude. L'allocation de groupe non-PAVM (bleu) était comprise entre 66,6 et 87,5 % à J1.

*La détermination de la CAP n'a pas été possible en raison de plusieurs abondances relatives égales à 0.

3. Valorisation

Ces travaux ont fait l'objet d'un abstract accepté sous forme de **communication affichée au congrès de l'ECCMID** (*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) en **2020** (Poster numéro P1318) : *Next generation sequencing for kinetics of the respiratory microbiota of ICU intubated patients*.


Ces travaux ont été valorisés via une **publication scientifique (lettre à l'éditeur)** dans le journal ***Intensive Care Medicine Experimental*** en 2023 pour laquelle je suis premier auteur et qui est présentée ci-après.

LETTERS TO THE EDITOR

Open Access



Could daily changes in respiratory microbiota help predicting early *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia?

Sylvain Meyer¹, Nadia Gaïa², Vladimir Lazarevic², Jacques Schrenzel², Bruno François^{1,3,4*}  and Olivier Barraud^{1,2,4} on behalf of the SCORPIUS study group

*Correspondence:
b.francois@unilim.fr

¹ Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France

² Genomic Research Laboratory and Infectious Diseases Division, Geneva University Hospitals and University of Geneva, Geneva, Switzerland

³ CHU Limoges, Réanimation Polyvalente CHU Dupuytren, 2 Ave. Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France

⁴ CHU Limoges, INSERM, CIC1435 Limoges, France

Keywords: Ventilator-associated pneumonia, Respiratory microbiota, *Staphylococcus aureus*, Anaerobes

Dear Editor,

Ventilator-associated pneumonia (VAP) remains the most frequent healthcare-associated infection in Intensive Care Units (ICUs) with a prevalence of 9–27% [1]. Factors driving the progression from colonization to infection during VAP development are not fully elucidated. Metataxonomics [16S rRNA gene next-generation sequencing (NGS)] has emerged as an efficient tool to investigate pulmonary microbiota. When compared to conventional aerobic culture, metataxonomics provides additional information which allows assessing exhaustively the local bacterial community, including anaerobes, that are fastidious and yet-unculturable organisms. This culture-free approach provides new insights into respiratory microbiota dynamics and potential mechanisms of VAP development [2–5]. No study has yet sequentially explored respiratory microbiota dysbiosis on a daily basis and its potential relationship with the development of early VAP. We hypothesized post hoc that patients who develop *Staphylococcus aureus* VAP might exhibit modified respiratory microbiota during mechanical ventilation (MV) when compared to patients without VAP. In this pilot study (IRB #464-2021-120), we analyzed the daily changes of respiratory microbiota in a homogeneous population of patients under MV without prior exposure to antibiotics or antibiotic treatment during the study period until potential VAP diagnosis.

Eligible patients were adults admitted to the ICU for an acute brain injury requiring at least 48 h of MV, with no chronic or acute respiratory disease, and who did not receive antibiotics in the previous 15 days. If antibiotics were administered during the study period, patients were secondarily excluded. Endotracheal aspirates (ETA) were collected every morning from the day of tracheal intubation (day 1) to either the day of VAP suspicion, the day of extubation or until day 7 whichever occurred first. All VAP events were blindly adjudicated by two independent ICU physicians.



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Twelve patients were included (Additional file 1: Table S1) with a total of 62 ETA samples. Four patients developed *S. aureus* VAP (3 early- and 1 late-onset) (Additional file 1: Table S2) and 8, including 4 colonized with *S. aureus*, were considered non-VAP controls. Clinical characteristics at baseline were comparable between groups (Additional file 1: Table S1). Microbiota analysis (Additional file 1: Table S3) consistently confirmed the presence of bacterial species identified by culture even if their relative abundance was not related to CFU counts (Additional file 1: Figure S1). Incidence of *S. aureus* was high because of study population and local epidemiology. On day 1, the differences in microbiota between patients who will develop VAP and controls were not statistically significant, and microbiota evolved over time in both groups (Fig. 1, Additional file 1: Figure S2). The alpha-diversity shifts during follow-up showed no common trends in VAP or non-VAP patients. However, we were able to identify specific bacterial taxa with relative abundances significantly higher in early *S. aureus* VAP than in non-VAP patients (e.g., *Prevotella* species, *Neisseria flavescens*) (Additional file 1: Table S4). These taxa possibly provide a metabolic niche for *S. aureus*, as suggested in the context of a different infection [6]. They could constitute potential PCR targets for future clinical ICU practice. Canonical analysis of principal coordinates showed microbial profiles that could also potentially be used as predictors of early *S. aureus* VAP (Additional file 1: Figure S3). This underlines the potential benefit of microbiota analysis over other diagnostic tools, such as targeted PCRs, to predict *S. aureus* VAP.

This proof-of-concept study allowed to identify respiratory microbiota changes during the first days of ICU admission that preceded the development of *S. aureus* VAP. Whether microbiota may be predictive of subsequent development of VAP remains to be tested in other homogeneous ICU populations to confirm these preliminary results.

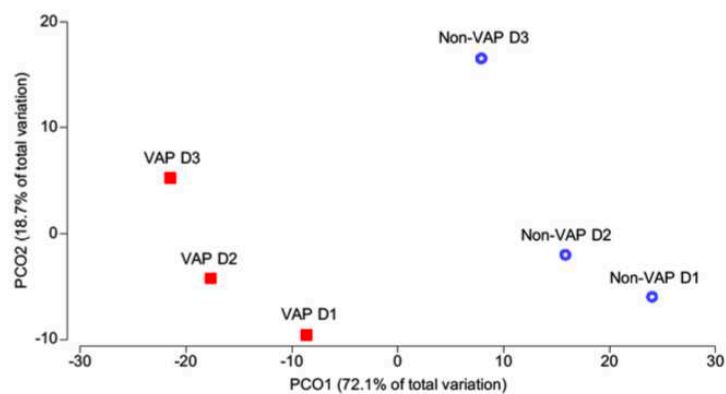


Fig. 1 Microbiota differences of early *S. aureus* VAP vs non-VAP patients during the first 3 days of intubation assessed by Principal coordinates analysis (PCoA). PCoA was based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix of square-root transformed relative abundances of bacterial species. Bacterial communities defined by the sampling day and VAP occurrence were grouped to centroids. For this analysis of centroids, patient 1 was considered “non-VAP” as the VAP occurred on day 7 (late VAP). Difference was not significant on day 1 (PERMANOVA $p > 0.05$). D = day post-intubation

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40635-023-00521-7>.

Additional file 1. Table S1. Patients characteristics at ICU admission. **Table S2.** Radiologic and biologic characteristics of VAP patients the two days before VAP diagnosis. **Table S3.** Reagent contaminant species. **Table S4.** Differences in microbiota composition between early *S. aureus* VAP and non-VAP groups at different taxonomic levels at Day 1 and Day 2. **Figure S1.** Daily evolution of main bacterial genera of the respiratory microbiota for each patient enrolled in the study. **Figure S2.** Microbiota similarities/differences assessed by Principal coordinates analysis. **Figure S3.** Receiver operating characteristic curve for associations between an early *S. aureus* VAP and bacterial communities at Day 1 and Day 2 of intubation. Supplementary Methods and Results.

Acknowledgements

This work was presented in part, at the 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECC-MID), Paris, France (2020). We are grateful to Valentin Tilloy for his bioinformatics assistance.

Author contributions

SM carried out the 16S rRNA gene NGS, participated in the bioinformatics analysis and drafted the manuscript. NG carried out the bioinformatics analysis and reviewed the manuscript. VL participated in the results analysis and corrected the manuscript. JS participated in the results analysis and reviewed the manuscript. BF recruited the patients and corrected the manuscript. OB designed and coordinated the study, participated in the bioinformatics analysis, and corrected the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by Grants from Région Nouvelle-Aquitaine and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm).

Availability of data and materials

The data sets generated for this study can be found in the Sequence Read Archive (SRA), PRJNA882222.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This project has been accepted by the Ethics Committee of Limoges University Hospital, Limoges, France (No 464-2021-120).

Competing interests

All authors: nothing to declare.

Received: 26 January 2023 Accepted: 15 May 2023

Published online: 23 June 2023

References

1. Vincent J-L, Sakr Y, Singer M et al (2020) Prevalence and outcomes of infection among patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* 323:1478–1487. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2717>
2. Fenn D, Abdel-Aziz MI, van Oort PM et al (2022) Composition and diversity analysis of the lung microbiome in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 26:203. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04068-z>
3. Woo S, Park S-Y, Kim Y et al (2020) The dynamics of respiratory microbiota during mechanical ventilation in patients with pneumonia. *J Clin Med* 9:E638. <https://doi.org/10.3390/jcm9030638>
4. Emonet S, Lazarevic V, Leemann Refondini C et al (2019) Identification of respiratory microbiota markers in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 45:1082–1092. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05660-8>
5. Dickson RP, Schultz MJ, van der Poll T et al (2020) Lung microbiota predict clinical outcomes in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 201:555–563. <https://doi.org/10.1164/rccm.201907-1487OC>
6. Lucas SK, Villarreal AR, Ahmad MM et al (2021) Anaerobic microbiota derived from the upper airways impact *Staphylococcus aureus* physiology. *Infect Immun* 89:e0015321. <https://doi.org/10.1128/IAI.00153-21>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Could daily changes in respiratory microbiota help predicting early

***Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia?**

Sylvain Meyer, Nadia Gaïa, Vladimir Lazarevic, Jacques Schrenzel, Bruno François
and Olivier Barraud on behalf of the SCORPIUS study group

Supplementary Material

Table S1: Patients characteristics at ICU admission.

	Total (n=12)	Non-VAP (n=8)	VAP (n=4)
Sex M/W	9 (75%) / 3 (25%)	5 (63%) / 3 (37%)	4 (100%) / 0 (0%)
Age	65.5 [63.8 – 70.3]	62.5 [59.8 – 70.3]	68.8 [65.8 – 71.0]
Admission			
Traumatic brain injury	2 (17%)	1 (13%)	1 (25%)
Hemorrhagic stroke	6 (50%)	4 (50%)	2 (50%)
Subarachnoidal hemorrhage	2 (17%)	1 (13%)	1 (25%)
Insulin intoxication	2 (17%)	2 (25%)	0
Prehospital intubation	5 (42%)	3 (38%)	2 (50%)
Charlson index	3.3 [2.0 – 4.3]	3.5 [1.8 – 5.3]	3.0 [2.8 – 3.3]
SAPSII	52 [46 – 59]	52 [47 – 59]	52 [46 – 55]
Glasgow Coma Score	7 [4 – 9]	7 [4 – 9]	8 [7 – 9]

Qualitative variables are expressed in n (%) and quantitative continuous variables in median [Q1 – Q3].

M: men; W: women; VAP: Ventilator-Associated Pneumonia; SAPSII: Simplified Acute Physiology Score II

Table S2: Radiologic and biologic characteristics of VAP patients the two days before VAP diagnosis

	Patient 1			Patient 2			Patient 6			Patient 11		
	Day VAP-2	Day VAP-1	Day VAP	Day VAP-2	Day VAP-1	Day VAP	Day VAP-2	Day VAP-1	Day VAP	Day VAP-2	Day VAP-1	Day VAP
Chest X-ray ⁷	No infiltrate	NA	Localized	NA	Localized	Localized	Diffused	Diffused	Localized	Diffused	NA	Localized
Temperature (°C)	37.6	38.7	38.9	38.4	39.4	39.1	39.1	39.6	38.9	37.6	38.2	38.5
Leukocytes (G/L)	6.63	7.67	8.95	13.32	NA	10.10	8.69	10.57	10.80	15.34	1.73	0.98
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	383	NA	458	226	273	189	523	202	294	208	187	235
CPIS	3	4	5	5	6	8	5	7	5	6	6	8

Day VAP-2: two days before VAP diagnosis; Day VAP-1: one day before VAP diagnosis

CPIS: Clinical Pulmonary Infection Score. NA: data not available

Table S3. Reagent contaminant species. Species whose read counts in control samples were higher than those of 62 ETA samples were considered contaminants.

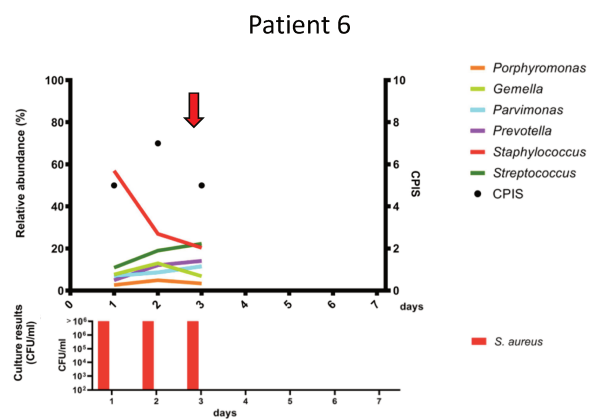
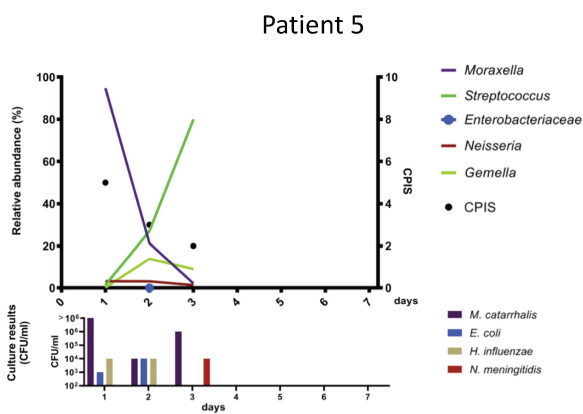
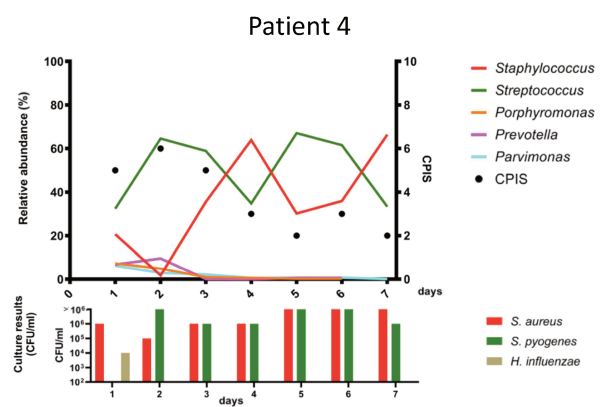
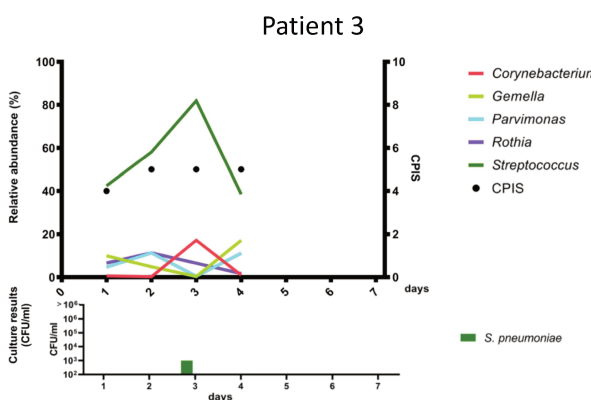
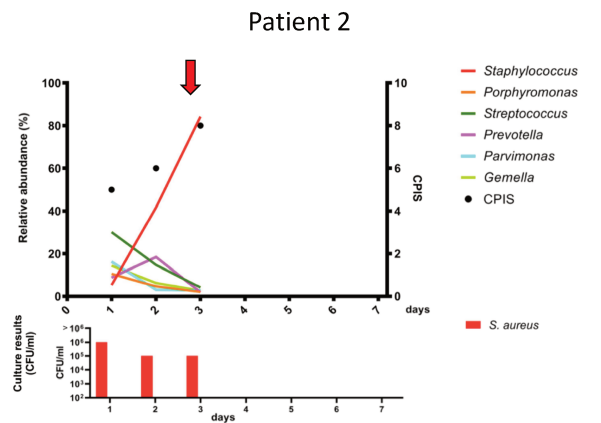
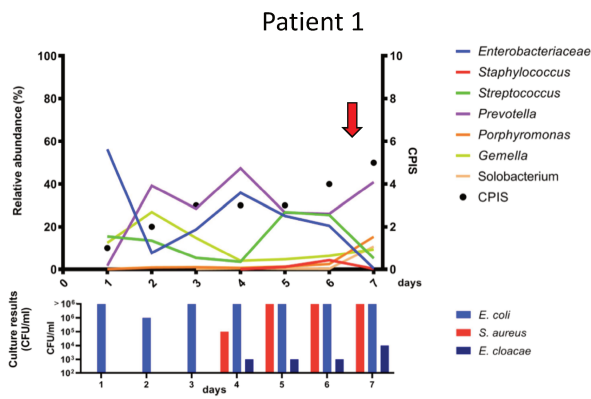
Species	Average read counts in negative controls *	Average read counts in ETA samples *	Putative contaminant
<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	3.8	0	Yes
<i>Bradyrhizobiaceae_unclassified</i>	10	0	Yes
<i>Cupriavidus_unclassified</i>	6.2	0	Yes
<i>Ralstonia insidiosa</i>	14	0	Yes
<i>Ralstonia pickettii</i>	1.0	0	Yes
<i>Pelomonas puraquae</i>	22	0	Yes
<i>Marmoricola_unclassified</i>	1.2	0	Yes
<i>Staphylococcus_unclassified</i>	2.5	9816	No
<i>Moraxellaceae_unclassified</i>	0.8	1.4	No
<i>Solobacterium_unclassified</i>	1.0	2178	No
<i>Prevotella_unclassified</i>	1.5	12982	No

* normalized per million of classified reads

Table S4: Differences in microbiota composition between early *S. aureus* VAP and non-VAP groups at different taxonomic levels at Day 1 and Day 2.

Taxonomy	Day 1						Day 2					
	Relative abundance*		Number of samples positive for a given taxon		p-value**	adjusted p-value	Relative abundance*		Number of samples positive for a given taxon		p-value**	adjusted p-value
	VAP	Non-VAP	VAP	Non-VAP			VAP	Non-VAP	VAP	Non-VAP		
Phylum												
Bacteroidetes	17.25	1.76	3	9	0.018	0.073 (NS)	19.65	5.76	3	8	0.064 (NS)	0.255 (NS)
Class												
Bacteroidia	17.24	1.76	3	9	0.018	0.145 (NS)	19.54	5.75	3	8	0.064 (NS)	0.361 (NS)
Order												
Bacteroidales	17.24	1.76	3	9	0.018	0.182 (NS)	19.54	5.75	3	8	0.064 (NS)	0.159 (NS)
Pasteurellales	0.34	0	3	4	0.125 (NS)	0.313 (NS)	0.33	0	3	4	0.013	0.127 (NS)
Family												
Pasteurellaceae	0.34	0	3	4	0.125 (NS)	0.438 (NS)	0.33	0	3	4	0.013	0.266 (NS)
Porphyromonadaceae	2.74	0.09	3	8	0.209 (NS)	0.488 (NS)	4.69	0.82	3	8	0.036	0.267 (NS)
Prevotellaceae	9.07	1.67	3	8	0.018	0.382 (NS)	15.00	3.57	3	8	0.064 (NS)	0.267 (NS)
Genus												
<i>Catonella</i>	0.31	0	3	4	0.013	0.176 (NS)	0.40	0	3	3	0.048	0.308 (NS)
<i>Haemophilus</i>	0.24	0	3	4	0.125 (NS)	0.403 (NS)	0.07	0	3	4	0.035	0.308 (NS)
<i>Howardella</i>	0.03	0	3	2	0.039	0.284 (NS)	0.01	0.02	3	5	0.851 (NS)	0.884 (NS)
<i>Pasteurellaceae_unclassified</i>	0.10	0	3	1	0.016	0.176 (NS)	0.08	0	3	0	0.002	0.047
<i>Prevotella</i>	8.81	1.67	3	8	0.018	0.176 (NS)	13.42	3.00	3	8	0.064 (NS)	0.308 (NS)
Species												
<i>Catonella morbi</i>	0.11	0	3	4	0.013	0.264 (NS)	0.36	0	3	3	0.048	0.532 (NS)
<i>Howardella_unclassified</i>	0.03	0	3	2	0.040	0.352 (NS)	0.01	0.02	3	5	0.851 (NS)	0.926 (NS)
<i>Neisseria flavescens</i>	0.05	0	3	1	0.004	0.216 (NS)	0.22	0	3	0	0.002	0.041
<i>Pasteurellaceae_unclassified</i>	0.10	0	3	1	0.016	0.264 (NS)	0.08	0	3	0	0.002	0.041
<i>Prevotella maculosa</i>	0.35	0	3	3	0.048	0.352 (NS)	0.55	0	3	4	0.055 (NS)	0.532 (NS)
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.68	0.10	3	6	0.041	0.352 (NS)	6.69	0.18	3	6	0.063 (NS)	0.532 (NS)

p-values highlighted in orange are showing a statistically-significant increase in VAP relative to non-VAP patients before correction for multiple testing with Benjamini-Hochberg method. * Median value of the percentage of reads assigned to a given taxon. ** Mann-Whitney-Wilcoxon test. NS, not significant ($p > 0.05$). In this analysis, patient 1 was considered “non-VAP” as the VAP occurred at Day 7 (late VAP). VAP: Ventilator-Associated Pneumonia.



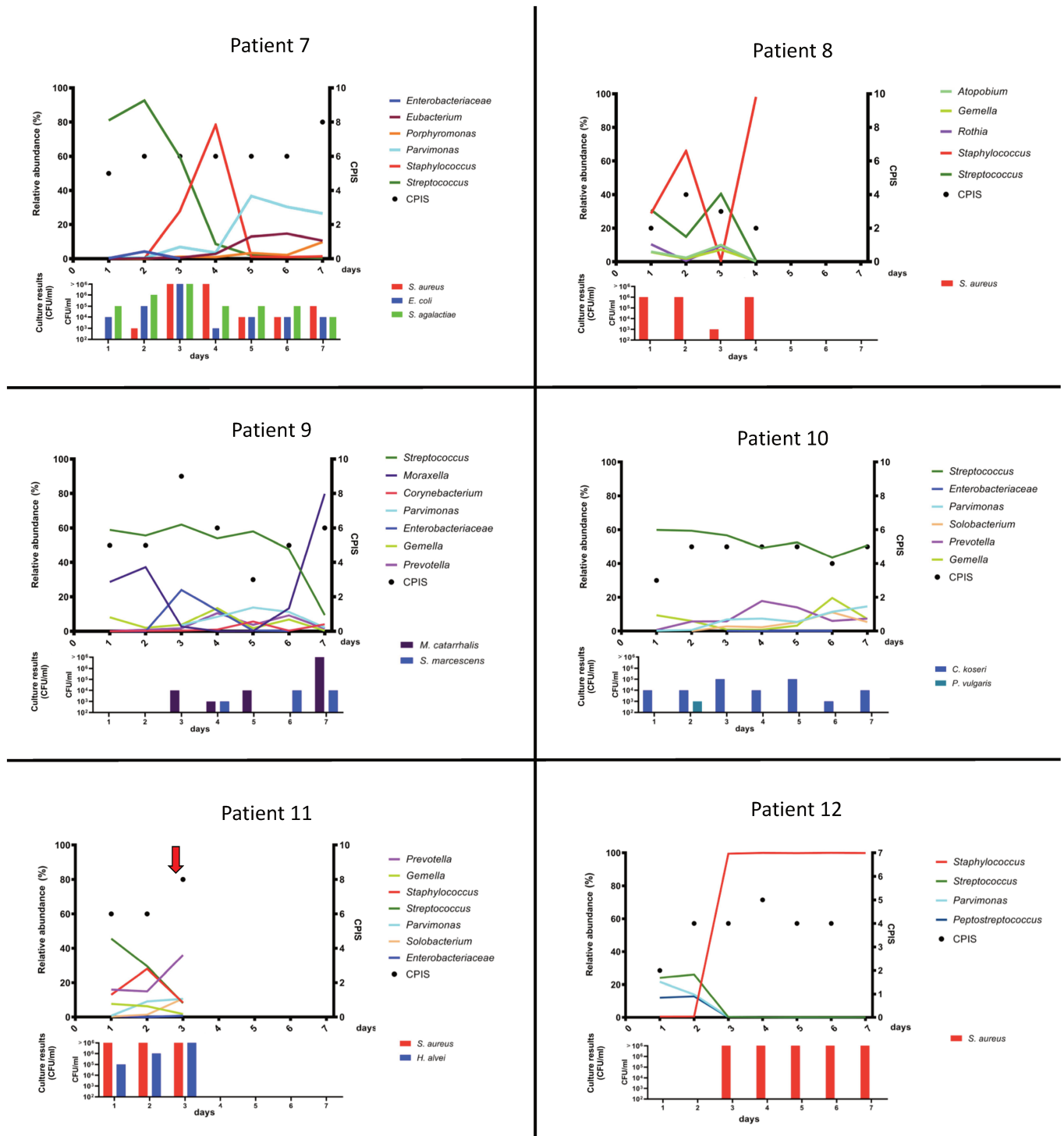


Figure S1: Daily evolution of main bacterial genera of the respiratory microbiota for each patient enrolled in the study.

Top graph in each panel: Relative abundances of main bacterial genera (family for Enterobacteriaceae) during the first seven days of intubation (or less if the patient developed VAP or was extubated) as assessed by metataxonomics. Black dots represent CPIS score. Red arrows indicate the day of VAP diagnosis for patients 1, 2, 6 and 11.

Bottom graph in each panel: Quantitative culture results (expressed in CFU/ml) with potential pathogens identified.

CPIS: Clinical Pulmonary Infection Score; CFU: Colony Forming Unit.

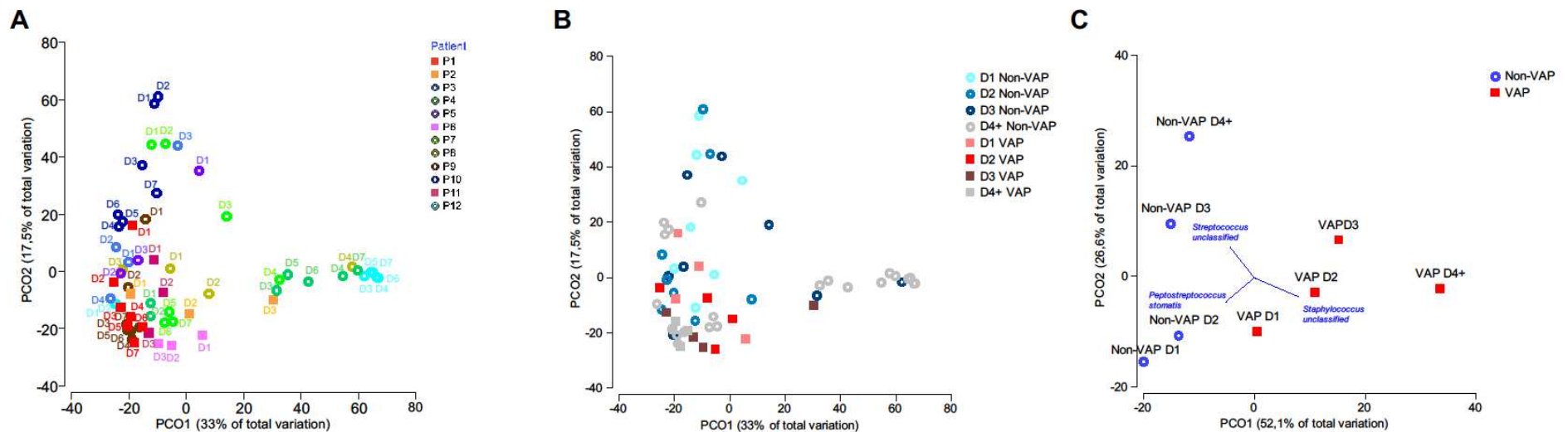


Figure S2: Microbiota similarities/differences assessed by Principal coordinates analysis (PCoA).

A. Daily evolution of the microbiota can be visualized for each patient.

B. Samples differentiated by development of VAP and sampling point (D1–D4). D1–D3 samples were available for each patient whereas samples from following days (D4–D7) were not always available and were combined into “D4+”.

C. Bacterial communities defined by the sampling day and VAP occurrence were grouped to centroids. Difference was not significant at Day 1 (PERMANOVA $p > 0.05$). Vectors of Pearson correlation (> 0.7) between species relative abundance and PCo axes are shown at the PCoA origin.

ETA: endotracheal aspirate; D: day post intubation; VAP: ventilator-associated pneumonia

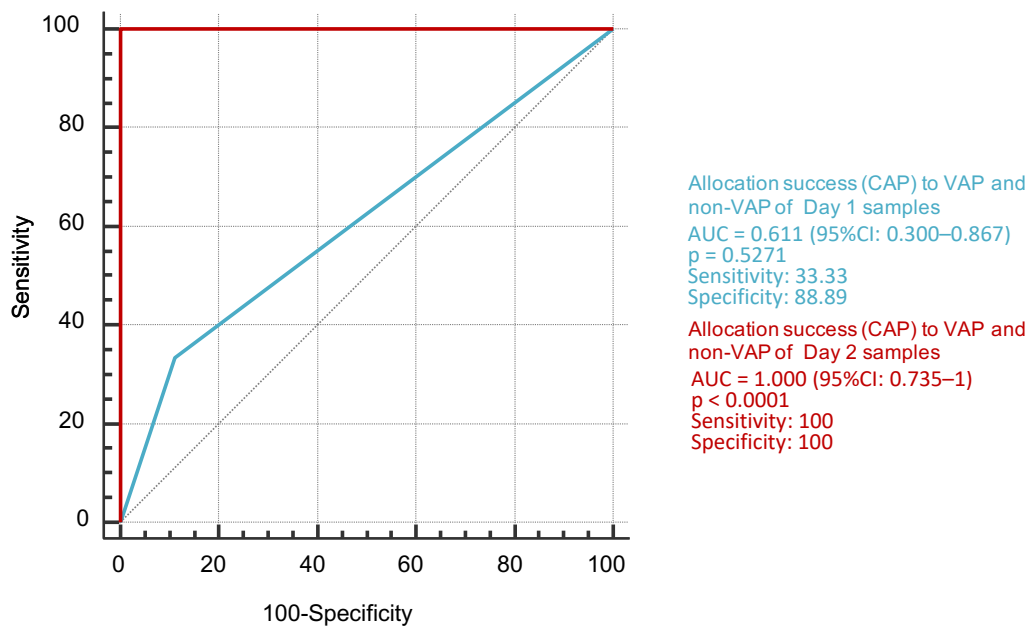


Figure S3: Receiver operating characteristic (ROC) curve for associations between an early *S. aureus* VAP and bacterial communities at Day 1 and Day 2 of intubation.

Sample were allocated to VAP or non-VAP group by the Canonical Analysis of Principal coordinates (CAP) following the cross-validation procedure. The CAP is a constrained ordination method that maximizes separation of pre-defined groups (VAP and non-VAP) in the multivariate space, based on their (bacterial) community profiles. This method calculates the proportion of successful allocations to these two groups and can also be used for future predictions i.e. allocation of new samples, given the resemblance of their (bacterial) communities with existing VAP and non-VAP samples. Patient 1 with VAP-onset at Day 7 (late VAP) was considered “non-VAP”.

At Day 1 after intubation (in blue), respiratory microbiota composition between both groups showed a sensitivity and a specificity of 33.3% and 88.9%, respectively. At Day 2 after intubation (in red), these values reached 100%. Therefore, CAP enabled to discriminate patients developing VAP based on respiratory microbiota composition.

Supplementary Material:

VAP diagnosis

VAP diagnosis was based on Food and Drug Administration guidance for diagnosis and confirmation of VAP criteria from 2010, and was retrospectively adjudicated by two independent ICU physicians after careful analysis of clinical, biological, radiological and microbiological data (Table S2). All patients with VAP had a confirmed localized infiltrate in chest X-ray the day of VAP diagnosis. Pneumonia that occurred 3–5 days after intubation was considered early-onset VAP. Patients with obvious or suspected aspiration were excluded from inclusion based on the medical history and the report of the intubation.

Human DNA depletion and 16S rRNA gene sequencing

Five hundred microliters of raw ETA samples were liquefied with 500 μ L of Digest-EUR® (Eurobio) in a sterile tube. Human DNA was depleted from liquefied ETA using the MoYsis Basic5 Kit (Molzym) as recommended by the manufacturer. Bacterial DNA was extracted with the Bacterial DNA Extraction Kit on the SaMag-12® automatic system (Sacace Biotechnologies). For each depletion/extraction series, a negative control consisting of 500 μ L of sterile water was included and followed the same protocol as ETA samples in order to reveal potential kit contaminants. The 16S rRNA gene was amplified using the Ion 16S™ Metagenomics Kit (Life Technologies) which enables the amplification of seven of the nine variable regions of the 16S rRNA gene. PCR products were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) and then barcoded using the Ion Fragment Plus Core Library Kit on AB Library Builder™ System (Life Technologies). Amplicons were sequenced on the Ion GeneStudio S5™ Platform (Life Technologies) using a 530 chip (400 bp single-end) according to manufacturer's instructions. Twenty ETA samples were sequenced per chip.

Bioinformatics

Raw BAM files were uploaded to the Ion Reporter v5.16 platform (ThermoFisher Scientific) to generate species abundance profiles against the MicroSEQ™ ID 16S rDNA 500 Library v2013.1 database using a confidence threshold > 99%. A minimum threshold of 10 reads per species was defined in Ion Reporter platform. *Ralstonia*, *Bradyrhizobium*, *Cupriavidus*, *Pelomonas* and *Microbacterium* genera were usual contaminants found in negative controls (Table S4) and were excluded from sample analysis. Rarefaction curves were generated for each sample and for each variable region using vegan R package v2.5-6.

Alpha-diversity (Shannon index and species richness) were computed using the PRIMER v7.0.21 (PRIMER-e) software. Beta-diversity (Principal Coordinates Analysis, PCoA), PERMANOVA test and Canonical Analysis of Principal coordinates (CAP) were performed with

PRIMER using Bray-Curtis dissimilarity matrix based on square-root transformed taxa relative abundances.

To assess differences in the relative abundance of bacterial taxa between VAP and non-VAP patients, we used Mann-Whitney-Wilcoxon test. An uncorrected p-value <0.05 was considered statistically significant.

16S rRNA sequencing results

An average number of 322 418 reads per sample was obtained after filtering and taxonomic assignment with regions V3, V8, V6-V7 and V4 being the most frequently sequenced. Rarefaction curves showed that species diversity was fully captured for all sequenced regions. The highest number of species was identified in the V3 region (n=213), and this region provided the highest average number of species per ETA sample. Therefore, we decided to conduct further analyses using the V3 region sequence data. Partial sequencing of the 16S rRNA gene limits species identification. Nonetheless, the choice of the V3 region allowed identification at the species level for 122 (57.3%) out of the 213 taxa (others were labeled as “genus_unclassified” or “family_unclassified”).

Second travail : Évaluation cinétique exhaustive des outils cliniques et microbiologiques pour améliorer le diagnostic de la PAVM précoce : étude INSPIRE

L'objectif de ce deuxième travail était de décrire l'évolution microbiologique globale dans une cohorte de patients intubés-ventilés et de la comparer à l'évolution des critères cliniques actuellement utilisés dans le diagnostic de la PAVM du jour de l'intubation jusqu'à J7. Des prélèvements pluriquotidiens d'aspirats endotrachéaux ont été réalisés.

1. Protocole de l'étude

De façon très similaire au protocole précédent, nous avons collectés des AETs dans une cohorte de patients intubés-ventilés admis sur critères neurologiques et n'ayant pas reçu d'antibiotiques dans les 2 semaines précédant l'admission et n'ayant pas d'antécédents de pathologies chroniques (Figure 28). Les patients extubés précocement ou décédés (< 7 jours) ont été exclus. Afin de mieux observer les variations du microbiote, l'intégralité des AETs a été collectée par les infirmières du service de Réanimation du CHU de Limoges 24h/24 dès que le patient était encombré et présentait des sécrétions trachéales, et ce jusqu'au septième jour post-intubation afin d'observer la survenue de PAVM précoces.

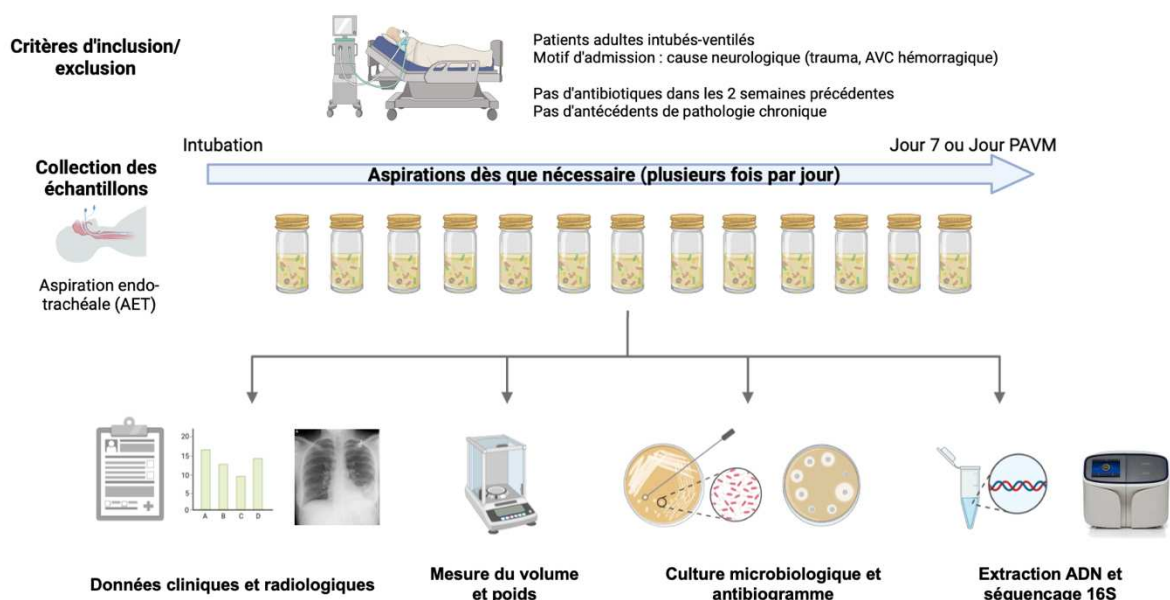


Figure 28 : Présentation du protocole global de l'étude INSPIRE du recueil à l'analyse des échantillons.

L'intégralité des données d'évolution clinique (fièvre, ratio PaO₂/FiO₂, aspect des sécrétions, leucocytose) et radiologique ont été collectées durant les 7 premiers jours, qu'importe la survenue de PAVM. Le CPIS a été calculé quotidiennement afin d'évaluer sa performance. Si une des variables n'était pas disponible, la donnée la plus proche a été intégrée dans le calcul (exemple : absence de radiographie quotidienne, donc prise en compte des données de la dernière radiographie disponible). L'évaluation de l'aspect des sécrétions trachéales (salivaire, muco-purulent, purulent, hémorragique) a été réalisée par deux infirmières de Réanimation et, si discordante, évaluée par une troisième infirmière.

Les AET ont été congelés à -80°C rapidement (<1h) puis envoyés au laboratoire pour détermination du poids, du volume et de la culture microbiologique. Cette dernière a été effectuée sur l'intégralité des échantillons collectés afin d'observer l'évolution microbiologique et a été conduite comme décrit précédemment dans l'étude SCORPIUS.

2. Principaux résultats

Quarante-huit patients ont été inclus dans cette étude pour un total de 1544 échantillons respiratoires collectés. Dix patients ont développé une PAVM à différents jours (de J2 à J7) et principalement documentée à *H. influenzae* (n = 8), *S. aureus* (n = 5) et/ou *S. pneumoniae* (n = 5). Parmi les patients développant une PAVM, le cut-off ou index bactériologique de 10⁵ UFC/ml a été atteint pour neuf patients mais également au moins 1 fois chez 32 patients non-PAVM.

Un aspect « purulent » des sécrétions trachéales a été retrouvé dans 81% des AET, peu importe le statut infectieux des patients, ce qui montre la faible valeur prédictive de ce paramètre, présent dans le calcul du CPIS. Une valeur de CPIS > 6 a été atteinte chez 8 patients PAVM mais également chez 14 patients non PAVM, au moins 1 jour au cours de la durée de VM. Au total, nous avons montré à travers cette étude que les critères de diagnostic clinique de la PAVM manquaient cruellement de spécificité (16% pour l'IB et 63% pour le CPIS) pour une sensibilité correcte (90% pour l'IB, 80% pour le CPIS).

En revanche, nous avons observé une augmentation naturelle du volume des sécrétions trachéales au cours de la VM. Toutefois, cette augmentation était beaucoup plus prononcée chez les patients développant une PAVM, un à deux jours avant sa survenue. Le calcul de la différence journalière de volume de sécrétion trachéale a permis de retrouver une sensibilité de 67% et une spécificité de 93% dans le diagnostic de la PAVM pour un cut-off de 20ml de sécrétion journalière.

Par ailleurs, nous avons montré que la charge bactérienne du *S. aureus* présente dans les voies respiratoires avait tendance à augmenter au cours de la VM chez tous les patients colonisés, sans différences significatives entre nos groupes de patients. Cela n'a pas été retrouvé pour d'autres bactéries comme *H. influenzae* ou *S. pneumoniae*.

3. Valorisation

Les travaux sur l'évolution des caractéristiques cliniques et microbiologiques ont fait l'objet de **deux communications orales courtes** (FC-131 et FC-243) **au congrès de la SRLF** (Société de Réanimation de Langue Française) **en 2022** :

- *Endotracheal bacterial kinetic changes from intubation to onset of pneumonia during mechanical ventilation: the core of VAP pathophysiology?*
- *Volume variation of endotracheal aspirates to predict onset of ventilator-associated pneumonia. Better than CPIS?*

Ces résultats ont également fait l'objet d'une **publication scientifique dans le journal *Chest Critical Care***, pour laquelle je suis co-premier auteur. Cet article accepté pour publication en Avril 2024 est présenté ci-après.

Evolution of tracheobronchial colonization following tracheal intubation in neuro-injured ventilated patients: the INSPIRE study

Short title: Colonization evolution during invasive ventilation.

Estelle DANCHE, MD^{1,*}, Sylvain MEYER, PharmD^{2,3,*}, Elie GUICHARD, MSc⁴, Ana Catalina HERNANDEZ PADILLA, MD, PhD^{1,3,5}, Anne-Laure FEDOU, MD¹, Philippe VIGNON, MD, PhD^{1,3,5}, Olivier BARRAUD, PharmD, PhD^{2,3,5}, Bruno FRANCOIS, MD^{1,3,5}

¹Medical-surgical Intensive Care Unit, Dupuytren University Hospital, Limoges, France

²Bacteriology – Virology- Hygiene department, Dupuytren University Hospital, Limoges, France

³Inserm UMR 1092, Limoges University, Limoges, France

⁴Inserm CIC 1415, Tours University Hospital, France

⁵Inserm CIC 1435, Dupuytren University Hospital, Limoges, France

*authors contributed equally to the work

Correspondance to:

Bruno FRANCOIS

Réanimation Polyvalente

CHU Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex

Email: b.francois@unilim.fr

Acknowledgments

Guarantor statement: BF and ED accept full responsibility for the work and/or the conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish

Authors' contribution: ED, SM, ACHP, OB and BF designed and supervised the study. ALF and TD adjudicated the patients. SM and OB analyzed the samples. EG performed the statistical analyses. ED, ACHP, BF and PV drafted the manuscript. SM, EG, ALF, and OB

critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Financial/ Non-financial disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Role of the sponsor: This study was sponsored by Limoges University Hospital, which had no part in study design, writing of the manuscript, or the decision to submit the manuscript for publication.

Other contributions: The authors would like to thank Sarah Demai for the editorial assistance and review of the manuscript and Carole Grélaud and Delphine Chainier for technical assistance for ETA culture

1 Text: 2959 / 3200 words

2 Abstract: 221 / 300 words

3

4 Evolution of tracheobronchial colonization following tracheal intubation in neuro-injured

5 ventilated patients: the INSPIRE study

6 Short title: Colonization evolution during invasive ventilation.

7

8 Keywords: Bacterial load, Clinical Pulmonary Infection Score, Endotracheal aspirate,

9 Ventilator-Associated Pneumonia, Tracheobronchial colonization

10

11 Abbreviation List:

12 APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation

13 CPIS: Clinical Pulmonary Infection Score

14 ETA: Endotracheal Aspirate

15 MV: Mechanical Ventilation

16 PaO₂/ FiO₂: Partial pressure of oxygen / Fraction of inspired oxygen

17 VAP: Ventilator-Associated Pneumonia

18

19

20 **Abstract**

21 **Background:** Characteristics and course of endotracheal secretions have scarcely been
22 studied in patients under mechanical ventilation (MV) at risk of developing ventilator-
23 associated pneumonia (VAP).

24 **Research question:** Exhaustive description of endotracheal secretions and determination of
25 their predictive value for the diagnosis of VAP during MV.

26 **Study design and methods:** Single-center prospective study in neuro-injured patients
27 requiring MV for at least 7 days. Patients with pulmonary and infectious diseases were
28 ineligible. All endotracheal aspirates (ETA) collected between tracheal intubation and Day7

1

29 were analyzed. Macroscopic characteristics and microbiology were assessed. CPIS was
30 calculated daily. A blinded adjudication committee validated all VAP events.

31 **Results:** Forty-eight patients and 1544 ETAs were analyzed. Overall, 81% of the ETA were
32 purulent and 50% were thick. Culture results showed high inter- and intra-individual variability.
33 Ten patients (21%) developed an early VAP. Eight patients (80%) with VAP and 14 (37%)
34 without had a CPIS>6. The day before VAP diagnosis, a 20-mL increase in ETA volume
35 detected a VAP with a sensitivity of 67% and a specificity of 93%.

36 **Interpretation:** Our study provides new information on the course of respiratory colonization
37 in mechanically ventilated patients and suggests that ETA color and aspect, and pathogens
38 kinetics cannot predict VAP. Traditional VAP criteria (CPIS and bacterial load) had also a low
39 diagnostic specificity. Contrariwise, an increase in secretion volume should alert for VAP
40 development.

41 Mechanical ventilation (MV) in intensive care unit (ICU) is a routine life-saving
42 intervention. Tracheal intubation and associated sedation impair the physiological mechanisms
43 allowing the evacuation of bronchial secretions, hence contribute to the bacterial colonization
44 of lower airways, which in turn may lead to the development of ventilator-associated
45 pneumonia (VAP) ¹⁻⁴. Accordingly, VAP is a common complication in the ICU since it involves
46 at least 20% of ventilated patients ⁴⁻⁶. Its incidence approximates 22 per 1000 days of
47 intubation, with a potential increase of MV duration, ICU and hospital length of stay, and even
48 increased mortality ⁷⁻¹¹.

49 One of the main mechanisms responsible for the development of VAP are the aspiration
50 of oropharyngeal and gastric secretions, and the stagnation of these secretions above the cuff
51 of the tracheal probe ^{2,4,12}. Maybe more importantly, VAP pathophysiology depends also on
52 the lung dysbiosis, the exposure to a virulent microorganism, but also to the immune status of
53 the host ^{13,14}. However, the time to occurrence of VAP can be highly variable between patients
54 and the decisive mechanisms that trigger transition from colonization to infection remain
55 unexplained ^{15,16}. VAP diagnosis is challenging since clinical signs, bacteriological and
56 radiological findings are neither sensitive nor specific. Accordingly, no consensus or gold
57 standard is currently available for the diagnosis of VAP ¹⁷. The productivity and purulence of
58 endotracheal aspirates (ETA) are commonly accepted parameters for VAP diagnosis in
59 international guidelines ^{18,19}. However, the analysis of the abundance of secretions remains
60 qualitative and subjective in patients already suspected of VAP ²⁰⁻²².

61 We sought to describe exhaustively the physical (volume, colorimetric and viscosity
62 properties) and microbiological characteristics of all ETA during MV from tracheal intubation to
63 Day 7 and to analyze their variations whether patients developed an early VAP or not, to better
64 understand colonization and VAP pathophysiology. In a second step, we assessed these
65 variations according to the development of VAP, compared to daily CPIS variations.

66

67 **Study design and methods**

68 This single-center prospective observational study was carried out in the medical-
69 surgical ICU of a French Teaching Hospital, from January 2020 to March 2021. Non-opposition
70 of the patients and /or their relatives was collected, after oral and written information. The study
71 was approved by the local Ethics committee (#355-2020-11).

72

73 *Patients*

74 To enroll a homogeneous cohort of patients with normal lungs, we exclusively included
75 adult patients (≥ 18 years) with neurological impairment requiring MV for at least 7 days.
76 Additional inclusion criteria were an orotracheal intubation for less than 6 hours at enrollment
77 time without any tracheal suctioning prior to ICU admission. Patients with chronic lung
78 diseases, confirmed or suspected ongoing infectious diseases including pneumonia, or who
79 received antibiotic treatment within 15 days prior to admission were excluded. Use of a single
80 injection of antibiotic prophylaxis in case of surgery was accepted, when applicable.

81 Demographic data, past medical history, vital signs, Acute Physiology and Chronic
82 Health Evaluation (APACHE II) score, Charlson comorbidity index, risk factors of VAP, duration
83 of MV and of ICU stay were also recorded^{23,24}.

84

85 *Endotracheal aspirate sampling*

86 Every single suctioning / ETA performed during the first 7 days of MV as part of routine
87 tracheal suctioning was collected and analyzed. Tracheal suctioning was performed only when
88 required (accumulated bronchial secretions, cough, increased peak airway pressure, oxygen
89 desaturation...) by trained nurses of the ICU, following a standardized and written procedure
90 already in place in the ICU prior to the study and under strict aseptic conditions with sterile
91 tubes. The suction was realized while removing the tube. The same technique was used for
92 every suction without any use of saline. If no secretion could be collected, the nurse registered
93 the volume as 0 ml. Colorimetric (clear, muco-purulent, purulent, bloody) and viscosity (fluid,
94 viscous, thick) were systematically assessed by two nurses using a standardized color scale
95 and graduation on the sterile container as usually performed at bedside. In case of

4

96 discrepancy, a third nurse analyzed the sample. All samples were rapidly transferred to the
97 microbiological laboratory for volume measurements with a calibrated balance, before storage
98 at -80°C. To better assess daily evolution of ETA secretions, daily volume variations were
99 calculated.

100

101 *Microbiological analysis*

102 Microbiological culture of all samples was performed according to ESCMID guidelines
103 ²⁵. Briefly, ETAs were liquefied using equal amount of Digest-EUR (Eurobio Scientific),
104 aliquoted, and plated. Microbiological identification was performed by MALDI-TOF mass
105 spectrometry on Vitek[®] MS (bioMérieux). *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*,
106 *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*,
107 Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were classified as
108 “presumptive pathogens” ^{26–28}. Total oral flora and presumptive pathogens were semi-
109 quantified as routinely performed for respiratory samples. To evaluate the importance of
110 bacterial load, we analyzed the evolution of oral flora and putative pathogens in the VAP and
111 VAP-free groups.

112 To counteract the time heterogeneity in VAP diagnosis and the effect of antibiotics use
113 on CFU/ml count after VAP diagnosis, we evaluated CFU/ml kinetics aligning individual patient
114 kinetic follow up using day of VAP as ending point.

115

116 *VAP diagnosis*

117 To standardize VAP diagnosis, two independent senior critical care physicians reviewed
118 all patients' medical charts. VAP diagnosis was determined by an adjudication committee
119 according to pre-established definitions ⁶. A radiological criterion (presence or worsening a
120 radiological infiltrate), associated with at least two of the clinical features (abnormal body
121 temperature, abnormal white blood cells, purulent endotracheal secretions, decline in
122 oxygenation and altered respiratory mechanics) were required. Patients who did not meet
123 those criteria were registered as VAP-free patients.

124 CPIS was calculated daily during the first 7 days of MV, using the usual following
125 parameters: body temperature, leukocytes count, PaO₂/FiO₂ ratio, appearance and number
126 of endotracheal secretions, chest X-ray and bacteriological culture. Indications for biological
127 and radiological exams were left to the discretion of the attending clinician. In case of absence
128 of data, the one entered the day before was used for calculation.

129

130 *Statistical analysis*

131 Descriptive statistics were used to characterize baseline, clinical and microbiological
132 variables among the total population and to compare the subgroups of VAP patients and VAP-
133 free patients. Categorical variables were reported as number and proportions, and continuous
134 variables as mean and standard deviation or median and interquartile interval.

135 The kinetics of daily volumes of ETAs were presented graphically with individual
136 trajectories for patients who had VAP, and with 3 lines representing at each time-point the
137 mean value with the standard deviations for the group of patients without VAP. We decided
138 post-hoc to investigate the predictive value of the increase in volume of tracheal secretions
139 from one day to the following. For VAP patients, day of VAP (D_{VAP}) was chosen as endpoint to
140 standardize differences in VAP occurrence time. Receiver operating characteristic (ROC)
141 curve of the secretion volume delta was constructed for the discrimination of VAP.

142 The temporal variations of the CPIS were analyzed similarly. The analyses were carried
143 out with SAS v9.4, R v4.1.2 and GraphPad Prism 6.

144

145 **Results**

146 During the study period, 48 patients were enrolled out of 74 brain-injured patients
147 receiving MV (Figure 1). The study population was mostly men (58%), aged of 58 ± 15 years,
148 with a body mass index of 26 ± 7 . Patients had few comorbidities as evidenced by a mean
149 Charlson Index of 2.8 ± 1.9 . Sixteen patients (33%) were admitted because of trauma and 29
150 patients (60%) underwent neurosurgery. The APACHE II score was 14 ± 5 (eTable 1). No
151 competing events were reported during the seven days of follow-up.

152 During the study, a total of 1,544 ETAs was collected and analyzed. Overall, a mean
153 number of 32 ± 13 ETAs was obtained per patient over 7 days, with a range of 0 to 20 ETAs per
154 day. A "thick" aspect of tracheal secretions was most frequently described in 771/1,544 ETAs
155 (50%), followed by the "viscous" and "fluid" aspects reported in 437 (28%) and 330 (21%)
156 samples, respectively. The "purulent" aspect was reported in 1,259/1,544 samples (81%). The
157 "muco-purulent" and "clear" aspects were only used for 161 (10%) and 22 (1%) ETAs, mostly
158 for the samples collected first after tracheal intubation. There was no difference of color or
159 aspect of endotracheal secretions according to the development of VAP, or not (Table 1).

160 The most frequent pathogens were *Haemophilus influenzae* (54%), *Staphylococcus*
161 *aureus* (52%), *Streptococcus pneumoniae* (18%), and diverse Enterobacterales (64%). At
162 least one presumptive pathogen was identified in 45 out of 48 patients (94%). Interestingly, 2
163 of those 3 patients without pathogenic germs received a single shot of antibiotic prophylaxis.
164 The global bacterial load of presumptive pathogens increased over time for all patients during
165 the first week of MV. There was no impact of antibiotic prophylaxis on the number of pathogens
166 detected in the ETA samples (2.5 ± 1.0 and 2.9 ± 1.5 with or without antibiotic prophylaxis
167 respectively).

168 At the time of VAP diagnosis eight patients were microbiologically confirmed and
169 pathogens found in the ETA were considered for treatment (eTable 2).

170 There was no significant difference in the course of total oral flora between the VAP and
171 VAP-free groups. Similarly, there was no statistically significant difference in the time evolution
172 of global CFU/ml for *S. aureus*, *H. influenzae* and *S. pneumoniae* between the two groups.
173 Presumptive pathogens identified during the first 7 days of MV were highly variable,
174 irrespective of the infectious status. In VAP patients, the most frequently bacteria were *H.*
175 *influenzae* (80%), *S. aureus* (50%) and *S. pneumoniae* (50%). Among the 10 VAP patients,
176 nine reached the 10^5 CFU/mL cutoff during MV, but also 32 VAP-free patients. Thus,
177 microbiological cutoff has poor specificity values (sensitivity = 90%, specificity = 16%). The
178 pathogens identified in patients who did not develop VAP were mainly *S. aureus* (58%), *H.*
179 *influenzae* (58%), Enterobacterales (65.8%) and *S. pneumoniae* (10.5%). Eight VAP-free

180 patients had a bacterial load increasing from 10^3 to 10^6 CFU/ml during the 7-day follow-up.
181 Although in VAP patients, the increase of bacterial load appeared to be associated with a
182 decrease of the flora quantification, no significant difference in quantity of pathogens or flora
183 was found between groups (eFigure 1).

184 The CPIS fluctuated during the first 7 days of MV with a trend to a continuous increase
185 in ETA volume regardless of infectious status. This was associated with a modification in the
186 aspect of endotracheal secretions in most cases ("purulent" aspect). The CPIS of patients who
187 developed a VAP rose heterogeneously. The CPIS in VAP-free patients initially increased
188 linearly and then stabilized between Day 3 and Day 7 in most patients (eFigure 2). A CPIS
189 score ≥ 6 was present in 8 of the 10 VAP patients (80%) at the time of diagnosis, but also in
190 14 of the 38 patients (37%) without VAP, showing an 80% sensitivity and 63% specificity.

191 ETAs volume tended to increase during the first days of MV in VAP-free patients (Figure
192 2A). Daily volume variations were registered in Table 2. The volume of endotracheal secretions
193 in the VAP-free group tended to increase until Day 2 and then stabilized (mean value of 6.4
194 mL at Day 2) whereas in the VAP group, production of secretions started to increase two days
195 before VAP occurrence (Figure 2B), with an upsurge the day before VAP diagnosis (mean
196 value of 23.5 ml). Based on those data, a ROC curve found an area under the curve of 0.815,
197 with a sensitivity of 67% and a specificity of 93% when a daily volume variation was above 20
198 ml (Figure 3). This result was not influenced when analyzing only microbiologically confirmed
199 VAP (eFigure 3).

200

201 Discussion

202 This prospective study has exhaustively characterized all ETAs collected during the first
203 7 days of MV in 48 neuro injured patients with a fairly important number of 1,544 ETAs
204 analyzed. No difference in ETAs color or aspects was notably found between the VAP and
205 VAP-free groups, neither in the overall bacterial pathogens' kinetics, which are both part of
206 CPIS calculation. Interestingly, we found, in a post-hoc analysis, that the delta of ETA volume
207 was higher before VAP occurrence, making it an interesting parameter to suspect VAP.

8

208 Twenty percent of patients developed VAP in the study, which is lower than previously
209 reported for neuro-injured patients, in whom the incidence can go up to 60%^{26,28,29}. This
210 difference can be explained mainly by the use of different diagnostic criteria for VAP (ATS
211 Guidelines, French guidelines)^{6,27,30}, and by a less severe population in our study with fewer
212 comorbidities, head trauma only, and lower APACHE II score^{15,26,31-33}.

213 Use of physical characteristics of secretions and CPIS to diagnose VAP have been a
214 matter of debate^{20,22,34-37}. CPIS is a diagnostic tool, implemented in 1991, that fluctuates over
215 time, regardless of the infectious status of the patients, and which parameters are often very
216 subjective³⁸. Many studies analyzed the use of CPIS for other indications such as treatment
217 follow-up, unnecessary antibiotic discontinuation and prognosis^{18,32,38-42}. The majority of
218 studies and recommendations now seem to advocate the use of CPIS in the clinical trials and
219 studies. During MV, an overall increase of CPIS was observed both in VAP and VAP-free
220 patients. This can be explained by a rapid change from “clear” to “purulent” in ETAs physical
221 characteristics and by a rapid bacterial colonization of the lower respiratory tract. Thus, we
222 confirmed the lack of association between the ETAs aspect and the occurrence of an infectious
223 event.

224 Bacterial culture performed on 1,554 ETA samples revealed that most ETAs were
225 polymicrobial, as previously described^{22,34-37,43}. The pathogens most frequently documented
226 originated from the oro-pharynx (*S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*). These results are
227 consistent with several studies carried out in neuro-injured patients, especially with the high
228 risk of *S. aureus* infection when colonized at admission^{26,28,44,45}. Nevertheless, as previously
229 observed^{46,47}, *S. aureus* presence was not correlated to VAP as 80% of the patients colonized
230 with *S. aureus* in the ETAs, sometimes with high bacterial load ($\geq 10^6$ UFC/ml), did not develop
231 VAP. No difference in bacterial load or number of pathogens was found between the two
232 groups of patients. The commonly admitted cut-off value of 10^5 UFC/ml used in the ETAs to
233 predict VAP should therefore be questioned³¹. This high variability of bacterial population and
234 bacterial load during ventilation adds to the complexity of VAP pathogenesis and clinical
235 diagnosis¹⁶.

236 Finally, patients developing VAP tended to produce more endotracheal secretions two
237 days before the diagnosis of VAP. We describe, for the first time, that an increase of 20mL in
238 the volume of secretions over what was produced the day before has a sensitivity and
239 specificity of 67% and 93% for VAP diagnosis, respectively. An increase in secretion volume
240 is expected in the course of VAP as a consequence to the converging effect of the lung innate
241 immune response, and the bacterial growth^{22,48}. During acute infection, the increased local
242 inflammatory response in the lung causes an increase in mucus production by the goblet cells,
243 and an increase in the endothelial permeability at the alveolar level to facilitate the infiltration
244 of neutrophils^{4,48}. On the other side, infection, often defined as the local bacterial outgrowth,
245 could contribute to the total volume of secretions⁴⁸. Together the increased mucus production,
246 the increased vascular permeability and number of leukocytes, and the increased number of
247 bacteria, viable or not, are in line with our findings.

248 Studies usually select patients free of respiratory colonization at admission²⁰. Here, we
249 included colonized patients who are therefore more likely to produce endobronchial secretions,
250 which limits the differences between our groups. It should also be noted that aspirations in our
251 study were performed according to the patients' needs and not according to a predefined
252 rhythmicity. A fixed aspiration schedule could lead on the one extreme to less endotracheal
253 aspirate volume or a greater volume of secretions with a related irritation of the bronchial
254 mucosa and more aspirations on the other²¹. The occurrence of VAP was however similar
255 regardless of the suction rate. These results could also question the usual rhythmicity of ETAs
256 performed in the ICU.

257 The strength of this study lies in its prospective design, where a high homogeneity of our
258 patients, with selective inclusion criteria, were included, thus decreasing confounding factors
259 affecting clinical, biological and CPIS variables interpretation. Moreover, the collection and
260 study of physical and microbiological characteristics of each ETA collected during the first 7
261 days of MV for a total of 1,544 samples were challenging. This is the first study to analyze
262 exhaustively such an ETA amount during MV. We were also able to precisely measure ETA
263 volumes, to avoid inter-observer variability present in most studies.

264 Nevertheless, there are intrinsic limitations to this study. The small number of VAP
265 patients (10 patients in total), heterogeneity of VAP occurrence day, single-center design and
266 subjectivity of the colorimetric analysis of secretions may limit the impact of the results reported
267 in this study. Part of these results, including the ETA volume measurements, were determined
268 in a post hoc analysis and need confirmation in a prospective study. Finally, we only
269 investigated the ETA secretions in a neuroinjured antibiotic-free population, which represents
270 a small portion of the average ICU patient population. These results cannot be generalized to
271 other critically ill patients. We also excluded patients with premature death after intubation, and
272 therefore we do not know how ETAs are evolving in this population. Further analysis conducted
273 in a multicenter study on different ICU populations should evaluate those preliminary results.

274

275 **Conclusion**

276 This prospective study highlights a trend towards a greater increase in the volume of
277 ETAs in patients with VAP. The determination of a precise threshold for variation in the volume
278 of ETAs could have an impact on the prediction and diagnosis of VAP. On the microbiological
279 side, high intra and inter-individual variability of bacterial evolution exists during MV, making it
280 difficult to differentiate colonization from VAP. The definition of bacterial load threshold remains
281 questionable as well as the performance of the CPIS due to its continuous increase during MV,
282 regardless of the infectious status of patients.

283

284 References

- 285 1. Jeanneret-Grosjean A, King M, Michoud MC, Liote H, Amyot R. Sampling technique and
286 rheology of human tracheobronchial mucus. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(3):707–710.
- 287 2. Niederman MS, Craven DE, Fein AM, Schultz DE. Pneumonia in the critically ill
288 hospitalized patient. *Chest* 1990;97(1):170–181.
- 289 3. Konrad F, Schiener R, Marx T, Georgieff M. Ultrastructure and mucociliary transport of
290 bronchial respiratory epithelium in intubated patients. *Intensive Care Med*
291 1995;21(6):482–489.
- 292 4. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: Its
293 relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir Care* 2005;50(6):725–
294 739.
- 295 5. Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, et al. Pneumonia. *Nat Rev Dis Primer* 2021;7(1):1–
296 28.
- 297 6. Niederman M, Craven D, Bonten M, Luna C, Torres A. Guidelines for the management
298 of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated
299 pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(4):388–416.
- 300 7. Safdar N, Dezfulian C, Collard HR, Saint S. Clinical and economic consequences of
301 ventilator-associated pneumonia: A systematic review. *Crit Care Med* 2005;33(10):2184–
302 2193.
- 303 8. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated
304 pneumonia in a large US database. *Chest* 2002;122(6):2115–2121.
- 305 9. Warren DK, Shukla SJ, Olsen MA, et al. Outcome and attributable cost of ventilator-
306 associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center.
307 *Crit Care Med* 2003;31(5):1312–1317.
- 308 10. Stone PW, Braccia D, Larson E. Systematic review of economic analyses of health care-
309 associated infections. *Am J Infect Control* 2005;33(9):501–509.
- 310 11. Neal PVO, Munro CL, Grap MJ, Rausch SM. Subglottic Secretion Viscosity and
311 Evacuation Efficiency. *Biol Res Nurs* 2007;8:202–209.

- 312 12. Mahul P, Auboyer C, Jospe R, et al. Prevention of nosocomial pneumonia in intubated
313 patients: respective role of mechanical subglottic secretions drainage and stress ulcer
314 prophylaxis. *Intensive Care Med* 1992;18(1):20–25.
- 315 13. Zakharkina T, Martin-Loeches I, Matamoros S, et al. The dynamics of the pulmonary
316 microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association
317 with occurrence of pneumonia. *Thorax* 2017;72(9):803–810.
- 318 14. Moreau AS, Martin-Loeches I, Pova P, et al. Impact of immunosuppression on
319 incidence, aetiology and outcome of ventilator-associated lower respiratory tract
320 infections. *Eur Respir J* 2018;51(3):1701656.
- 321 15. Latorre FJ De, Pont T, Ferrer A, Rosselló J, Palomar M, Planas M. Pattern of tracheal
322 colonization during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*
323 1995;152(3):1028–1033.
- 324 16. Martin-Loeches I, Dickson R, Torres A, et al. The importance of airway and lung
325 microbiome in the critically ill. *Crit Care* 2020;24(1):537.
- 326 17. Gibot S, Bollaert PE. Non bacteriological diagnosis of ventilator associated pneumonia'.
327 *Reanimation* 2005;14(4):238–244.
- 328 18. Lauzier F, Ruest A, Cook D, et al. The value of pretest probability and modified clinical
329 pulmonary infection score to diagnose ventilator-associated pneumonia. *J Crit Care*
330 2008;23(1):50–57.
- 331 19. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired
332 and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious
333 Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*
334 2016;63(5):e61–e111.
- 335 20. Pelosi P, Barassi A, Severgnini P, et al. Prognostic role of clinical and laboratory criteria
336 to identify early ventilator-associated pneumonia in brain injury. *Chest* 2008;134(1):101–
337 108.

- 338 21. Alberto Lucchini, Zanella A, Bellani G, et al. Tracheal Secretion Management in the
339 Mechanically Ventilated Patient : Comparison of Standard Assessment and an Acoustic
340 Secretion Detector. 2011;596–603.
- 341 22. O'Horo J, Kashyap R, Sevilla Berios R, Herasevich V, Sampathkumar P. Differentiating
342 infectious and noninfectious ventilator-associated complications: a new challenge. *Am J*
343 *Infect Control* 2016;661–6665.
- 344 23. Charles MVP, Kali A, Easow JM, et al. Ventilator-associated pneumonia. *Australas Med*
345 *J* 2014;7(8):334–344.
- 346 24. Ranjan N, Chaudhary U, Chaudhry D, Ranjan KP. Ventilator-associated pneumonia in a
347 tertiary care intensive care unit: Analysis of incidence, risk factors and mortality. *Indian J*
348 *Crit Care Med* 2014;18(4):200–204.
- 349 25. Torres A, Niederman MS, Chastre J, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT
350 guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated
351 pneumonia. *Eur Respir J* 2017;50(3):1700582.
- 352 26. Lepelletier D, Roquilly A, Demeure Dit Latte D, et al. Retrospective analysis of the risk
353 factors and pathogens associated with early-onset ventilator-associated pneumonia in
354 surgical-ICU head-trauma patients. *J Neurosurg Anesthesiol* 2010;22(1):32–37.
- 355 27. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, et al. [Healthcare associated pneumonia in the
356 intensive care unit.] *Anesth Réanimation* 2018;4(5):421–441.
- 357 28. Esnault P, Nguyen C, Bordes J, et al. Early-Onset Ventilator-Associated Pneumonia in
358 Patients with Severe Traumatic Brain Injury: Incidence, Risk Factors, and Consequences
359 in Cerebral Oxygenation and Outcome. *Neurocrit Care* 2017;27(2):187–198.
- 360 29. Zygun DA, Zuege DJ, Boiteau PJE, et al. Ventilator-associated pneumonia in severe
361 traumatic brain injury. *Neurocrit Care* 2006;5(2):108–114.
- 362 30. Torres A, Ewig S, Lode H, Carlet J. Defining, treating and preventing hospital acquired
363 pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med* 2009;35(1):9–29.

- 364 31. Garnacho-Montero J, Gutiérrez-Pizarra A, Lopez-García I, et al. Pneumonia in
365 mechanically ventilated patients: no diagnostic and prognostic value of different
366 quantitative tracheal aspirates thresholds. *Infect Dis* 2018;50(1):44–51.
- 367 32. Gursel G, Demirtas S. Value of APACHE II, SOFA and CPIS scores in predicting
368 prognosis in patients with ventilator-associated pneumonia. *Respiration* 2006;73(4):503–
369 508.
- 370 33. Zhou XY, Ben SQ, Chen HL, Ni SS. A comparison of APACHE II and CPIS scores for the
371 prediction of 30-day mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. *Int J Infect*
372 *Dis* 2015;30:e144–e147.
- 373 34. Charman J, Loper-Vidriero MT, Keal E, Reid L. The physical and chemical properties of
374 bronchial secretion. *Brit J Chest* 1974;68:215–227.
- 375 35. Murray MP, Pentland JL, Turnbull K, MacQuarrie S, Hill AT. Sputum colour: A useful
376 clinical tool in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Eur Respir J* 2008;34(2):361–364.
- 377 36. Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color to nature and
378 outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest* 2000;117(6):1638–
379 1645.
- 380 37. Johnson AL, Hampson DF, Hampson NB. Sputum color: Potential implications for clinical
381 practice. *Respir Care* 2008;53(4):450–454.
- 382 38. Schurink CAM, Nieuwenhoven CA Van, Jacobs JA, et al. Clinical pulmonary infection
383 score for ventilator-associated pneumonia: Accuracy and inter-observer variability.
384 *Intensive Care Med* 2004;30(2):217–224.
- 385 39. Luna CM, Blanzaco D, Niederman MS, et al. Resolution of ventilator-associated
386 pneumonia: Prospective evaluation of the clinical pulmonary infection score as an early
387 clinical predictor of outcome*. *Crit Care Med* 2003;31(3):676-682.
- 388 40. Singh N, Rogers P, Atwood CW, Wagener MM, Yu VL, Diagnosis PMS. Short-course
389 Empiric Antibiotic Therapy for Patients with Pulmonary Infiltrates in the Intensive Care
390 Unit A Proposed Solution for Indiscriminate Antibiotic Prescription. *Am J Respir Crit Care*
391 *Med* 2000;162:505–511.

- 392 41. Bassetti M, Taramasso L, Giacobbe DR, Pelosi P. Management of ventilator-associated
393 pneumonia: Epidemiology, diagnosis and antimicrobial therapy. *Expert Rev Anti Infect*
394 *Ther* 2012;10(5):585–596.
- 395 42. Ahmed Ayman Mahmoud Heikal S, Abd Elazeem S, Yassin S, Ahmed Essawi Saleh D,
396 Hamed Mohammed L. Assessment of Efficiency of Using Clinical Pulmonary Infection
397 Score (CPIS) Among Mechanically Ventilated Cases. *Res J Med Sci* 2019;13(2):20–24.
- 398 43. Kontopidou F, Galani I, Panagea T, et al. International Journal of Antimicrobial Agents
399 Comparison of direct antimicrobial susceptibility testing methods for rapid analysis of
400 bronchial secretion samples in ventilator-associated pneumonia. 2011;38:130–134.
- 401 44. Paling FP, Wolkewitz M, Bode LGM, et al. Staphylococcus aureus colonization at ICU
402 admission as a risk factor for developing S. aureus ICU pneumonia. *Clin Microbiol Infect*
403 2017;23(1):49.e9-49.e14.
- 404 45. Paling FP, Hazard D, Bonten MJM, et al. Association of Staphylococcus aureus
405 Colonization and Pneumonia in the Intensive Care Unit. *JAMA Netw Open* 2020;3(9):1–
406 12.
- 407 46. Meyer S, Gaïa N, Lazarevic V, et al. Could daily changes in respiratory microbiota help
408 predicting early Staphylococcus aureus ventilator-associated pneumonia? *Intensive Care*
409 *Med Exp* 2023;11(1):34.
- 410 47. Ruzin A, Barraud O, Yu L, et al. Performance of the Cepheid Methicillin-Resistant
411 Staphylococcus aureus/S. aureus Skin and Soft Tissue Infection PCR Assay on
412 Respiratory Samples from Mechanically Ventilated Patients for S. aureus Screening
413 during the Phase 2 Double-Blind SAATELLITE Study. *J Clin Microbiol*
414 2022;60(7):e00347-22.
- 415 48. Powell J, Garnett JP, Mather MW, et al. Excess mucin impairs subglottic epithelial host
416 defense in mechanically ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198(3):340–
417 349.
- 418
- 419

420 Table 1: Qualitative description of endotracheal secretions

	Samples from VAP-free patients (n = 1,198)	Samples from VAP patients (n = 346)
Aspect		
Fluid	242 (20)	88 (25)
Viscous	295 (25)	142 (41)
Thick	659 (55)	112 (32)
Fluid and viscous	0 (0)	1 (0)
Fluid and thick	0 (0)	1 (0)
Viscous and thick	2 (0)	2 (1)
Color		
Clear	18 (1.5)	4 (1)
Muco-purulent	120 (10)	41 (12)
Purulent	976 (81)	283 (81)
Bloody	62 (5)	19 (5)
Clear and bloody	1 (0)	0 (0)
Muco-purulent and bloody	2 (0)	0 (0)
Purulent and bloody	23 (2)	3 (1)

421 Data are presented as numbers and percentages in parenthesis. VAP = ventilator-associated

422 pneumonia

423

Table 2: Variations of daily secretion volume in VAP-free and VAP patients

VAP-free patients	(mL)	All samples in the VAP-free group were analyzed	Patients with VAP	(mL)
D1-D0, n = 33,	+4.5 [0.5 ; 8.0]		D _{VAP-6} – D _{VAP-5} , n = 2	+0.5 [0.0 ; 6.5]
D2-D1, n = 35	+6.4 [0.0 ; 12.5]		D _{VAP-5} – D _{VAP-4} , n = 4	+3.7 [0.0 ; 7.2]
D3-D2, n = 38	+2.6 [-0.6 ; 8.4]		D _{VAP-4} – D _{VAP-3} , n = 4	+0.1 [-1.5 ; 2.6]
D4-D3, n = 38	+3.4 [-3.6 ; 9.4]		D _{VAP-3} – D _{VAP-2} , n = 8	+6.0 [1.5 ; 8.5]
D5-D4, n = 38	+2.6 [-6.2 ; 8.0]		D _{VAP-2} – D _{VAP-1} , n = 10	+11.2 [0.0 ; 13.6]
D6-D5, n = 38	-2.4 [-8.4 ; 6.0]		D _{VAP-1} – D _{VAP} , n = 10	+23.5 [8.2 ; 39.1]

depending on the day of sampling whereas samples in the VAP group were aligned on the day of VAP diagnosis where “D_{VAP-1} – D_{VAP}” represents the difference of volume between the day of VAP diagnosis and the day before VAP diagnosis.

Data are presented as median and interquartile; n represents the number of samples available in the VAP and VAP-free groups for each day of the analysis.

VAP = ventilator-associated pneumonia

Figure legends

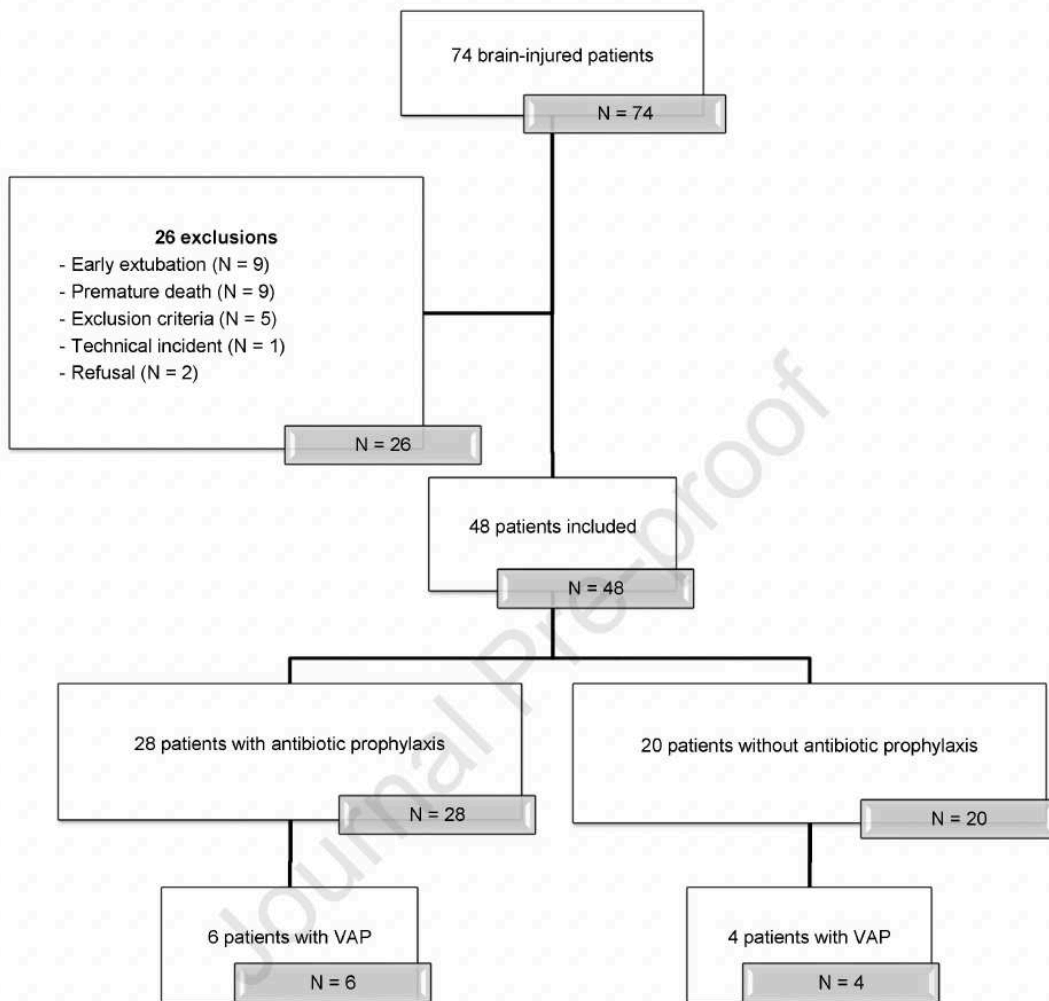
Figure 1: Study population flowchart

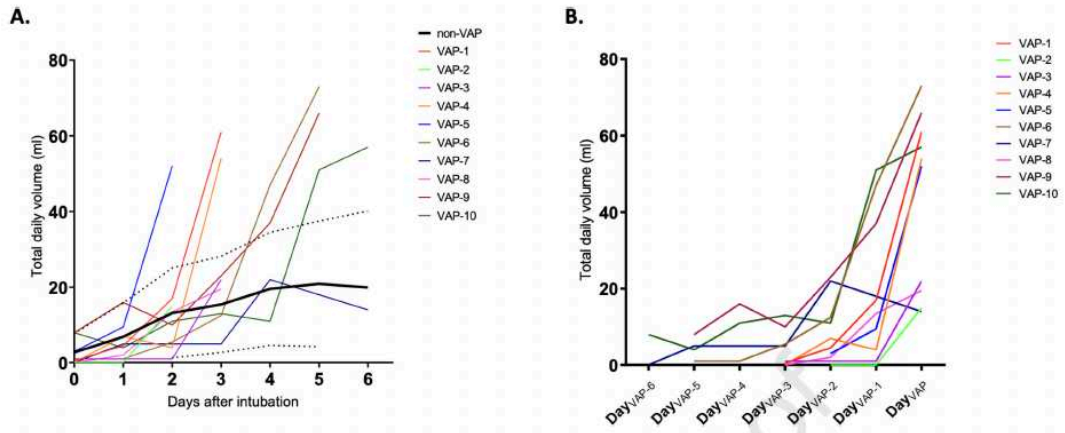
VAP = ventilator-associated pneumonia

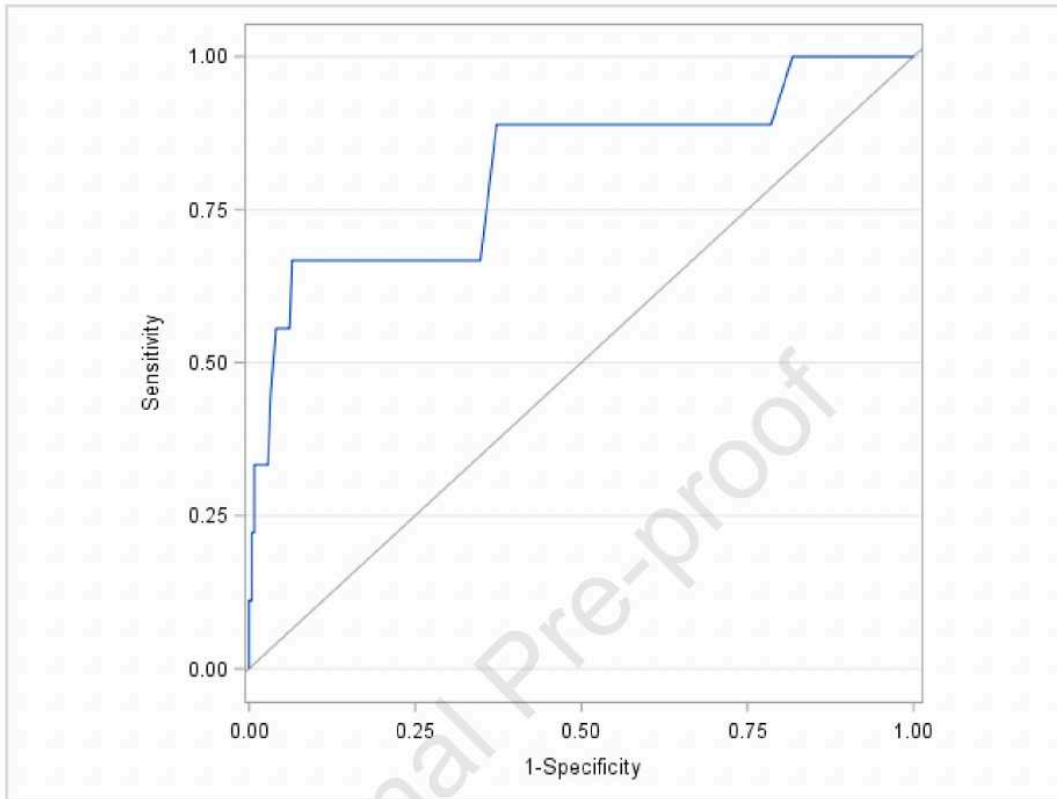
Figure 2: A. Evolution of daily volumes of endotracheal aspirates until VAP diagnosis for the VAP group and until day 6 of ventilation for the VAP-free group; B. Evolution of daily endotracheal aspirate volumes based on day of VAP diagnosis.

Colored curves: Patients who developed ventilator-associated pneumonia (VAP). Black and dotted curve: Mean +/- standard deviation of VAP-free patients.

Figure 3: Receiver operating characteristic curve of the secretion volume delta for discrimination of ventilator-associated pneumonia. The patient-day unit of measure was used as a metric for the secretion volume delta over time (n=258). We consider as patient-day a patient who was hospitalized and had a secretion volume measurement.







Take-home points:

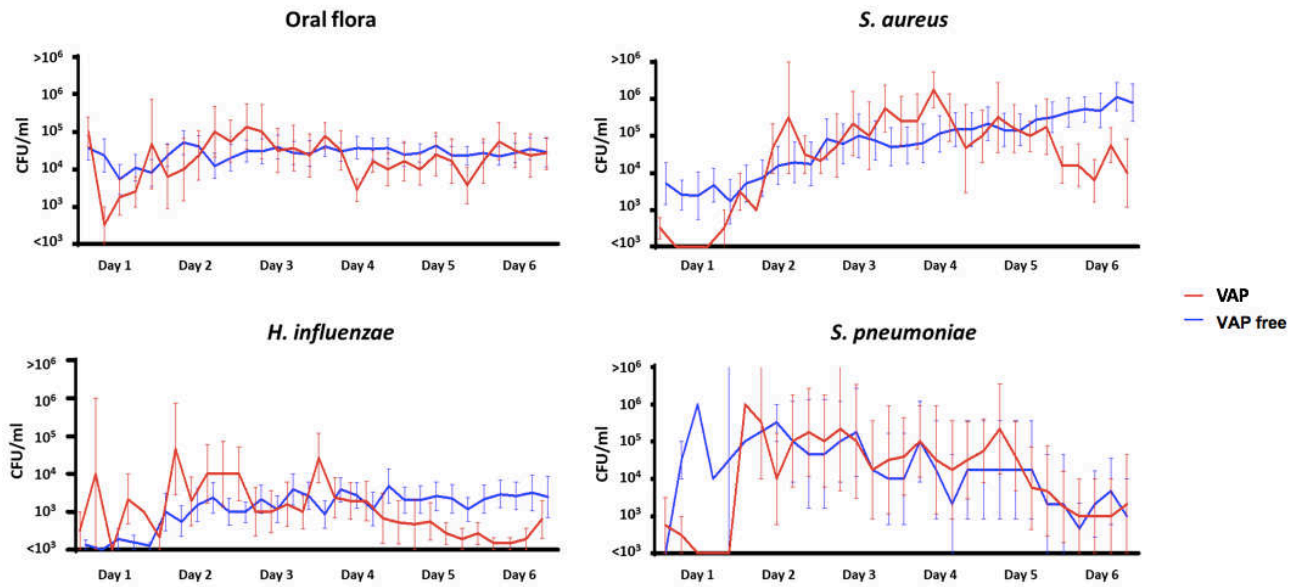
Study question: The aim was to exhaustively describe the physical and microbiological characteristics of endotracheal aspirates and analyze their variations in the development of ventilator-associated pneumonia (VAP) during the first seven days of mechanical ventilation in patients hospitalized in intensive care unit.

Results: Ten out of 48 patients developed VAP and the volume of secretions increased overtime for all patients, with greater variation in the VAP patients.

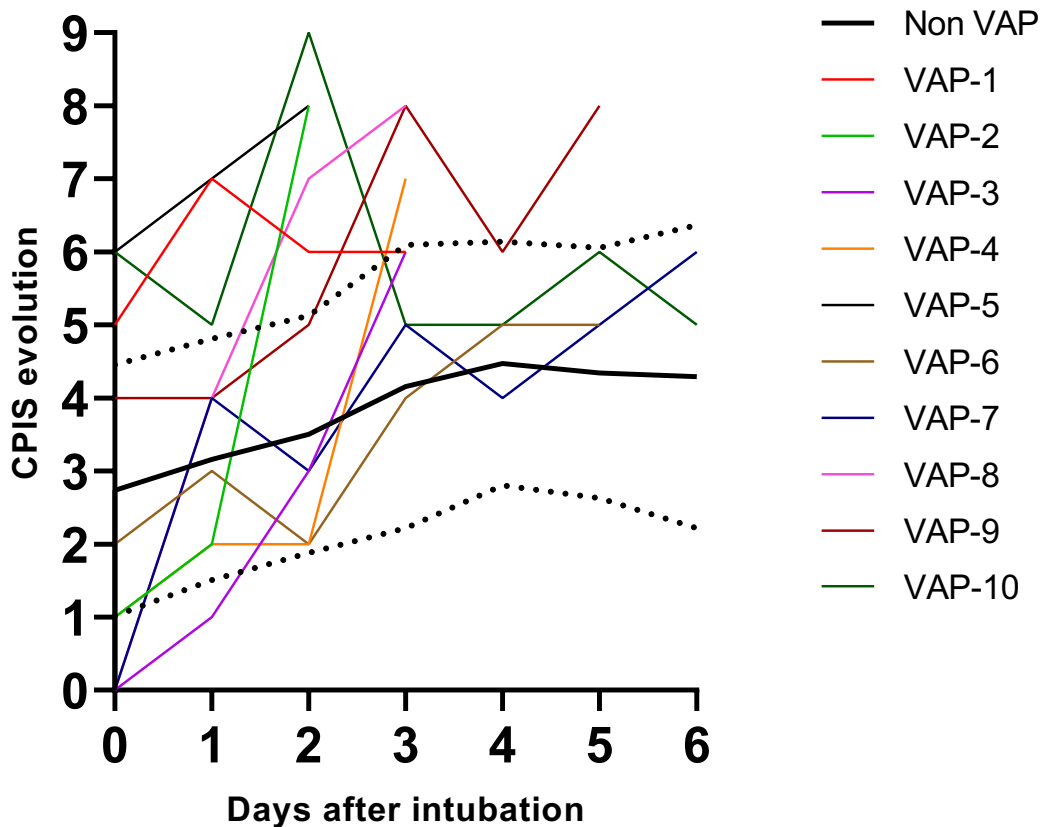
Interpretation: The study provides new information on the course of respiratory colonization in ventilated patients and suggests that an increase in secretion volume should alert for VAP development.

Evolution of tracheobronchial colonization following tracheal intubation in ventilated patients: the INSPIRE study

Supplemental Material

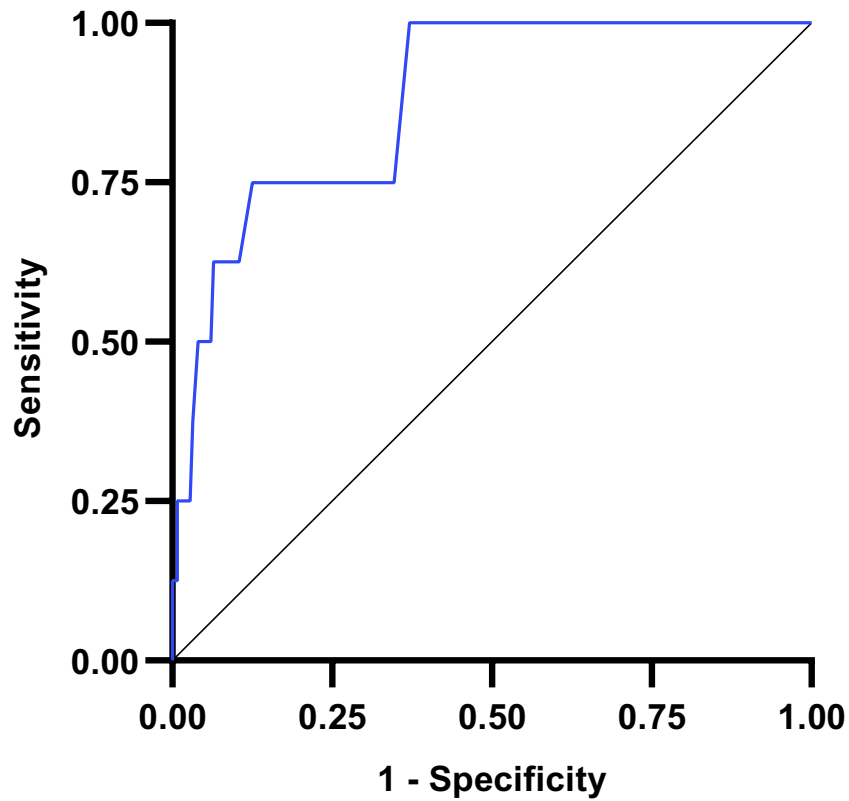


eFigure 1: Bacterial load evolution of oral flora, *S. aureus*, *H. influenzae* and *S. pneumoniae* starting from intubation time.



eFigure 2: Evolution of the Clinical Pulmonary Infection Score during the first 7 days of ventilation.

Colored curves: Patients who developed ventilator-associated pneumonia (stop the day of the diagnosis of ventilator-associated pneumonia). Black and dotted curves: Mean \pm standard deviation for ventilator-associated pneumonia-free patients. The average Clinical Pulmonary Infection Score of patients free of ventilator-associated pneumonia (black curve) increased between 2.7 on Day 0 and 4.3 on Day 6.



eFigure 3: ROC curve based on the daily differences in ETA volume for microbiologically confirmed VAP.

Sensitivity and specificity of 63% and 93% were detected for a cut-off value of ETA secretion difference of 20.0ml.

eTable 1: Patients' characteristics at baseline.

	All patients (n=48)	Non-VAP patients (n=38)	VAP patients (n=10)
Sex - Male	28 (58.3)	20 (52.6)	8 (80.0)
Age	62.0 [50.8 ; 69.3]	62.0 [48.5 ; 69.0]	59.5 [55.0 ; 69.5]
BMI (n=47)	26.4 (6.6)	26.2 (6.9)	27.2 (5.7)
Charlson Index	3.0 [2.0 ; 4.0]	3.0 [2.0 ; 4.0]	3.0 [2.0 ; 4.0]
APACHE II Score	14 [11 ; 18]	14 [10 ; 18]	14 [12 ; 15]
Diabetes	5 (10.4)	5 (13.1)	0 (0.0)
Surgery	29 (60.4)	22 (57.9)	7 (70.0)
Antibiotic prophylaxis	28 (58)	22 (57.9)	6 (60.0)
Trauma	16 (33.3)	14 (36.8)	2 (20.0)
Pre-hospital intubation	11 (22.9)	9 (23.7)	2 (20.0)
Corticosteroid/Immunosuppressant	6 (12.5)	6 (15.8)	0 (0.0)

n (%) for qualitative variables; n, Mean (Standard Deviation) or Median [Q1; Q3] for quantitative variables.

Abbreviations: VAP = ventilator-associated pneumonia; BMI – body mass index; APACHE = acute physiology and chronic health evaluation

eTable 2: Patients' characteristics at baseline.

Patients	Delay from MV to VAP (days)	Radiological sign	Decreased P/F ratio	Altered respiratory mechanics	Fever	Leucocytosis	Purulence of secretions	Pathogens in the ETA at the diagnosis	CFU/ml	Conclusion
VAP 1	4	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	0	-	Clinically suspected
VAP 2	3	Yes	Yes	No	Yes	No	No	<i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i>	>10 ⁶ >10 ⁶	Microbiologically confirmed
VAP 3	4	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	<i>S. aureus</i> <i>H. influenzae</i>	10 ⁶ 10 ⁵	Microbiologically confirmed
VAP 4	3	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	<i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i>	10 ⁵ 10 ⁵	Microbiologically confirmed
VAP 5	3	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	<i>H. influenzae</i> <i>S. aureus</i>	10 ⁵ 10 ⁴	Microbiologically confirmed
VAP 6	5	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	>10 ⁶ 10 ⁶	Microbiologically confirmed
VAP 7	7	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	0	-	Clinically suspected
VAP 8	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	<i>S. pneumoniae</i> <i>M. catarrhalis</i>	>10 ⁶ >10 ⁶	Microbiologically confirmed
VAP 9	5	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>	>10 ⁶ 10 ⁶	Microbiologically confirmed
VAP 10	7	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i>	>10 ⁶ 10 ⁶	Microbiologically confirmed

Abbreviations: VAP = ventilator-associated pneumonia; CFU = colony forming units; P/F = PaO₂/FiO₂ ratio

2.3. Évolution du microbiote respiratoire chez deux patients

En complément des travaux précédents et afin de confirmer les premiers résultats obtenus dans l'étude SCORPIUS, les échantillons de deux patients (1 PAVM à *S. aureus* survenant à J2, 1 colonisation respiratoire à *S. aureus*) ont été séquencés sur les 72 premières heures afin d'objectiver les variations plus fines du microbiote respiratoire. Un protocole identique à celui de l'étude SCORPIUS a été utilisé pour le séquençage du microbiote respiratoire. Néanmoins, nous avons ajouté l'analyse par PCR quantitative (qPCR) en triplicat biologique ciblant l'ADNr16S afin de quantifier la charge bactérienne totale dans chaque échantillon. Les abondances relatives ont ainsi pu être rapportées à la quantité totale de bactéries afin d'obtenir une abondance absolue. La charge bactérienne globale retrouvée entre les deux patients était différente et bien plus élevée pour le patient présentant une PAVM (10^{10} copies de 16S) (Figure 29). Les abondances absolues de *S. aureus* restaient néanmoins identiques pour les deux patients (environ 10^8 copies/ml). Les variations de microbiotes au cours d'une même journée semblaient importantes avec une modification des ratios entre chaque bactérie. Nous pouvons donc en conclure que le microbiote est très hétérogène et dépend beaucoup du moment du prélèvement. Au début de la VM, de fortes abondances de *Streptococcus* et de *Prevotella* et d'autres bactéries de la flore oro-pharyngée (*Actinomyces*, *Rothia*, *Gemella*...) ont été retrouvées. Très rapidement, ces genres bactériens ont vu leur abondance décroître au profit de *S. aureus* chez le patient colonisé. A contrario, une augmentation globale de la flore oro-pharyngée a été retrouvée chez le patient 2 jusqu'à la survenue d'une PAVM. Enfin, l'évaluation du microbiote après la mise en place d'une antibiothérapie nous a permis d'observer une forte décroissance de la charge bactérienne comme attendu mais une persistance de *S. aureus* à environ 10^4 copies de 16S (Figure 30).

L'effectif analysé reste cependant réduit, le microbiote d'autres échantillons doit être déterminé pour confirmer ces résultats.

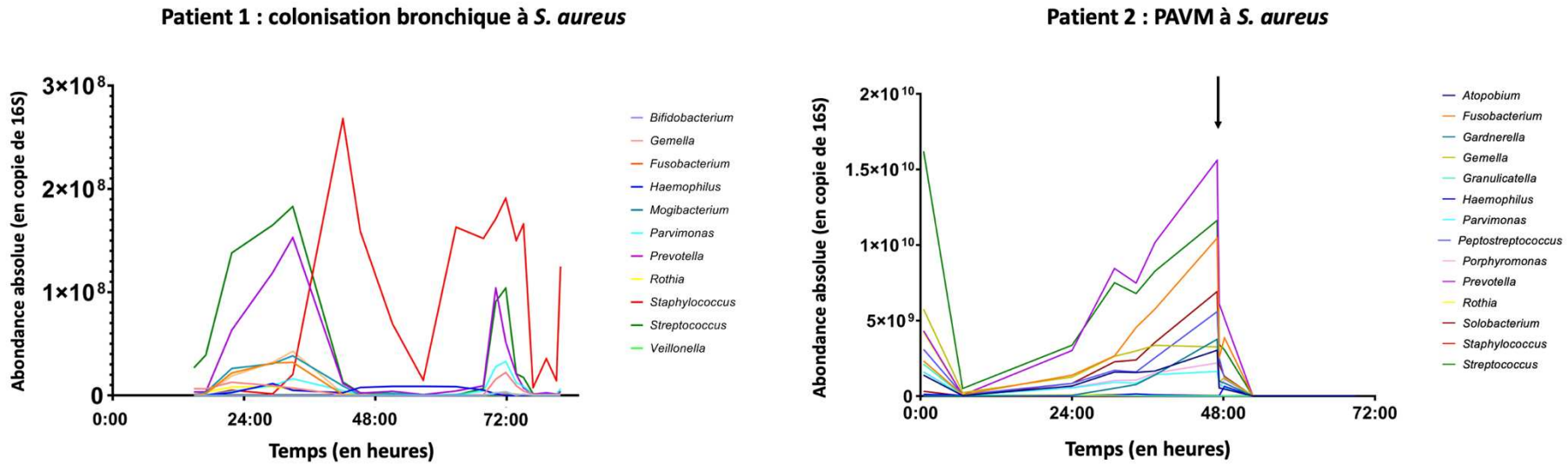
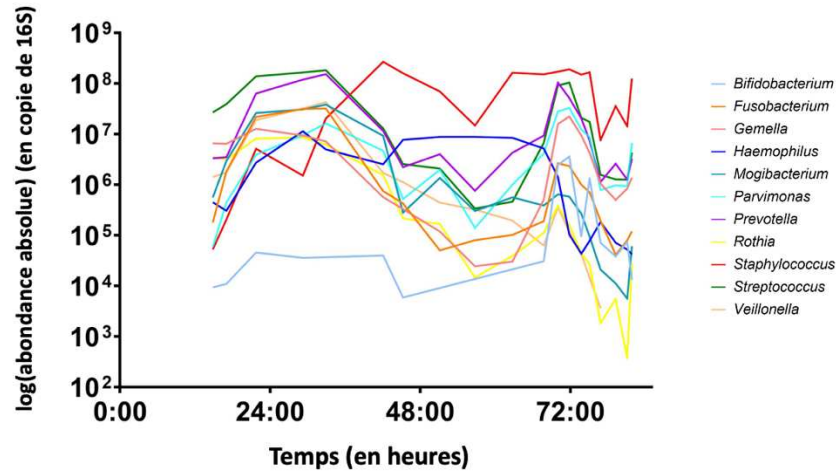


Figure 29 : Évolution du microbiote au cours des 72 premières heures de ventilation mécanique chez un patient colonisé à *S. aureus* (à gauche) et chez un patient présentant une PAVM à *S. aureus* à 48 heures (flèche noire à droite).

Malgré la documentation microbiologique à *S. aureus* dans les deux cas, l'abondance quantitative était significativement différente entre les deux patients où elle était majoritaire chez le patient 1 (courbe rouge) et difficilement visible chez le patient 2. La présence de *Prevotella* et de *Streptococcus* restait majoritaire en tout cas sur les premières heures de VM avant une chute notable chez le patient 1 liée à la prolifération de *S. aureus* et à la mise sous antibiothérapie par amoxicilline + acide clavulanique chez le patient 2.

Patient 1 : colonisation bronchique à *S. aureus*



Patient 2 : PAVM à *S. aureus*

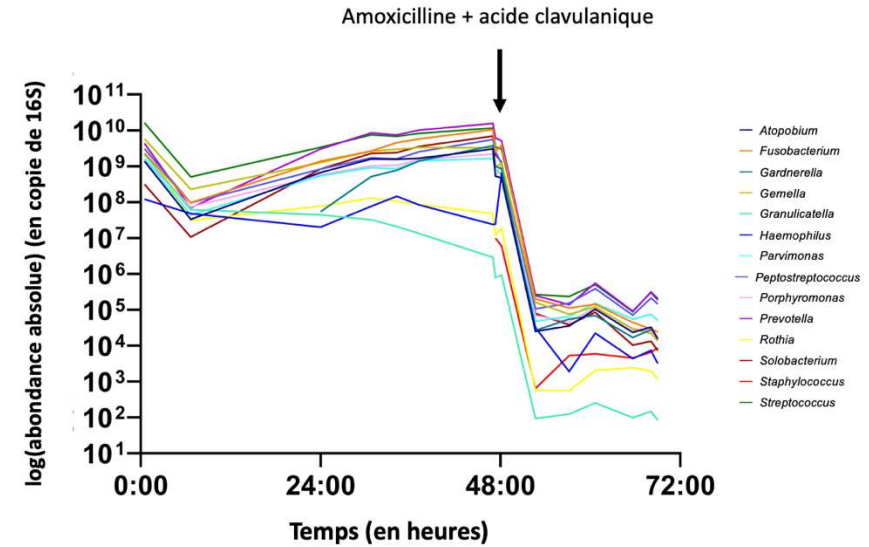


Figure 30 : Évolution du logarithme de l'abondance absolue du microbiote.

A noter, pour le patient 1, l'augmentation croissante du *S. aureus* et de la chute des *Rothia* au cours des 48 premières heures de VM et, pour le patient 2, la franche diminution de la charge bactérienne d'environ 5 logarithmes après l'introduction de l'antibiothérapie par amoxicilline + acide clavulanique ainsi que la persistance de *S. aureus* aux alentours de 10^4 copies.

Troisième travail : Analyse génomique de souches de *Staphylococcus aureus* isolées au niveau respiratoire chez des patients intubés-ventilés : étude SSUPREM

L'objectif de ce troisième travail était de décrire les caractéristiques génomiques des isolats de *S. aureus*, retrouvés après culture de prélèvements respiratoires (AET ou LBA) collectés dans le cadre du soin de patients intubés-ventilés du service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges. Grâce à l'analyse complète des génomes, les liens phylogénétiques ainsi que le contenu en gènes de résistance et de virulence ont été décrits et comparés au statut infectieux du patient au moment du prélèvement.

1. Protocole de l'étude

Tous les isolats respiratoires de *S. aureus* retrouvés en culture au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges ont été inclus sur une période de 2 ans, allant de juillet 2020 à juin 2022. Ont été exclus de l'analyse les patients ayant une infection active à *S. aureus* au moment de l'intubation (bactériémie, infection respiratoire...) ou ayant été trachéotomisés précocement.

Tous les isolats de *S. aureus* ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Vitek MS). Pour certains patients, plusieurs morphotypes en culture ont été distingués. Après lyse mécanique par billes de céramique FastPrep®, l'ADN bactérien a été extrait à l'aide du kit *Bacterial DNA extraction* (Sacace Biotechnologies). Les bibliothèques des ADN ont, par la suite, été réalisées à l'aide du kit *Ion Xpress Plus Fragment* sur l'automate Library Builder® (ThermoFisher Scientific) avant d'être séquencées sur la plateforme Ion GeneStudio S5 par technologie Ion Torrent (Figure 31).

A partir des fichiers *fastq*, un assemblage des *reads* en *contigs* a été réalisé à l'aide du logiciel d'assemblage SPADES. Après contrôle de la qualité des séquences par les logiciels FastQC et Quast v5.0.2, les liens phylogénétiques ont été investigués après comparaison des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) à partir des génomes entiers à l'aide du logiciel snippy v4.4.5. (<https://github.com/tseemann/snippy>) contre la séquence de référence de *S. aureus* NCTC8325 (NC_007795.1). Pour générer les arbres phylogénétiques, les logiciels Fasttree v2.1.10 and Figtree v1.4.4 ont été utilisés. Le typage MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) des isolats a été réalisé sur le logiciel PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>). L'analyse des gènes de résistance et

de virulence a été conduite à l'aide des logiciel ResFinder v4.1 database (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) et Virulence Finder DataBase (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>), respectivement, en utilisant les paramètres standards (90% de cut-off d'identification et 60% de longueur minimale).

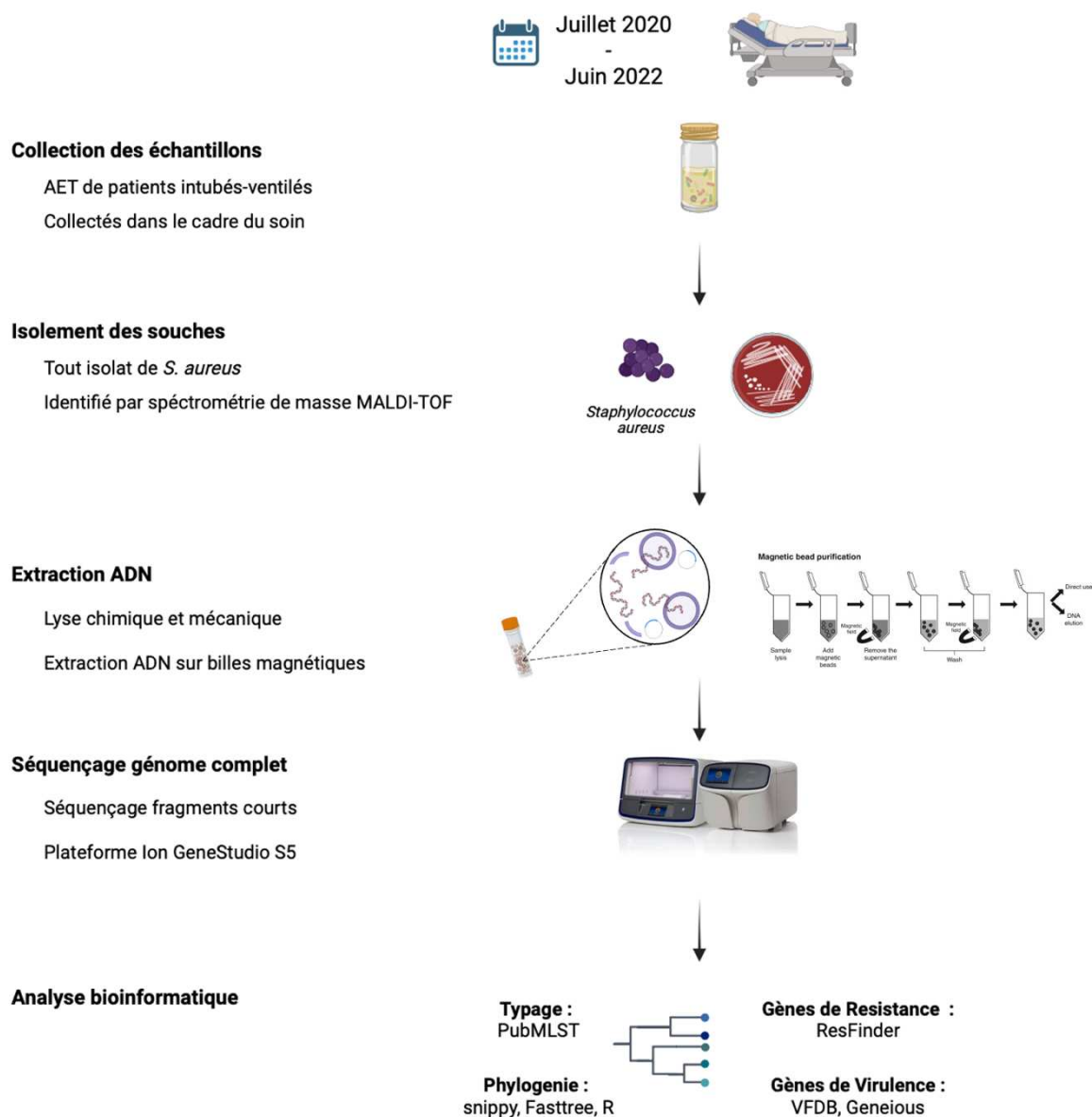


Figure 31 : Principales étapes du protocole du recueil des échantillons au séquençage des isolats de *S. aureus*.

2. Principaux résultats

172 isolats de *S. aureus* provenant de 167 patients intubés-ventilés ont été séquencés et analysés. L'analyse épidémiologique a permis de mettre en évidence une population polyclonale dominée par 6 types de séquences (ST) représentant près de deux tiers des isolats : le ST30 (21%), le ST398 (13%), le ST15 (9%), le ST45 (9%), le ST5 (8%) et le ST8 (6%). Par ailleurs, trois nouveaux ST ont été découverts (ST8985, ST8986 et ST9086).

D'un point de vue phylogénétique, les isolats n'étaient pas liés entre eux. Un nombre de SNP > 300 a été retrouvé pour la quasi-totalité des isolats, ce qui montre le caractère non épidémiogène et une contamination probable par la propre souche du patient. Seuls deux couples d'isolats (de ST45 et ST8985), impliquant pour chaque isolat commun deux patients différents, ont présenté un nombre de SNP égal à 1, respectivement. Les deux couples de patients ont été hospitalisés sur la même période, ce qui suggère une transmission croisée directe ou par l'intermédiaire du personnel ou de matériel commun utilisé.

En ce qui concerne la résistance, une excellente corrélation entre phénotype et génotype a été retrouvée. Le taux de SARM (gène *mecA*) a été de 4,1% ce qui est en dessous des taux moyens retrouvés dans les services de Réanimation français (moyenne de 11,1%, 8,0% et 7,6% en 2020, 2021 et 2022 d'après les données du groupe de travail Réa-REZO). De nombreux autres mécanismes de résistance acquis ont été observés sans lien évident avec le type de ST hormis la présence du gène *erm(A)* associé au ST30 et du gène *erm(T)* associé au ST398, et conférant tous les deux une résistance aux macrolides (érythromycine). Des mutations chromosomiques ont surtout été observées dans les gènes *griA* et *gyrA* codant les topoisomérases IV et l'ADN gyrase respectivement. Tous les isolats de ST45 possédaient la substitution I45M mais qui ne confère pas de résistance phénotypique.

L'étude des principaux facteurs de virulence connus chez *S. aureus* a permis de montrer que le profil de virulence était étroitement corrélé au ST. Afin d'analyser l'impact du profil de virulence sur la survenue de PAVM, nous avons comparé les différences de répartitions des facteurs de virulence dans chaque sous-groupe (PAVM, TAVM et colonisation). Cette analyse a été réalisée sur 105 patients de notre cohorte pour lesquels un diagnostic de PAVM précoce et une documentation microbiologique dans les 48 heures adjacentes au diagnostic a été réalisée. Nous n'avons pas observé de lien entre le profil de virulence et la survenue de PAVM. En effet, la répartition des isolats dans chaque sous-groupe n'a pas permis de montrer de différences en termes de ST ou de facteurs de virulence. Par conséquent, la survenue de PAVM ne semble pas liée à la présence d'un ST particulier ni à l'expression d'un gène de virulence spécifique.

3. Valorisation

Ces travaux ont fait l'objet d'une **communication orale au congrès de l'ECCMID 2021** à Vienne (présentation O2964) intitulée *Comparative genomic analysis of respiratory Staphylococcus aureus isolates from ICU mechanically ventilated patients*, d'une **communication orale aux journées d'animation scientifique de la FéRI 2022** et d'une **présentation affichée au Microbiology Day 2022** à Bordeaux intitulée *Whole genome sequencing of consecutive respiratory S. aureus isolates in the ICU: the SSUPREM study*.

Par ailleurs, **un article scientifique soumis dans le Journal of Hospital Infection** pour lequel je suis premier auteur, est présenté ci-après.

1 **Longitudinal two-years comparative genomic analysis of respiratory**
2 ***Staphylococcus aureus* isolates from ICU mechanically ventilated patients**

3

4 Sylvain MEYER¹, Ana Catalina HERNANDEZ-PADILLA^{1,2,3}, Anne-Laure FEDOU², Thomas
5 DAIX², Delphine CHAINIER¹, Marie-Cécile PLOY¹, Philippe VIGNON^{1,2}, Bruno FRANCOIS^{1,2,3},
6 Olivier BARRAUD^{1,3} *

7

8 ¹ INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Université de Limoges, Limoges, France.

9 ² CHU Limoges, Service de Réanimation Polyvalente, Limoges, France.

10 ³ INSERM, CIC1435, Limoges, France.

11

12 *corresponding author: Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges, 2 Ave.

13 Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France. Phone: +33 555056165, Fax: +33

14 555056722; E-mail: olivier.barraud@unilim.fr

15

16 **Keywords:** *Staphylococcus aureus*, VAP, mechanical ventilation, WGS, comparative
17 genomic analysis, antimicrobial resistance, virulence factors

18 **Abstract:**

19

20 **Background:** Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the main healthcare-
21 associated infection in the intensive care units with *Staphylococcus aureus* as the first
22 pathogen in early VAP.

23 **Objectives:** Primary objective was to compare, using whole genome sequencing
24 (WGS), consecutive *S. aureus* isolates from lower respiratory samples of mechanically
25 ventilated patients for identification of potential cross-transmissions. Secondary
26 objective was to determine a potential link between *S. aureus* WGS data and patients
27 with *S. aureus* early VAP.

28 **Study design and Methods:** All MV patients with a documentation of respiratory *S.*
29 *aureus* isolates were included over a two-years period. WGS allowed typing,
30 comparative genomic and phylogenic analyses, as well as analyses of antibiotic
31 resistance genes and virulence genes. Virulence genes were compared between VAP
32 patients and patients who did not develop any respiratory infectious event.

33 **Results:** A total of 172 *S. aureus* isolates from 167 patients were sequenced. WGS
34 revealed that the *S. aureus* population was polyclonal with only two potential
35 healthcare cross-transmissions, each involving two isolates (2.3%). A very low
36 resistance rate was observed with a strong genotypic/phenotypic association, and with
37 a virulence profile highly dependent on the sequence type. No significant correlation
38 was observed between VAP and virulence profile.

39 **Conclusion:** This study on consecutive respiratory *S. aureus* isolates of MV patients
40 revealed a very low level of cross-transmission. No association was observed between
41 *S. aureus* WGS data and VAP occurrence.

42 Introduction

43 *Staphylococcus aureus* is one of the major respiratory pathogens in the
44 Intensive Care Units (ICU), which can notably lead to early ventilator-associated
45 pneumonia (VAP) in mechanically ventilated (MV) patients [1,2]. VAP is the most
46 prevalent healthcare-associated infection in the ICU, involving at least 15 to 20% of
47 MV patients [3,4]. Despite the continuous improvement of healthcare provided to these
48 patients, VAP incidence remains high and increases ICU length of stay and costs [5].
49 In the SENTRY study, *S. aureus* was involved in 10 to 27% of total ICU-reported
50 pneumonia cases [6]. *S. aureus*-associated VAP incidence was estimated at around
51 4.5 per 1000 MV days worldwide [1] but some ICU populations are at higher risks of
52 *S. aureus* VAP, such as neuro-injured and trauma patients in whom the prevalence
53 can reach up to 21 per 1000 MV days [7], or patients with superinfected viral
54 pneumonia such as COVID-19 [8].

55
56 *S. aureus* VAP is mainly occurring in the early course of MV [9]. Cross
57 transmissions between patients have already been described but at a low frequency
58 [10]. Indeed, patients are mostly infected with their own *S. aureus* strain. Nasal
59 colonization with *S. aureus* is the main risk factor for *S. aureus* VAP development [11].
60 *S. aureus* migration from the nasopharynx to the lungs through the endotracheal tube
61 is known to lead to early VAP [12]. Ventilator-associated tracheobronchitis (VAT),
62 considered as the previous step before VAP, has been poorly investigated, and
63 transition from VAT to VAP is thought to be related to the bacterial inoculum, the type
64 and virulence of invading bacteria versus containment by host defenses [13].

65 Factors explaining transition from colonization to VAT/VAP are misunderstood.
66 Virulence factors are thought to be key intermediates. *S. aureus* can express a wide
67 variety of proteins that can facilitate colonization (adhesion proteins), increase biofilm

68 production, interact with human local pulmonary defenses (immune escape proteins)
69 or induce cytotoxicity (toxins)[14]. But predicting clinical outcome based on genotype
70 information is still a major challenge nowadays, virulence factors being poorly
71 explored.

72 In this study, the genomic characteristics of consecutive respiratory *S. aureus*
73 isolates of MV patients were analyzed using whole genome sequencing (WGS). First
74 objective was to compare *S. aureus* isolates for identification of potential cross-
75 transmissions. Second objective was to determine if genomic composition and notably
76 virulence factors, may differ between colonization, VAT and VAP.

77

78

79 **Materials and methods**

80

81 ***Study design and collected data***

82 This is a retrospective monocentric study where all MV patients hospitalized at
83 the ICU department of Limoges University Hospital Center from July 2020 to June 2022
84 with a microbiological documentation of *S. aureus* from lower respiratory samples
85 (endotracheal aspirates or bronchoalveolar lavage) were included.

86 Collected data included age, sex, reason for admission, ICU mortality, date of
87 intubation and extubation or death, presence of a tracheostomy, sampling date,
88 microbiological results (identified bacteria and number of colonies forming units
89 (CFU/mL)), VAP or VAT during MV and presence of a SARS-CoV-2 infection. All
90 subjects were informed that their samples could be used for a clinical research purpose
91 and were able to express their opposition.

92 To standardize VAP diagnosis, two independent physicians reviewed all patients'
93 medical charts. VAP diagnosis was determined according to pre-established

94 definitions. A radiological criterion (presence or worsening of a radiological infiltrate),
95 associated with at least two of the clinical features (abnormal body temperature,
96 abnormal white blood cells, purulent endotracheal secretions, decline in oxygenation
97 and altered respiratory mechanics) were required [15,16]. VAT was diagnosed based
98 on the same clinical criteria except that there was no presence or worsening of a
99 radiological infiltrate. Patients who did not meet those criteria were considered as
100 colonized patients. For SARS-CoV-2 positive patients, as it is difficult to differentiate
101 SARS-CoV-2 pulmonary infection alone from VAP or VAT, we categorized them in
102 “respiratory infectious event” and “no respiratory infectious event” during their ICU stay.

103

104 ***Strain isolation and antimicrobial susceptibility testing***

105 Quantitative microbiological culture was done as routinely performed at the
106 microbiology laboratory following current international guidelines for respiratory
107 samples [17]. All different morphotypes suspecting *S. aureus* were identified by
108 MALDI-TOF mass spectrometry using the Vitek[®]MS (bioMérieux), isolated and
109 preserved at -80°C.

110 For each isolate, an antibiogram was performed with the Vitek[®]2 AST-P631
111 cards (bioMérieux) and interpreted according to the European Committee for
112 Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>) breakpoints table v10.0.

113

114 ***DNA extraction and Whole Genome Sequencing***

115 Each isolate was plated on a blood agar plate, and after 24 hours at 37°C,
116 around 10 colonies were transferred into 500 µL of BL2B buffer of the Bacterial DNA
117 extraction kit (Sacace Biotechnologies). After 1 hour under agitation at 37°C, the
118 sample was transferred to a Lysing Matrix D tube, then submitted to a FastPrep[®] (MP
119 Biomedical) step for 45 seconds at speed 6.5. Then, 400 µL of lysate was extracted

120 with the Bacterial DNA extraction kit for SaMag machine (Sacace Biotechnologies) and
121 eluted in 50 µL.

122 As previously described [18], libraries were performed using the Ion Xpress Plus
123 Fragment Library Kit on the Library Builder® following manufacturer's
124 recommendations. Libraries were then pooled and 40 isolates were sequenced on the
125 same Ion 540 chip. Sequencing was done using the Ion GeneStudio S5 platform (Life
126 technologies).

127

128 ***Bioinformatic analysis***

129 Fastq raw reads were assembled using de novo assembler SPADES v3.13.0
130 and annotated using Prokka v1.14.6. Quality analysis of raw reads and SPADES
131 assembly was performed using FastQC and Quast v5.0.2, respectively. Sequence
132 typing was done using PubMLST tool ([https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-](https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus)
133 [aureus](https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus)), *spa* typing using spaTyper 1.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/spaTyper/>) and
134 capsule and *agr* typing using Geneious Prime 2023.0.4 software with previously
135 published primers [19,20].

136 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) phylogenetic trees were created using
137 Snippy v4.4.5 (<https://github.com/tseemann/snippy>) against reference genome
138 NCTC8325 strain (NC_007795.1), and Newick format tree was generated using
139 Fasttree v2.1.10.

140 Resistance genes were retrieved using ResFinder v4.1 database
141 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) with standard parameters of 90% identification
142 threshold and 60% minimum length.

143 Virulence-associated genes analysis was performed on Virulence Finder
144 DataBase and presence/absence of microbial surface components recognizing
145 adhesive matrix molecules (MSCRAMM) was confirmed using Geneious Prime

146 software following Strauss *et al* recommendations [21]. Principal coordinate analysis
147 (PCoA) was performed after generation of Bray-Curtis' dissimilarity matrix using the
148 Primer-e v7.0.17 software.

149 All generated sequences are available at the National Center for Biotechnology
150 Information's BioProject database under accession number PRJNA1102351.

151

152 **Statistical analysis**

153 Data were analyzed using RStudio v2023.09.1 and GraphPad Prism softwares.
154 Descriptive statistics were used to summarize clinical data and their distribution among
155 groups (proportions, dispersion analyses when appropriate). Correlations between
156 microbiological variables and VAP/VAT or respiratory infectious event development
157 were assessed using the Student t-test, Pearson's X^2 correlation, or Kruskal-Wallis
158 (ANOVA) test when applicable. p-values were considered significant if $p < 0.05$.

159

160

161 **Results**

162 ***Description of S. aureus population in MV patients***

163 One hundred and eighty MV patients were included over two years. Thirteen
164 patients were excluded because of active infection at admission, early tracheostomy
165 or opt-out for the use of their data in research (Figure 1). Epidemiological and
166 resistance analyses were performed over the isolates of 167 patients. Five patients
167 presented two morphologically different *S. aureus* isolates in their respiratory sample,
168 which represents a final total of 172 isolates. WGS generated a mean value of 2 461
169 027 reads [IQR: 1834490 - 2907190]. After assembly, we obtained high-quality
170 genomes with a N50 value $> 55,000$ and less than 150 contigs.

171

172 ST repartition showed a high heterogeneity with ST30 (n = 36, 20.9%), ST398
173 (n = 23, 13.4%), ST15 (n = 16, 9.3%), ST45 (n = 16, 9.3%), ST5 (n = 14, 8.1%) and
174 ST8 (n = 11, 6.4%) being the most prevalent. We notably detected three new ST, which
175 were deposited and recognized on public database as ST8985, ST8986 and ST9086.
176 Correlation between ST, *spa* type, capsule and *agr* type is shown in Figure 2. Some
177 *spa*-types were not assigned, either due to the finding of a new *spa*-type profile or
178 because of the limitation of short-read shotgun sequencing assembly.

179 Based on the SNPs phylogenetic tree, no epidemic clones were detected
180 (number of SNP between isolates > 300 SNPs) except for isolates Sa_41 / Sa_45
181 (ST45) and Sa_44 / Sa_55 (ST8985), both showing only 1 SNP difference
182 (Supplementary Figure 1). These two cross-contaminations happened at the same
183 time period and involved patients hospitalized in the same sectors (Supplementary
184 Figure 2).

185 Antimicrobial susceptibility testing showed excellent concordance with genotype
186 results (Figure 3). Acquired resistance to β -lactams included 130 (75.6%) *blaZ* positive
187 and 7 (4.1%) *mecA* positive isolates (no *mecC* isolate was detected). These latter were
188 carried by ST8 (n = 4), ST22 (n = 2) and ST5 (n = 1) and were all associated with
189 SCCmec type IV. Other resistance mechanisms included acquired resistances to
190 macrolides (n = 33, 19.2%), aminoglycosides (n = 11, 6.4%), fusidic acid (n = 7, 4.1%),
191 tetracyclines (n = 5, 2.9%), fluoroquinolones (n = 4, 2.3%) and sulfonamides (n = 3,
192 1.7%) (Figure 3).

193 Considering the virulence profile, several virulence genes were present in all *S.*
194 *aureus* isolates (Supplementary Figure 3). We notably detected one PVL-positive
195 isolate (ST8), 3 exfoliative toxin A-positive isolates (ST6, ST398 and ST1290) and 37
196 TSST-positive isolates (mainly in ST30). *S. aureus* virulence profile was strongly
197 associated with ST with the serine protease, leucocidin D and E, enterotoxin gene

198 cluster (*entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entO*, *entU*) and collagen binding protein encoding
199 genes being the most discriminative parameters between ST (Pearson correlation \geq
200 0.7) (Figure 4).

201

202 **Characterization of *S. aureus* population with infectious status**

203 Characteristics of VAP, VAT and colonized patients are presented in Table 1.
204 To better target the association between the *S. aureus* strains and the development of
205 infection, we excluded patients who were early extubated or dead before day 3 from
206 intubation and for whom the delay between respiratory sample and infectious event
207 was higher than 48 hours. Patients were mainly admitted for acute respiratory distress
208 syndrome (ARDS) due to COVID-19 (n = 23), stroke (n = 15) and polytrauma (n = 13).
209 VAP events happened mainly in the first days of MV (median: 4 days [3 – 6]), therefore
210 we decided to focus on early *S. aureus* VAP, and excluded patients for whom *S. aureus*
211 was detected after Day 7 (Figure 1). In total, 103 patients (105 isolates) were included
212 in this secondary analysis.

213 Twenty-three (22%) patients were admitted due to ARDS secondary due to
214 SARS-CoV-2 infection, and, 19 developed a *S. aureus* secondary respiratory infection,
215 which required antibiotic treatment. On the other hand, in the SARS-CoV-2 negative
216 group, 27 VAP (34%), 16 VAT (20%) and 37 (46%) *S. aureus* colonization were
217 documented. ST repartition between these populations (SARS-CoV-2-positive and
218 negative) was globally similar (Supplementary Figure 4) and no significant association
219 between virulence profile and infectious status was retrieved.

220 **Discussion**

221 In this study, we investigated the genomic characteristics of 172 respiratory *S.*
222 *aureus* isolates in MV patients from a single ICU over two years.

223 Comparative genomic analysis revealed *S. aureus* population was essentially
224 polyclonal. *S. aureus* isolates found in the respiratory tract of ICU patients are mainly
225 coming from nasal carriage, but transmission between patients has previously been
226 shown via direct patient-to-patient transmission or transmission via staff and
227 environment [10,22]. Colonized healthcare workers have also been implicated as
228 sources of transmission in some outbreaks [23]. We found that nearly all isolates were
229 not genetically linked with a SNP number above 300. Only two couples of isolates out
230 of the 172 isolates (2.3%) were considered clonal. We investigated the two micro-
231 epidemics and revealed the patients were hospitalized at the same period of time and
232 in proximate rooms, which underlines the potential healthcare transmission. This study
233 allowed to evidence that, although rare, cross-transmission is a possible cause of
234 healthcare-associated infection. Preventive measures including hand hygiene
235 compliance have shown to decrease cross-transmission [24].

236
237 Six ST represented two thirds of the population: ST30 was the most frequent
238 followed by ST398, ST15, ST45, ST5 and ST8. These STs are commonly isolated in
239 humans, especially in the nasopharynx, the ecological niche of *S. aureus* [25–28], but
240 also in the digestive tract or the skin [29,30]. We found a higher number of isolates
241 belonging to ST398 compared to previous studies [10,31]. Originally reported in animal
242 and environmental samples, ST398 is nowadays being reported at increasing
243 incidence in human isolates. The genomic analysis performed here found that all
244 ST398 strains expressed fibronectin- and collagen-binding proteins, that may facilitate
245 long term persistence in the nasal and gut microbiota [32]. Further phenotypical

246 analyses and human/environmental distributions are needed to better understand the
247 epidemiological success of ST398. Two major clades from livestock-associated and
248 human lineages have been previously described [33]. Here, only human-associated
249 ST398 isolates were reported, mainly with *spa*-type 1451. Consistently with this
250 lineage, no *tetM* gene was detected but we found a high rate of macrolide resistance
251 explained by the carriage of the *erm(T)* gene. In this ST, the *blaZ* gene was also less
252 frequently described (43.5%) compared to other STs.

253 Genotype to phenotype resistance correlation was excellent. Detection of
254 penicillin G susceptibility being difficult, in our study, all strains were considered
255 resistant. Nevertheless, our data showed that in 24.4% of cases, penicillin could have
256 been used, but with high differences depending on ST. Similar results have been
257 reported recently in bloodstream infections [34], for which penicillin use also showed
258 comparable results in terms of therapeutic success compared to cloxacillin [35]. Only
259 4.1% of MRSA were detected. This is in line with current epidemiology in European
260 ICUs where 1 to 7% of patients are MRSA carriers at ICU admission [36]. Macrolide
261 resistance was frequent especially in ST398 (78.3%) due to *erm(T)* and ST30 (17.6%)
262 due to *erm(A)* gene carriage [37]. Other resistance genes were less frequent and in
263 full accordance with phenotype.

264 The outcome of severe bacterial infections is determined by the interplay
265 between host, pathogen and treatments [38]. This is particularly true for *S. aureus* VAP,
266 but little is known about genotypes and bacterial factors contributing to colonization or
267 infection development. This motivated our analysis of the virulence in regards to
268 infection development. We report a high correlation between ST and virulence profile,
269 as it has been previously shown in other diseases [26]. Different strain subgroups were
270 identified depending on the presence or absence of a few virulence genes, such as the
271 collagen binding protein gene (*cna*), the leucocidin D and E (*lukD* and *lukE*), the

272 enterotoxin gene cluster and the serine proteases (*spIA-F*). Nowrouzian *et al.* showed
273 that isolates of the ST30 had the highest amount of virulence genes [30]. This is mainly
274 due to the presence of the *tst* gene, encoding the toxin TSST, which in our study was
275 identified in 32 isolates of this ST type (84.2%), but also to the presence of the
276 enterotoxin gene cluster (*egc*) or the collagen binding protein gene (*cna*). On the other
277 hand, ST398 seems to have a poor virulence profile as this ST lacks the serine-
278 protease operon and the enterotoxins and leucocidins genes. We only detected one
279 PVL-producing ST8 isolate that was associated with a non-necrotizing VAP, and three
280 exfoliatin-A-producing isolates of various ST that were associated with colonization.
281 Moreover, we could describe three new STs in this study including the ST8985, close
282 to ST45, notably carrying the *tst* gene and the ST8986 lacking the biofilm forming *icaA-*
283 *D* operon.

284

285 *S. aureus* is a common VAP pathogen but differentiation between respiratory *S.*
286 *aureus* colonization and infection remains difficult and may contribute to an overuse of
287 antibiotics in the ICU [39]. Except for PVL, which is a well-described virulence factor
288 responsible for community-acquired necrotizing pneumonia, implication of other
289 virulence factors remains poorly investigated in clinical practice [40]. Despite our large
290 collection, with rather homogeneous baseline characteristics and criteria to limit
291 confounding factors, our genomic analysis found no correlation between virulence
292 profile and respiratory infectious status. Similar results have been found in other *S.*
293 *aureus* infections [41,42]. Virulence profile differences in *S. aureus* overinfection in
294 patients admitted for COVID-19 infection disclosed no significant associations either.
295 These results highlight the role of other determinants in the development of infection:
296 regulatory pathways controlling gene expression, host immune response, lung tissue
297 resilience, *S. aureus* interaction with other pathogens and/or with other bacterial

298 species of the lung microbiota [43,44], etc. Further phenotypical analysis and
299 immunological characterization of *S. aureus* early VAP patients vs. colonized
300 individuals are needed to unveil these interactions.

301 This study has some limitations. Even if we analyzed a large population with
302 172 *S. aureus* isolates over two years, first and main limitation, is the fact that this is a
303 monocentric study with results that cannot be generalized to other populations and
304 other ICUs. We, however, found a distribution of *S. aureus* ST types similar to previous
305 studies, including multicenter ones, reported in different regions of the world [11][10].
306 Second, this was an observational study for which we relied on standard-of-care
307 respiratory samples, with patients that were not sampled at a fixed time following
308 intubation. Even if we restricted the analysis to early *S. aureus* VAP, this could have
309 created a selection bias and many potentially *S. aureus*-colonized patients were
310 probably not included in this study because of lack of sampling. Third, the clinical
311 review of medical charts to classify infectious vs. non-infectious cases was performed
312 retrospectively, making it difficult for reviewers to be blind to bed-side clinician's
313 diagnoses. Fourth, identification of some virulence genes was difficult with short-read
314 WGS especially after assembly of reads for genes with repetitive sequences. Finally,
315 we tried to include the maximum of isolates based on their morphological
316 characteristics in culture but we might have missed some different isolates of different
317 ST in the respiratory samples.

318

319 **Conclusion**

320 We performed one of the largest studies on WGS characterization of *S. aureus*
321 isolates of respiratory origin from MV ICU patients. By combining information on
322 phylogeny, antibiotic resistance and virulence gene repertoire, this study provided
323 insights into the population structure of respiratory *S. aureus* in MV patients. We

324 showed that this population was polyclonal with exceptional likely healthcare cross-
325 transmissions. Our cohort showed a low resistance rate with a strong
326 genotypic/phenotypic association, and with a virulence profile highly dependent on the
327 ST. Finally, we found that there was no significant correlation between infectious (VAP,
328 VAT or colonization) status and genotypic virulence profile.

329

330

331 **Acknowledgments:** Authors would like to thank Carole Grélaud for the technical help.

332

333 **Conflict of interest statement:** all authors declared no conflict of interest for this
334 study.

335

336 **Funding statement:** This work was supported by Institut National de la Santé et de la
337 Recherche Médicale (Inserm) and received a grant from ALAIR (Association
338 Limousine d'Aide aux Insuffisants Respiratoires).

339 **References**

- 340 1. Hurley JC. World-Wide Variation in Incidence of *Staphylococcus aureus* Associated
341 Ventilator-Associated Pneumonia: A Meta-Regression. *Microorganisms*. 27 févr 2018;6(1):18.
- 342 2. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe:
343 perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov
344 2017;36(11):1999-2006.
- 345 3. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et
346 al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-
347 acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of
348 hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European
349 Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European
350 Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación
351 Latinoamericana del Tórax (ALAT). *European Respiratory Journal*. 1 sept 2017;50(3).
- 352 4. Klompas M, Branson R, Cawcutt K, Crist M, Eichenwald EC, Greene LR, et al.
353 Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia, ventilator-associated events, and
354 nonventilator hospital-acquired pneumonia in acute-care hospitals: 2022 Update. *Infection
355 Control & Hospital Epidemiology*. juin 2022;43(6):687-713.
- 356 5. Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK, et al. Health care-
357 associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care
358 system. *JAMA Intern Med*. 9 déc 2013;173(22):2039-46.
- 359 6. Sader HS, Streit JM, Carvalhaes CG, Huband MD, Shortridge D, Mendes RE, et al.
360 Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from respiratory
361 samples of patients hospitalized with pneumonia in Western Europe, Eastern Europe and the
362 USA: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2016–19). *JAC-
363 Antimicrobial Resistance*. 1 sept 2021;3(3):dlab117.
- 364 7. Robba C, Reborá P, Banzato E, Wieggers EJA, Stocchetti N, Menon DK, et al. Incidence,
365 Risk Factors, and Effects on Outcome of Ventilator-Associated Pneumonia in Patients With
366 Traumatic Brain Injury: Analysis of a Large, Multicenter, Prospective, Observational
367 Longitudinal Study. *Chest*. déc 2020;158(6):2292-303.
- 368 8. Contou D, Claudinon A, Pajot O, Micaëlo M, Longuet Flandre P, Dubert M, et al.
369 Bacterial and viral co-infections in patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia admitted to
370 a French ICU. *Ann Intensive Care*. 7 sept 2020;10(1):119.
- 371 9. Bronchard R, Albaladejo P, Brezac G, Geffroy A, Seince PF, Morris W, et al. Early
372 onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. *Anesthesiology*. févr
373 2004;100(2):234-9.
- 374 10. Dancer SJ, Adams CE, Smith J, Pichon B, Kearns A, Morrison D. Tracking
375 *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit using whole-genome sequencing. *J Hosp
376 Infect*. sept 2019;103(1):13-20.
- 377 11. Paling FP, Wolkewitz M, Bode LGM, Klein Klouwenberg PMC, Ong DSY, Depuydt
378 P, et al. *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing
379 *S. aureus* ICU pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. janv 2017;23(1):49.e9-49.e14.
- 380 12. Adair CG, Gorman SP, Feron BM, Byers LM, Jones DS, Goldsmith CE, et al.
381 Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care
382 Med*. oct 1999;25(10):1072-6.
- 383 13. Craven DE, Hjalmarson KI. Ventilator-Associated Tracheobronchitis and Pneumonia:

- 384 Thinking Outside the Box. *Clinical Infectious Diseases*. 1 août
385 2010;51(Supplement_1):S59-66.
- 386 14. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*.
387 *Virulence*. déc 2021;12(1):547-69.
- 388 15. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al.
389 Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016
390 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American
391 Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 1 sept 2016;63(5):e61-111.
- 392 16. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the
393 management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated
394 pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2005;171(4):388-416.
- 395 17. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Leven M, Ortqvist A, et al. Guidelines for
396 the management of adult lower respiratory tract infections. *European Respiratory Journal*. 1 déc
397 2005;26(6):1138-80.
- 398 18. Mairi A, Meyer S, Tilloy V, Barraud O, Touati A. Whole Genome Sequencing of
399 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Neonatal
400 Bloodstream Infections at a Neonatal Care Unit, Algeria. *Microb Drug Resist*. août
401 2022;28(8):867-76.
- 402 19. Moore PCL, Lindsay JA. Genetic Variation among Hospital Isolates of Methicillin-
403 Sensitive *Staphylococcus aureus*: Evidence for Horizontal Transfer of Virulence Genes. *J Clin*
404 *Microbiol*. août 2001;39(8):2760-7.
- 405 20. Garnier F, Tristan A, François B, Etienne J, Delage-Corre M, Martin C, et al. Pneumonia
406 and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg Infect Dis*. mars
407 2006;12(3):498-500.
- 408 21. Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, et al. Origin,
409 evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. *Proc*
410 *Natl Acad Sci USA*. 05 2017;114(49):E10596-604.
- 411 22. Price JR, Cole K, Bexley A, Kostiou V, Eyre DW, Golubchik T, et al. Transmission of
412 *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an
413 intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. *Lancet*
414 *Infect Dis*. févr 2017;17(2):207-14.
- 415 23. Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, Holden MTG, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, et
416 al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus*
417 *aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. févr 2013;13(2):130-6.
- 418 24. Marimuthu K, Pittet D, Harbarth S. The effect of improved hand hygiene on nosocomial
419 MRSA control. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 26 nov 2014;3(1):34.
- 420 25. Melles DC, Gorkink RFJ, Boelens HAM, Snijders SV, Peeters JK, Moorhouse MJ, et
421 al. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*.
422 *J Clin Invest*. déc 2004;114(12):1732-40.
- 423 26. Holtfreter S, Grumann D, Balau V, Barwich A, Kolata J, Goehler A, et al. Molecular
424 Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the General Population in Northeast Germany:
425 Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0). *Journal of Clinical*
426 *Microbiology*. 24 oct 2016;54(11):2774-85.
- 427 27. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et
428 al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J*
429 *Infect Dis*. 15 janv 2006;193(2):172-9.

- 430 28. Hanis CL, Garrett KE, Essigmann HT, Robinson DA, Gunter SM, Nyitray AG, et al.
431 Household aggregation of *Staphylococcus aureus* by clonal complex and methicillin resistance
432 profiles in Starr County, Texas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2017;36(10):1787-93.
- 433 29. Rojo A, Aguinaga A, Monecke S, Yuste JR, Gastaminza G, España A. *Staphylococcus*
434 *aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: may factors other than superantigens be
435 involved? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2014;33(4):651-8.
- 436 30. Nowrouzian FL, Stadler LS, Östblom A, Lindberg E, Lina G, Adlerberth I, et al.
437 *Staphylococcus aureus* sequence type (ST) 45, ST30, and ST15 in the gut microbiota of healthy
438 infants — persistence and population counts in relation to ST and virulence gene carriage. *Eur*
439 *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2023;42(3):267-76.
- 440 31. Uhlemann AC, Hafer C, A. Miko B, G. Sowash M, Sullivan SB, Shu Q, et al. Emergence
441 of Sequence Type 398 as a Community- and Healthcare-Associated Methicillin-Susceptible
442 *Staphylococcus aureus* in Northern Manhattan. *Clinical Infectious Diseases.* 1 sept
443 2013;57(5):700-3.
- 444 32. Nowrouzian FL, Ljung A, Hesselmar B, Nilsson S, Adlerberth I, Wold AE. Bacterial
445 Carriage of Genes Encoding Fibronectin-Binding Proteins Is Associated with Long-Term
446 Persistence of *Staphylococcus aureus* in the Nasal and Gut Microbiota of Infants. *Applied and*
447 *Environmental Microbiology.* 13 juill 2021;87(15):e00671-21.
- 448 33. Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, et al. *Staphylococcus*
449 *aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio.*
450 21 févr 2012;3(1):e00305-11.
- 451 34. Cheng MP, René P, Cheng AP, Lee TC. Back to the Future: Penicillin-Susceptible
452 *Staphylococcus aureus*. *Am J Med.* déc 2016;129(12):1331-3.
- 453 35. Hagstrand Aldman M, Kavyani R, Kahn F, Pålman LI. Treatment outcome with
454 penicillin G or cloxacillin in penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a
455 retrospective cohort study. *Int J Antimicrob Agents.* avr 2022;59(4):106567.
- 456 36. Hetem DJ, Derde LPG, Empel J, Mroczkowska A, Orczykowska-Kotyna M, Kozińska
457 A, et al. Molecular epidemiology of MRSA in 13 ICUs from eight European countries. *J*
458 *Antimicrob Chemother.* janv 2016;71(1):45-52.
- 459 37. Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, et al.
460 Identification of a Highly Transmissible Animal-Independent *Staphylococcus aureus* ST398
461 Clone with Distinct Genomic and Cell Adhesion Properties. *mBio.* 28 févr 2012;3(2):e00027-
462 12.
- 463 38. Giulieri SG, Guérillot R, Holmes NE, Baines SL, Hachani A, Hayes AS, et al. A
464 statistical genomics framework to trace bacterial genomic predictors of clinical outcomes in
465 *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Cell Reports.* sept 2023;42(9):113069.
- 466 39. Nora D, Póvoa P. Antibiotic consumption and ventilator-associated pneumonia rates,
467 some parallelism but some discrepancies. *Ann Transl Med.* nov 2017;5(22):450.
- 468 40. Pichon M, Micaelo M, Rasoanandrasana S, Menn AM. Molecular characterization of
469 *Staphylococcus aureus* isolates derived from severe pneumonia: a retrospective monocentre
470 study. *Infect Dis (Lond).* nov 2021;53(11):811-9.
- 471 41. Fernández-Hidalgo N, Ribera A, Larrosa MN, Viedma E, Origüen J, de Alarcón A, et
472 al. Impact of *Staphylococcus aureus* phenotype and genotype on the clinical characteristics and
473 outcome of infective endocarditis. A multicentre, longitudinal, prospective, observational
474 study. *Clin Microbiol Infect.* sept 2018;24(9):985-91.
- 475 42. Park KH, Greenwood-Quaintance KE, Cunningham SA, Rajagopalan G, Chia N,

- 476 Jeraldo PR, et al. Lack of correlation of virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus*
477 bacteremia isolates with mortality. *Microb Pathog.* août 2019;133:103543.
- 478 43. Alagna L, Mancabelli L, Magni F, Chatenoud L, Bassi G, Del Bianco S, et al. Changes
479 in upper airways microbiota in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med Exp.* 2
480 mars 2023;11(1):17.
- 481 44. Meyer S, Gaïa N, Lazarevic V, Schrenzel J, François B, Barraud O, et al. Could daily
482 changes in respiratory microbiota help predicting early *Staphylococcus aureus* ventilator-
483 associated pneumonia? *Intensive Care Med Exp.* 23 juin 2023;11(1):34.
- 484

Table 1: Clinical characteristics between VAP, VAT, respiratory infectious events and colonized patients.

	Colonisation n=41 ¹	Respiratory infectious event n=19 ¹	VAP n=27 ¹	VAT n=16 ¹	Overall N=103 ¹	<i>p-value</i> ²
Sex						0,13
Male	24 (33%)	14 (19%)	23 (32%)	11 (15%)	72 (100%)	
Age	58 [46-68]	66 [60-71]	60 [47-68]	58 [51-67]	60[49-69]	0,2
Reason for ICU admission						
ARDS	5 (56%)	0 (0%)	3 (33%)	1 (11%)	9 (100%)	
COVID-related ARDS	4 (17%)	19 (83%)	0 (0%)	0 (0%)	23 (100%)	
Cardiac arrest	4 (43%)	0 (0%)	3 (43%)	1 (14%)	7 (100%)	
Cardiovascular	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	
Neurologic (other)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	
Other	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	4 (100%)	
Polytrauma	5 (38%)	0 (0%)	3 (23%)	5 (38%)	13 (100%)	
Programmed surgery	3 (60%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	5 (100%)	
Shock	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Spinal cord injury	0 (0%)	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)	
Stroke	7 (47%)	0 (0%)	4 (27%)	4 (27%)	15 (100%)	
Subdural haematoma	1 (33%)	0 (0%)	1 (33%)	1 (33%)	3 (100%)	
TBI	4 (50%)	0 (0%)	3 (38%)	1 (13%)	8 (100%)	
Toxic-metabolic encephalopathy	3 (50%)	0 (0%)	3 (50%)	0 (0%)	6 (100%)	
Culture results						0,2
Polymicrobial	24 (36%)	10 (15%)	22 (33%)	10 (15%)	66 (100%)	
<i>S. aureus</i> alone	17 (46%)	9 (24%)	5 (14%)	6 (16%)	37 (100%)	
Tracheostomy	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	4 (100%)	0,086
Delay from intubation to infectious event	NA	4 [3-6]	4 [3-6]	3,5 [2,25-4]	4 [3-6]	0,4
Unknown	41	0	0	2	43	
Days under MV	9 [7-15]	26 [12-31]	12 [7-24]	10 [8-14]	11 [7-19]	0,015
Death	9 (32%)	10 (36%)	8 (29%)	1 (3,6%)	28 (100%)	0,017

¹ n(%); Median [IQR]

² Fisher's exact test; Kruskal-Wallis rank sum test; Person's Chi-squared test

VAP: Ventilator-Associated Pneumonia; VAT: Ventilator-Associated Tracheobronchitis; ICU: Intensive Care Unit; ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome; COVID: Coronavirus disease; TBI: Traumatic Brain Injury; MV: Mechanical Ventilator; IQR: Interquartile range

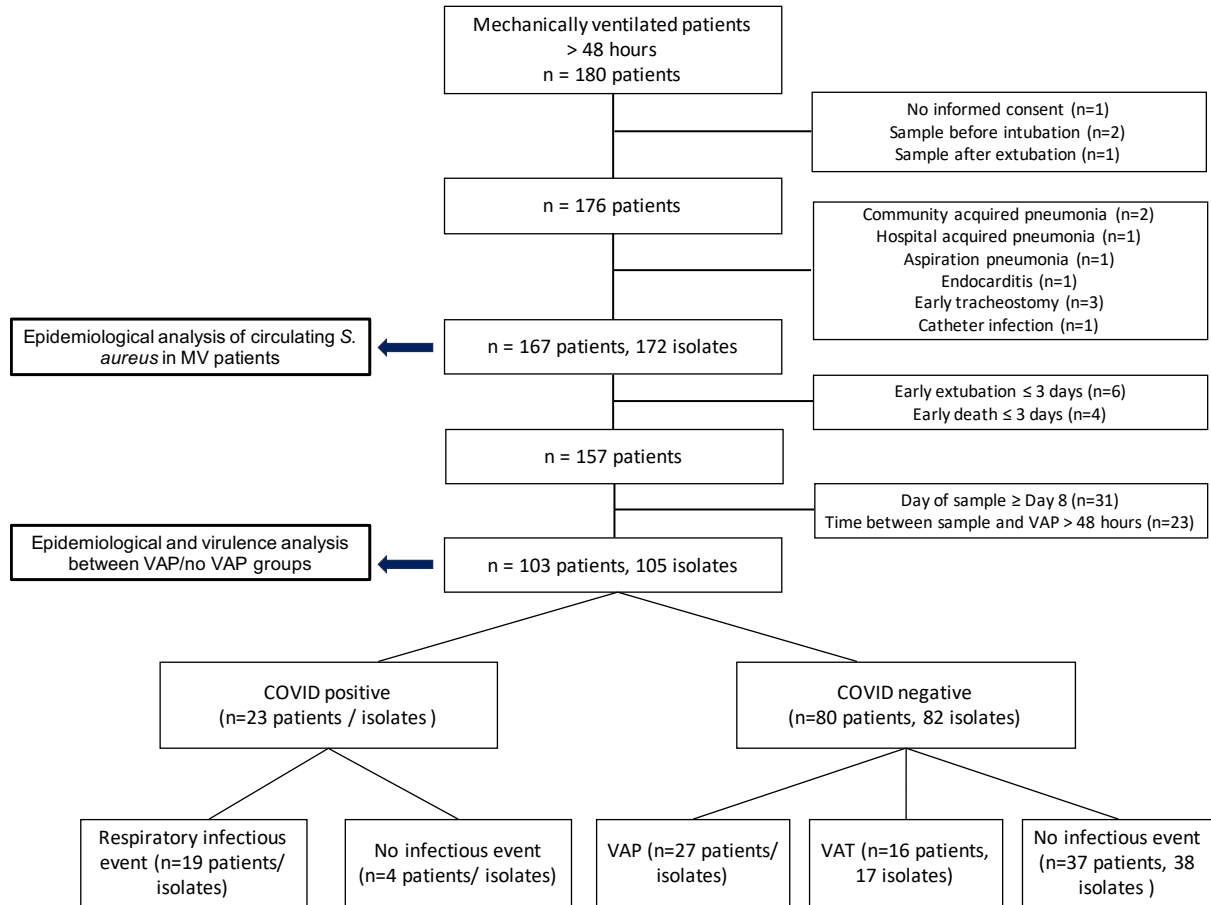


Figure 1: Flow chart of the study

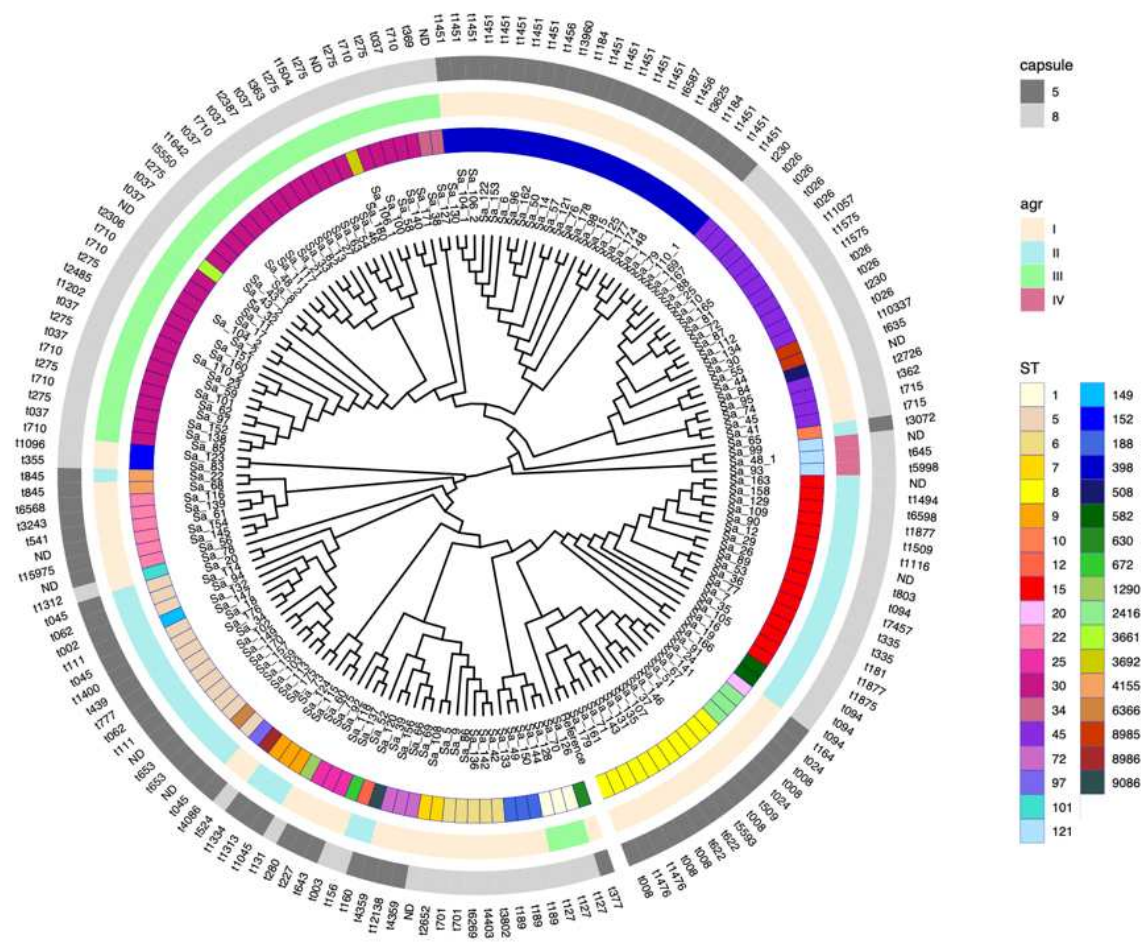


Figure 2: Phylogenetic relationships between *S. aureus* isolates based on WGS SNP differences against reference sequence NC_007795.1.

Isolates are represented based on their ST (inner circle), *agr* type (second circle), capsule type (third circle) and *spa* type (outer circle).

ND: not determined because of unknown *spa* type or WGS assembly difficulties.

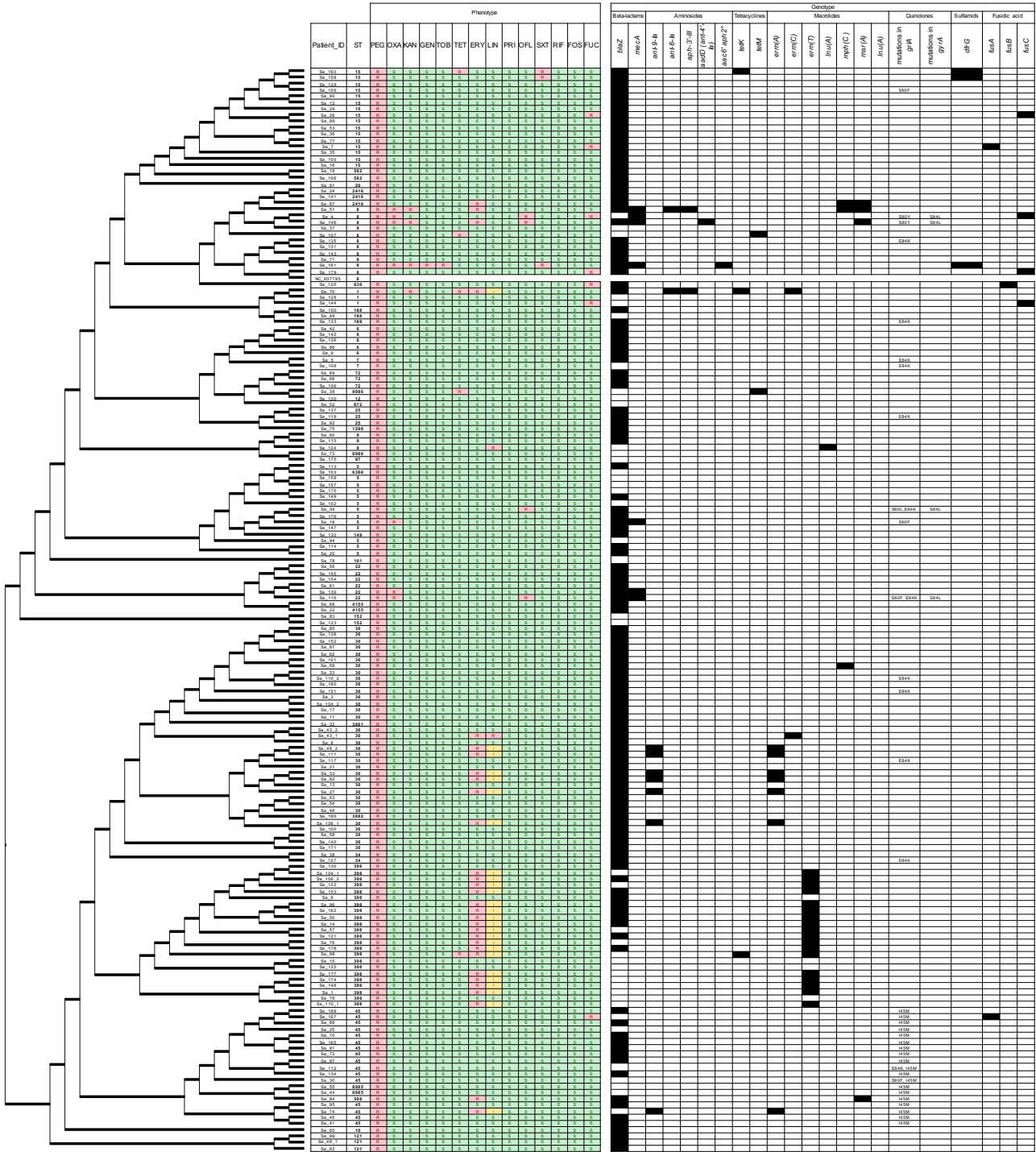


Figure 3: Phenotypic and genomic resistances observed for all *S. aureus* isolates.

Isolates are classified depending on their phylogenetic relationships. Resistances for beta-lactams, aminoglycosides, tetracyclines, macrolides, quinolones, sulfonamids and fusidic acid were detected. Phenotype and genotype were perfectly correlated.

peg: penicillin G, oxa: oxacillin, kan: kanamycin, gen: gentamicin, tob: tobramycin, tet: tetracycline, ery: erythromycin, lin: lincomycin, pri: pristinamycin, ofl: ofloxacin, sxt: sulfamethoxazole + trimethoprim, rif: rifampicin, fos: fosfomicin, fuc: fusidic acid.

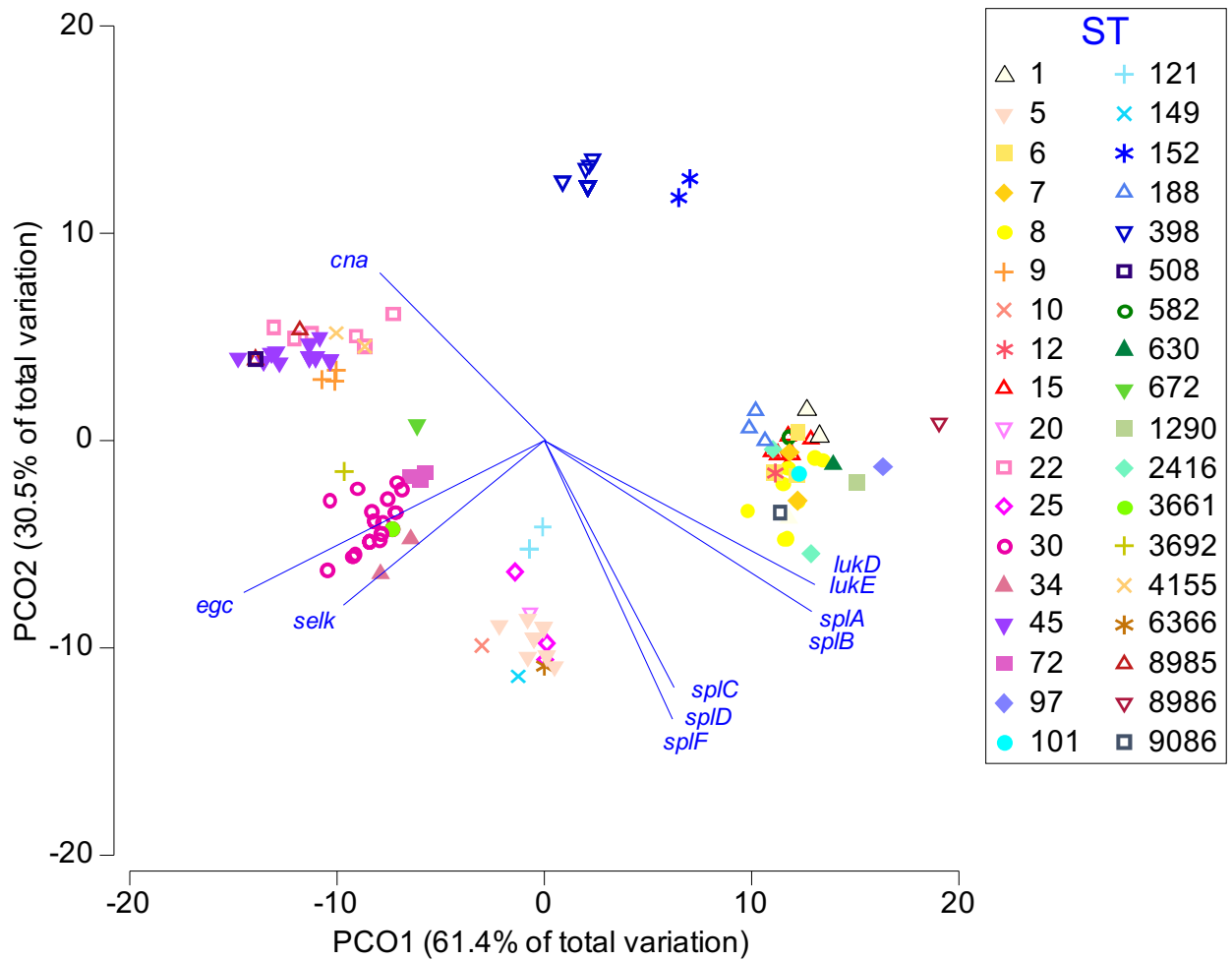
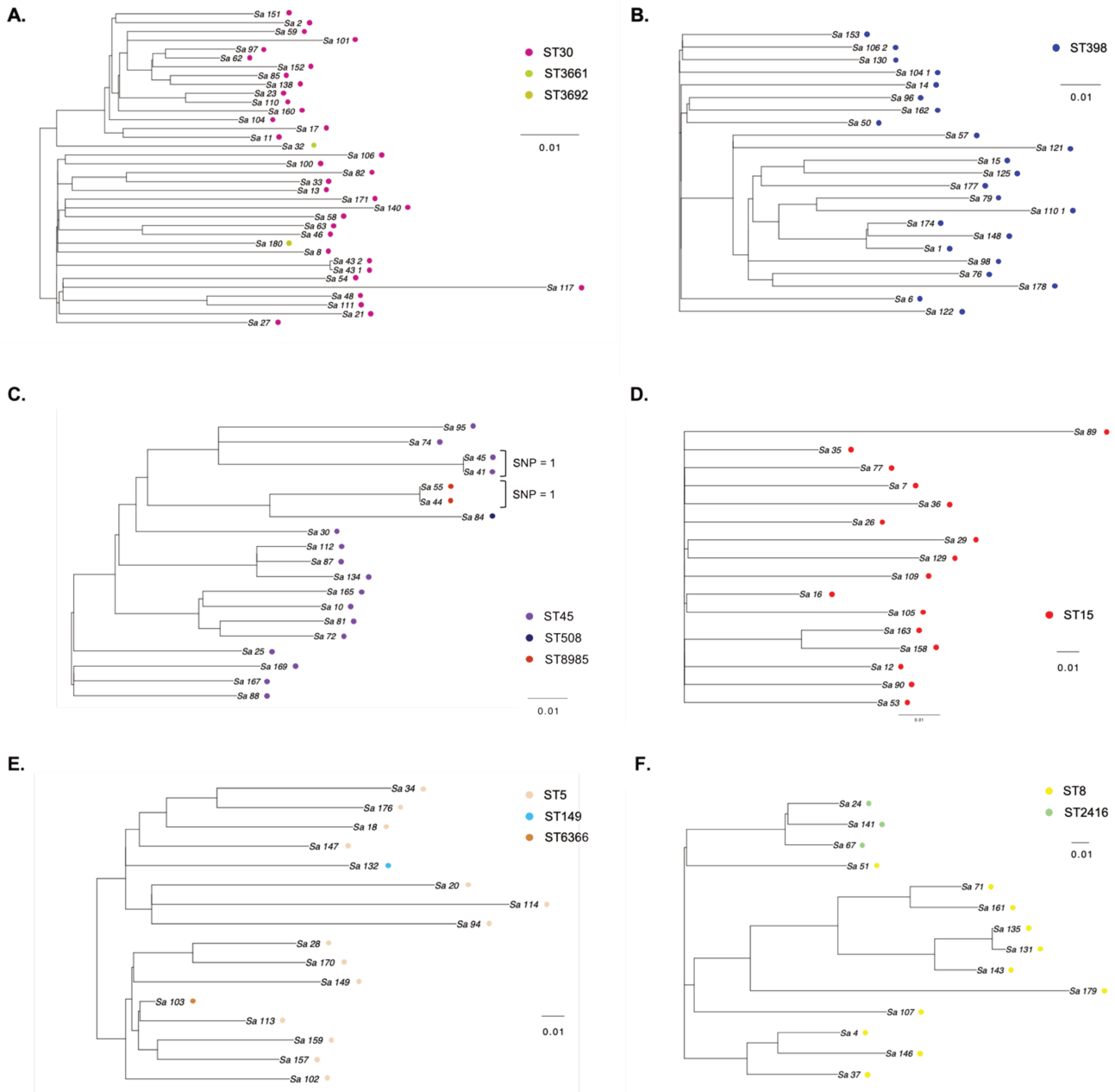


Figure 4: Principal coordinate analysis (PCoA) of virulence factors profiles between isolates based on ST value.

Virulence factors with a Pearson correlation ≥ 0.7 are shown in blue.

cna: collagen binding protein, *egc*: enterotoxin gene cluster, *lukD/lukE*: leucocidin D and E, *selk*: enterotoxin K, *spA-F*: serine protease A to F.

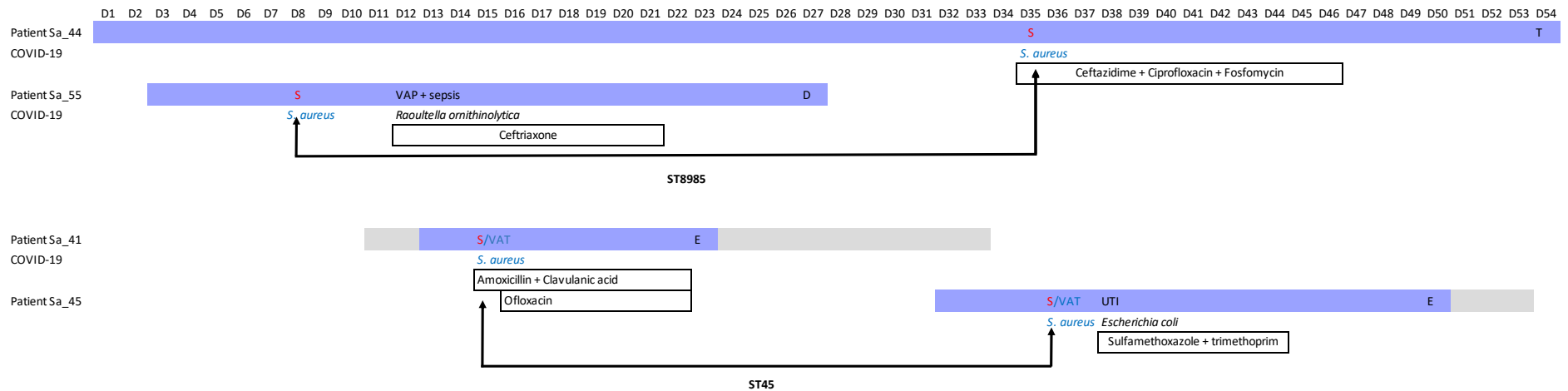
Supplementary materials



Supplementary Figure 1: Phylogenetic relationships between isolates of (A) the clonal complex CC30, (B) CC398, (C) CC45, (D) CC15, (E) CC5, and (F) CC8.

All isolates presented a SNP number above 300 except isolates Sa_41 and Sa_45 of ST45 and isolates Sa_44 and Sa_55 of ST8985.

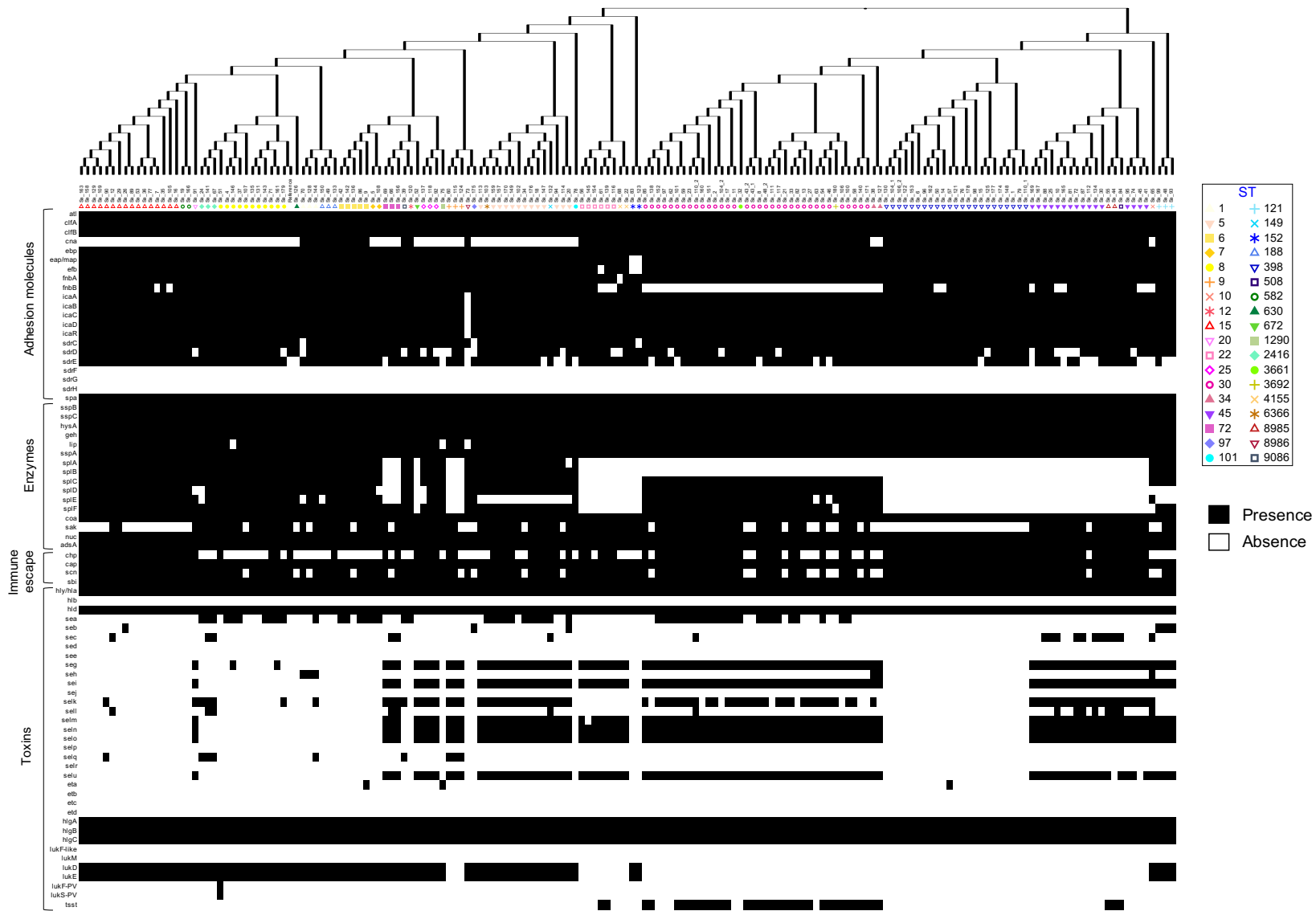
Legend represents the number of substitutions per site.



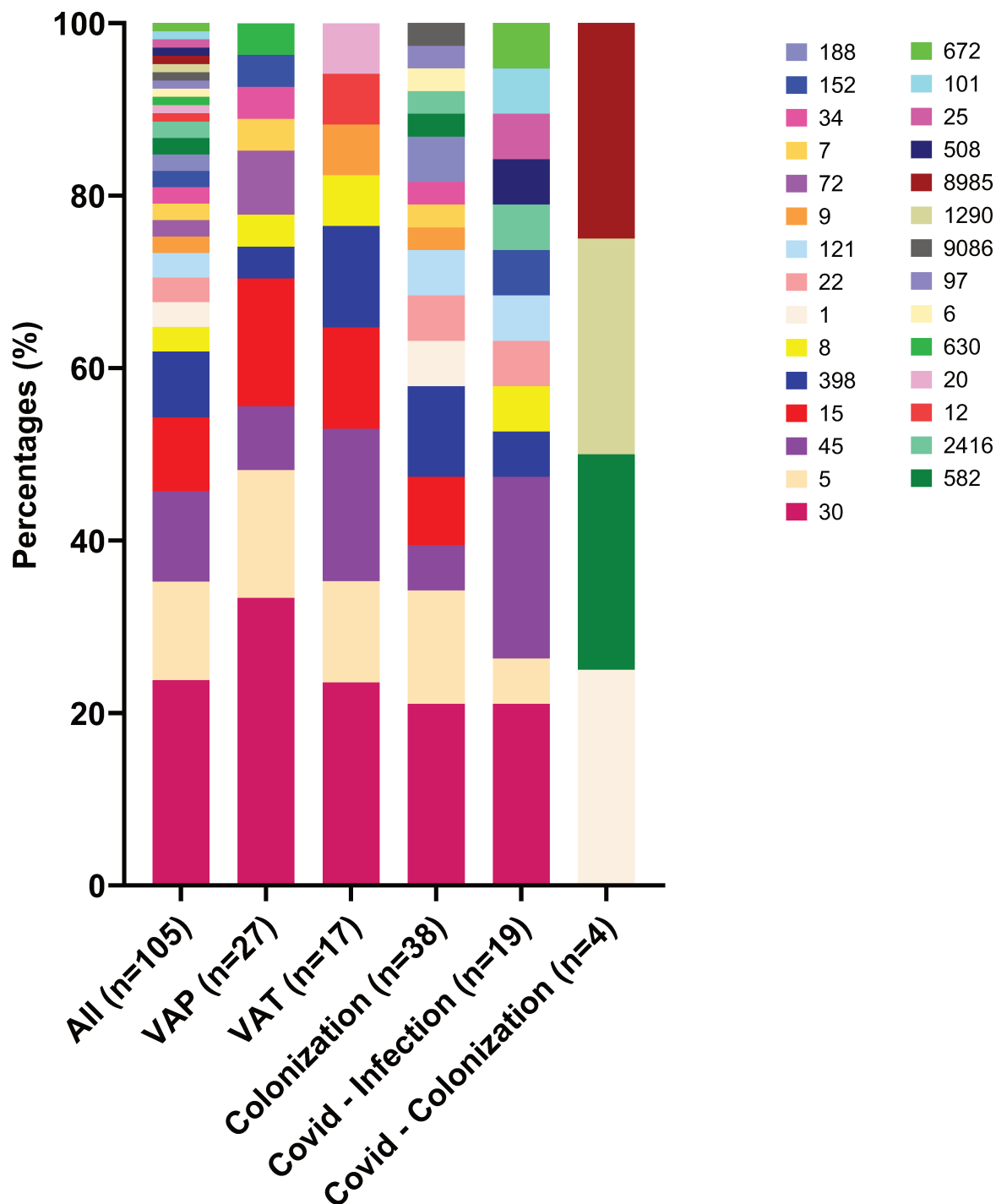
Supplementary Figure 2: Timeline of patients' hospitalization period documented with a respiratory *S. aureus* cross-contamination.

Patients Sa_44 and Sa_55 were colonized with the same *S. aureus* ST8985 clone (1 SNP difference) and were hospitalized at the same time period and in the same ICU sector. Similarly, patients Sa_41 and Sa_45 were colonized with the same *S. aureus* ST45 clone (1 SNP difference). In blue is represented the mechanically ventilated time period in the ICU and in grey the non-mechanically ventilated period in the ICU. Main infectious event and antibiotic therapies were documented on the timeline.

D1 = day 1, D = death, E = extubation, S = first respiratory sample with a *S. aureus* documentation, T = tracheostomy, UTI = urinary tract infection, VAP = ventilator-associated pneumonia, VAT = ventilator-associated tracheobronchitis.



Supplementary Figure 3: Shade plot of the virulence factors profile of each *S. aureus* isolate depending on their phylogenetic relationships.



Supplementary Figure 4: ST repartition depending on patient's respiratory infectious or colonization status during mechanical ventilation.

No differences of ST composition were detected. Colonization profile in COVID-19 patients showed a different profile because of small number of included isolates (n=4).

Discussion générale

L'évolution microbiologique au cours de la VM reste peu comprise dans la littérature actuelle. Peu de données décrivent les déterminants microbiens à l'origine de la transition de l'étape de colonisation vers l'infection. Les différents travaux conduits au cours de ce Doctorat s'inscrivent dans une meilleure compréhension de ces mécanismes. Afin de répondre à notre objectif, nous avons mené trois études distinctes chez le patient intubé-ventilé permettant d'analyser l'évolution du microbiote respiratoire (étude SCORPIUS), l'évolution des paramètres cliniques, microbiologiques et rhéologiques (étude INSPIRE), ainsi que les caractéristiques génomiques des isolats de *S. aureus* isolés de prélèvements respiratoires (étude SSUPREM). L'intégralité de ces résultats va être discuté et comparé à la littérature existante.

1. Impact de la composition et de la cinétique du microbiote respiratoire au cours de la ventilation mécanique

Le microbiote respiratoire évolue grandement au cours de la VM. Son rôle dans le développement d'évènements infectieux n'est pour l'heure pas compris. A la lueur de la bibliographie actuelle, bien que soumise à de nombreux biais, le microbiote respiratoire est profondément modifié par la présence du tube endotrachéal et des pressions partielles en oxygène. Plus la durée de la VM est augmentée, plus la perte de diversité est importante [228,271]. Cela s'explique essentiellement par la perte de certains taxons de la flore trachéale et pulmonaire normale comme les *Streptococcus*, les *Veillonella*, les *Actinomyces*... au profit de bactéries potentiellement pathogènes à croissance plus rapide (*S. aureus*, Enterobacterales, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*...).

Au cours de l'étude SCORPIUS et INSPIRE, nous avons observé des profils de microbiotes différents selon la présence de *S. aureus* et selon le statut infectieux du patient. Les patients non colonisés à *S. aureus* conservaient une quantité de *Streptococcus* élevée au sein de leur microbiote respiratoire (patients 3, 5, 9 et 10), tandis que pour les patients colonisés à *S. aureus*, une perte rapide de la flore respiratoire a été observée jusqu'à atteindre plus de 80% de *S. aureus* (patients 4, 7, 8 et 12). Le microbiote des patients développant une PAVM documentée microbiologiquement à *S. aureus* n'était pas forcément dominé par l'espèce *S. aureus*, mais une forte proportion de bactéries anaérobies était retrouvée telles que les bactéries du genre *Prevotella* (essentiellement *P. melaninogenica* à l'échelle de l'espèce). D'autres bactéries appartenant aux genres *Catonella*, *Howardella* ou *Neisseria* ont

également été retrouvées significativement augmentées dans notre étude mais avec des abondances relatives beaucoup plus faibles, tandis que les abondances relatives des genres *Streptococcus*, *Rothia* ou *Actinomyces* diminuaient rapidement après la mise sous VM. Des résultats similaires ont été retrouvés pour les échantillons séquencés des premiers patients de la cohorte INSPIRE.

Une augmentation des bactéries du genre *Prevotella* a été observée dans l'étude d'Alagna *et al.* publiée de façon conjointe à notre article [272]. Cette étude italienne s'intéressait également au microbiote respiratoire de patients intubés-ventilés avec des caractéristiques similaires à notre population étudiée comme un motif d'admission sur critères neurologiques, une durée de VM courte (7 jours en moyenne), une absence de pathologies infectieuses ou chroniques à l'admission et des critères diagnostiques de PAVM identiques à notre étude. Les résultats de l'analyse du microbiote conduits sur 35 patients (13 PAVM et 22 non-PAVM) et de façon cinétique à J0 et J3 post intubation ont montré une modification importante du microbiote entre J0 et J3 principalement liée à une baisse des genres *Actinomyces*, *Rothia*, *Granulicatella* et *Streptococcus*. De plus, une augmentation significative des *Prevotella 7* ($p=0.024$) a été retrouvée entre les groupes PAVM et non-PAVM dans leur étude. Cependant, aucune information sur la culture microbiologique des échantillons n'était disponible et en particulier sur la présence de *S. aureus*.

Au-delà de cette étude, d'autres travaux de l'équipe de Doré *et al.*, ont décrit en 1996 une augmentation de la présence de bactéries anaérobies (principalement *Prevotella melaninogenica*) par culture microbiologique dans des échantillons de brosse télescopique protégée chez des patients développant une PAVM [273]. Cette même équipe a suggéré que ces bactéries pouvaient être directement responsables de la survenue de la PAVM et ont montré, dans le sérum de ces patients, une présence d'anticorps anti-*Prevotella* plus élevée comparativement à différents témoins [274]. La colonisation par des bactéries du genre *Prevotella* dans les voies respiratoires inférieures pourrait donc être associée à un processus infectieux conduisant à une réponse systémique humorale. Ces auteurs ont également démontré que ces « PAVM à bactéries anaérobies » survenaient plus fréquemment chez les patients avec une sonde d'intubation orotrachéale que nasotrachéale et qu'elles survenaient également plus fréquemment dans les 5 premiers jours post intubation (PAVM précoces). Avec des technologies tout à fait différentes, nos travaux confirment ces résultats. Cela pose néanmoins la question de l'agent pathogène directement responsable de la PAVM et un rôle des bactéries anaérobies dans la physiopathologie n'est pas à exclure (Annexe 2) [275]. Peut-on alors parler de « PAVM à bactéries anaérobies » comme suggéré par cette équipe ? C'est peut-être exagéré surtout au vu du potentiel pathogène de *S. aureus*, mais davantage d'études devront s'intéresser à cette hypothèse dans le futur.

Le microbiote respiratoire des patients évolue différemment en fonction des caractéristiques des patients inclus (motifs d'admission, comorbidités, utilisation d'antibiotiques...) mais également des caractéristiques microbiologiques des échantillons respiratoires. L'augmentation des *Prevotella* observée dans ce contexte n'est pas retrouvée dans d'autres études portant sur les PAVM tardives et/ou causées par des pathogènes différents (*P. aeruginosa*, Enterobacterales...). En effet, les dynamiques de colonisation au niveau respiratoire ne sont pas similaires selon les bactéries, et des coopérations métaboliques différentes sont à supposer entre bactéries pathogènes et bactéries de la flore oro-pharyngée [276]. Peu de données sont disponibles sur ce sujet dans la PAVM mais d'autres modèles respiratoires offrent quelques pistes sur ce sujet.

Dans la rhinosinusite chronique, Lucas *et al.* ont par exemple montré une coopération métabolique positive entre l'espèce *S. aureus* et plusieurs bactéries anaérobies (*Prevotella*, *Fusobacterium*...) [277]. D'autres études portant sur la mucoviscidose ont par exemple avancé un effet bénéfique des *Prevotella* sur la réduction de l'inflammation engendrée par *P. aeruginosa* [278] mais leur rôle reste discuté à l'heure actuelle dans cette pathologie [279]. De façon toute aussi intéressante, une augmentation des bactéries anaérobies (*Prevotella*, *Catonella*, *Fusobacterium*...) et une baisse des genres *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* et *Rothia* ont également été retrouvées au niveau des tumeurs épidermoïdes cutanées de la tête et du cou [280,281]. L'analyse fonctionnelle prédictive à partir des communautés microbiennes a révélé un possible lien entre ces perturbations de microbiote et l'activation de voies pro-inflammatoires locales (voies TLR1 et 4). Segal *et al.* ont également rapporté qu'un microbiote respiratoire sain enrichi en *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella* ou encore *Prevotella* (environ 45% des sujets sains) favorisait l'immunité cellulaire mucoale Th17 de l'hôte avec une réduction de la réponse inflammatoire innée [282]. De façon similaire, Xue *et al.* ont rapporté une association positive entre proportion de *Prevotella* et réponse inflammatoire Th17. Le rôle des bactéries appartenant au genre *Prevotella* apparaît donc ambivalent (rôle tantôt protecteur, tantôt pro-inflammatoire) avec très probablement des disparités en fonction des espèces majoritairement présentes. La comparaison des résultats de microbiote à l'échelle du genre ou d'un rang taxonomique supérieur reste néanmoins une limite importante de la technique de séquençage de l'ADNr16S et doit faire interpréter les résultats obtenus avec la plus grande prudence.

Au cours de l'étude SCORPIUS, nous avons également pu démontrer qu'il était possible de prédire la survenue d'évènements infectieux à partir de la composition du microbiote (analyse CAP), et même uniquement à partir des genres *Prevotella*, *Catonella*, *Neisseria* et *Howardella*. La prédiction du diagnostic de PAVM était excellente un jour avant la survenue de la PAVM, bien qu'elle ait été conduite sur un faible effectif. Emonet *et al.* ont

montré, par la même technique (analyse CAP) une concordance de prédiction de survenue de PAVM tardive beaucoup plus faible au cours de la VM (entre 15 et 65% à partir d'AET). Ces résultats doivent être interprétés avec précaution mais tendent à montrer que la composition du microbiote et son évolution ne sont probablement pas similaires entre PAVM précoces et PAVM tardives et qu'elles sont dépendantes du type de pathogène présent au niveau respiratoire.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons nous poser la question du rôle du microbiote et particulièrement de la flore anaérobie dans la survenue de PAVM. Cette flore n'a été que peu étudiée chez le patient intubé-ventilé, en témoignent les recommandations actuelles de ne pas la rechercher lors d'une culture microbiologique de prélèvements respiratoires. Plusieurs équipes se sont intéressées au rôle de cette flore dans l'homéostasie respiratoire et particulièrement dans le contexte de la mucoviscidose où le nombre de publications et la compréhension des mécanismes physiopathologiques du microbiote respiratoire est beaucoup plus avancée que dans le contexte des PAVM. Par exemple, Lamoureux *et al.* rapportent qu'un taux élevé de *Veillonella* était associé à une meilleure fonction pulmonaire dans cette pathologie. D'autres travaux dans la mucoviscidose ont révélé que la flore anaérobie respiratoire dominante (*Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*) serait capable de dégrader les sucres composant le mucus respiratoire et de fournir ainsi aux autres espèces environnantes des nutriments pour leur propre croissance [276,277,283]. De plus, la présence d'acides gras à chaîne courte (issus du métabolisme fermentaire des sucres par les bactéries anaérobies) en forte concentration engendrerait un relargage de cytokines pro-inflammatoires et un recrutement de PNN [284,285]. Cet effet a été observé de façon bien plus prononcée chez le patient atteint de mucoviscidose que chez le patient sain et un mécanisme similaire pourrait être mis en œuvre chez le patient intubé-ventilé.

Les modifications du microbiote respiratoire observées dans notre étude pourraient donc refléter la présence d'un état inflammatoire avancé. Bien entendu, la question se pose de savoir si la modification du microbiote est une cause ou une conséquence de cet état inflammatoire. A l'heure actuelle, cette question reste en suspens et aucune donnée ne permet encore d'y répondre. Le lien étroit entre l'hôte et le microbiote font qu'il est primordial de prendre en considération à la fois l'immunité locale et l'évolution microbiologique dans la compréhension physiopathologique des événements infectieux du patient intubé-ventilé. Des travaux futurs associant évolution du microbiome et de l'immunome devront être menés en ce sens.

2. Caractérisation et performance diagnostique des paramètres cliniques, microbiologiques et rhéologiques au cours de la ventilation mécanique

Le diagnostic de la PAVM reste difficile en service de Réanimation. La faible performance des outils diagnostics et prédictifs actuels fait que la PAVM est un défi diagnostique majeur. Le score CPIS créé en 1991 par Pugin *et al.* et toujours utilisé au lit du malade n'est pas un bon score de diagnostic. Plusieurs études ont montré sa faible sensibilité et spécificité aux alentours de 60 et 80% respectivement selon les études [89,106,107]. Nous avons retrouvé dans l'étude INSPIRE, des valeurs similaires à la bibliographie.

Le CPIS est basé sur une association de critères cliniques, radiologiques et microbiologiques, qui pris séparément, ont tous des limites importantes. Nous avons par exemple montré que plus de 80% des AET ont un aspect purulent au cours de la VM, et ce qu'importe le statut infectieux du patient. De même la présence de bactéries au-delà du seuil de 10^5 UFC/ml montrait un taux élevé de faux positifs (patients colonisés et non infectés) et de faux négatifs (patients infectés sans documentation microbiologique). Ces critères sont très peu discriminants au vu du fort nombre de patients colonisés au niveau respiratoire et rejoignent les résultats avancés par Garnacho-Montero *et al.* [134].

L'un des problèmes majeurs du CPIS est qu'il est perturbé par différentes pathologies pouvant survenir chez le patient intubé-ventilé. La fièvre, la purulence des AET, la leucocytose ou encore la baisse de la PAO_2/FiO_2 sont autant de facteurs pouvant être perturbés dans d'autres manifestations cliniques infectieuses (sepsis, infection respiratoire virale...) ou non infectieuses (SDRA, atélectasie, pneumothorax...) en Réanimation. Il a également été démontré que le CPIS est encore moins bon pour diagnostiquer une PAVM dans certaines catégories de patients, notamment les patients admis pour polytraumatismes. En effet, Parks *et al.* ont par exemple insisté sur le fait que « le CPIS ne devrait pas être utilisé dans cette catégorie de patients car il ne peut pas différencier de manière fiable une PAVM d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique lié à des facteurs cliniques confondants » [286]. Ces auteurs avancent même que « l'utilisation du CPIS pour déterminer la durée appropriée de traitement antimicrobien dans cette indication est coûteuse et qu'elle pourrait être nocive en prolongeant inutilement l'exposition aux antibiotiques ». Des résultats similaires ont été retrouvés dans d'autres catégories de patients comme les grands-brulés [103]. De la même manière que le microbiote respiratoire évolue différemment dans cette catégorie de patients, le CPIS n'est pas adapté à diagnostiquer efficacement la PAVM dans cette population.

Par ailleurs, les recommandations américaines préconisent, dans le diagnostic microbiologique de la PAVM, l'ajout de points au CPIS en cas de présence de bactéries pathogènes à la coloration de Gram. Certaines études ont montré un intérêt modéré de ce critère [287], mais d'autres travaux justifient sa performance dans la mise en place d'une

antibiothérapie anti-staphylococcique adaptée précoce et d'une réduction de l'antibiothérapie à large spectre [288–290]. Cela demeure néanmoins extrêmement difficile à mettre en évidence. Les faibles sensibilité et spécificité de la coloration de Gram font qu'il est important de trouver de nouveaux outils microbiologiques permettant un diagnostic rapide [66].

Dans l'étude INSPIRE nous avons réalisé une analyse exhaustive de l'évolution microbiologique par culture avec plus de 1500 échantillons collectés et analysés. Nous avons notamment pu mettre en évidence, chez les patients colonisés à *S. aureus*, une augmentation de la charge bactérienne de cette espèce au cours de la VM. En effet, les patients colonisés dès l'entrée présentaient un taux moyen d'un peu moins de 10^4 UFC/ml pour finir à près de 10^6 UFC/ml après 7 jours de VM. Ceci montre que *S. aureus* croît facilement dans les AET des patients colonisés. La formation de biofilm, la perte de diversité microbienne observée au niveau du microbiote respiratoire ou encore certains déterminants métaboliques, inconnus à l'heure actuelle, doivent probablement faciliter sa croissance. De tels résultats n'ont pas été observés pour les deux autres pathogènes d'origine oro-pharyngée que sont *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant ces deux bactéries comme agents responsables de PAVM mais au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que les interactions hôte-pathogène et microbiote-pathogène sont différentes.

Un nombre important d'AET de l'étude INSPIRE retrouvait une culture polymicrobienne. Cela a déjà été observé dans la littérature scientifique [72,291], mais représente une difficulté supplémentaire dans la prise en charge des patients développant une PAVM. En effet, il est difficile de différencier les bactéries colonisant les voies respiratoires de la (ou des) bactérie(s) pathogène(s).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence qu'une augmentation importante des sécrétions trachéales avait lieu un à deux jours avant la survenue de la PAVM dans notre population de patients neurolésés. Ce test a montré une spécificité de 93% mais une sensibilité plus faible de 67%, au-delà d'un seuil de 20mL de sécrétions par jour. Ce signal, bien que réalisé sur une cohorte monocentrique et à faible effectif, s'intègre dans la physiopathologie de la PAVM. En effet, une augmentation du volume de mucus est habituellement observée lors de réponses inflammatoires locales, aiguës ou chroniques [292]. Il s'agit d'un mécanisme de défense face à la croissance bactérienne et à l'inflammation pour piéger et évacuer les bactéries et déchets cellulaires. Nous avons observé qu'une augmentation naturelle du volume de mucus a lieu au cours de la première semaine de VM (de moins de 5ml/jour à J0 jusqu'à près de 20ml/jour à J6), et qui peut s'expliquer par la présence du tube endotrachéal et de l'augmentation croissante de la colonisation bactérienne. Les travaux de Powell *et al.* viennent

corroborer notre résultat. Ces travaux sur le microenvironnement des sécrétions trachéales montraient une augmentation de la quantité, de la viscosité, de l'inflammation médiée par les PNN et de la colonisation par des bactéries pathogènes [293]. Cette augmentation de production de mucine était significativement associée à la durée de VM et à un âge avancé. Dans cette même étude, le mucus des patients intubés-ventilés était également enrichi en ADN double brin et en certaines mucines composant le mucus (augmentation des mucines MUC5B mais pas MUC5AC, qui sont les deux mucines principales du mucus respiratoire). La forte proportion de la mucine MUC5B dans les AET de ces patients perturbait la chimiotaxie des PNN et diminuait la capacité à phagocyter des bactéries telles que *P. aeruginosa*. Ces résultats n'étaient par contre pas observés à partir d'AET de patients tout juste intubés.

Ainsi, une modification fonctionnelle du mucus respiratoire a lieu au cours du temps sous VM, ce qui favorise la croissance bactérienne et affecte la réponse immunitaire. Un potentiel cercle vicieux s'installe alors entre la croissance bactérienne, la réponse inflammatoire et la sécrétion de mucus, qui ne peut plus jouer son rôle épurateur du fait de la perte des réflexes de la toux et de l'ascenseur muco-ciliaire.

Ce signal intéressant de l'augmentation du volume de sécrétion au cours de la VM reste cependant difficile à mettre en œuvre car cela nécessite une équipe médicale et paramédicale dédiée et formée ainsi qu'une logistique importante de jour comme de nuit (respect des temps d'acheminement, des modalités de conservation des échantillons, ...). Le seuil de 20 ml de sécrétion est également critiquable car réalisé sur un faible nombre de patients (10 PAVM). De plus, nous n'avons pas évalué si ce paramètre était influencé par d'autres événements survenant au cours de l'hospitalisation en Réanimation. Au-delà de la définition d'un seuil, une augmentation anormale du volume de sécrétion et/ou de la fréquence d'aspiration doit faire suspecter un événement infectieux respiratoire, et faire rechercher les critères cliniques, radiologiques et microbiologiques de la PAVM.

3. Typage, phylogénie, résistance et virulence des isolats de *S. aureus* retrouvés au niveau respiratoire au cours de la ventilation mécanique

Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la PAVM précoce à *S. aureus* survenant préférentiellement chez le patient intubé-ventilé hospitalisé sur motifs d'admission spécifiques (polytraumatisme, patient neurolésé). Afin de mieux comprendre le rôle de ce pathogène dans la survenue de la TAVM et de la PAVM précoce, nous avons séquencé le génome des isolats de *S. aureus* retrouvés au niveau respiratoire et comparé les caractéristiques génomiques de ces isolats à l'évolution infectieuse.

Nous avons notamment montré que la population respiratoire des isolats était polyclonale avec 36 ST différents identifiés parmi 167 patients intubés-ventilés. Les isolats du ST30, ST5, ST15, ST45 et ST8 étaient majoritaires (54%), ce qui n'est pas surprenant puisque ces ST sont fréquemment retrouvés en portage nasal [11,294]. La colonisation nasale par *S. aureus* est généralement unique mais plusieurs clones peuvent cohabiter [295].

En revanche, la mise en évidence de 23 isolats (13,4%) appartenant au ST398 est beaucoup plus étonnante. Ce ST n'était que très peu retrouvé dans les études de populations de *S. aureus* dans les années 2000s [296]. L'augmentation de l'incidence de colonisation par ce ST continue d'être rapportée dans la littérature, sans que l'on sache exactement pourquoi. Deux clades coexistent provenant soit d'une origine animale (bétail), soit d'une origine humaine [297]. Ces deux clades se distinguent principalement par la résistance à la tétracycline portée par le gène *tetM* et qui est caractéristique du clade animal [298]. Au cours de notre étude nous n'avons pas mis en évidence d'isolats d'origine animale. En revanche, une forte proportion d'isolats présentait une résistance aux macrolides médiée par le gène *erm(T)* [298]. Une virulence plus grande a par ailleurs été mise en évidence dans ce ST par l'acquisition d'un prophage ϕ Sa3 portant notamment des gènes de virulence associés à l'échappement immunitaire (gènes *sak*, *scn* et *chp*) [299,300]. Une surveillance accrue de la dissémination de ce ST est nécessaire pour mieux comprendre sa plasticité génomique et son caractère pathogène.

Une concordance parfaite entre le phénotype de l'antibiogramme et les gènes de résistances présents a été observée, bien que peu de résistances d'intérêt clinique aient été mises en évidence. Un taux bas de SARM (4,1%) comparé à la moyenne nationale (7,6%) a été révélé [122]. Cela confirme l'origine principalement communautaire des isolats via le portage nasal. Le portage nasal de *S. aureus* est un facteur de risque important de développer une PAVM au cours du séjour de Réanimation, mais l'acquisition peut également se faire au cours du séjour à l'instar des deux contaminations inter-individuelles que nous avons pu mettre

en évidence. La transmission de clones de *S. aureus* au sein d'un service de Réanimation est connue et a essentiellement été mise en évidence lors d'épidémies de SARM [259,301,302]. Néanmoins, bien qu'elle ait été très limitée dans notre étude (2,4% des isolats), la transmission de clones au cours du séjour de Réanimation représente un risque important pour le patient. En limitant cette transmission, nous limitons la colonisation et donc le risque de survenue de PAVM. Cela est d'autant plus le cas pour d'autres pathogènes à transmission environnementale comme *P. aeruginosa* [303].

Le WGS est une technique sensible et performante pour détecter les phénotypes de résistance connus mais aussi pour mettre en évidence de nouveaux gènes de résistance. Cependant, il ne remplace pas les méthodes phénotypiques actuelles et demeure complémentaire de celles-ci. En effet, le coût, le temps d'obtention des résultats (plusieurs jours vs 48 heures pour un antibiogramme) et la difficulté de certains *pipeline* bioinformatiques à identifier certaines résistances (mutations chromosomiques conférant une résistance aux fluoroquinolones, variants de gènes *blaZ*...) sont des freins à son utilisation en routine hospitalière [247,304].

Dans une population de 103 patients présentant une documentation microbiologique lors des 7 premiers jours post-intubation, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre la survenue d'évènements infectieux et le typage génomique des souches de *S. aureus* ni avec leurs profils de virulence. Les facteurs de virulence portés par la bactérie ne sont *a priori* pas à l'origine d'évènements infectieux plus fréquents. Néanmoins, nous n'avons étudié qu'un panel de gènes et d'autres déterminants génétiques, non analysés (autres gènes de virulence, phages, ...) ou non connus, peuvent toutefois être impliqués dans cette transition. Cela est cependant peu probable, d'une part puisque les mêmes ST ont été mis en évidence dans les différents groupes au cours de notre étude et, d'autre part, différents modèles pathologiques n'ont également pas mis en évidence de corrélation génomique avec la survenue d'évènements infectieux [305]. Une étude similaire sur un faible nombre d'isolats ne retrouvait pas d'associations entre PAVM et gènes de virulence [306]. Dans les bactériémies, Roe *et al.* n'ont pas non plus mis en évidence de déterminants génétiques (SNP, gènes spécifiques, variants de gènes, nombre de copies de gènes ou combinaisons de gènes) permettant de distinguer les isolats de portage des isolats responsables d'évènements infectieux [307].

Ainsi, le développement de nouvelles thérapies doit prendre en considération ces résultats dans la lutte contre la survenue de PAVM. Des anticorps ciblant des protéines universelles doivent par exemple être développés à l'instar du suvratoxumab ciblant l'alpha toxine (codé par le gène *hla*) de *S. aureus* pour pouvoir cibler tous les différents types d'isolats [265]. Au regard des résultats précédents, l'absence de spécificité génomique des isolats

responsables de PAVM démontre également que d'autres facteurs microbiologiques clefs sont impliqués dans la survenue de PAVM tels que le microbiote respiratoire.

4. Synthèse des résultats et hypothèse physiopathologique

Après avoir présenté les différents résultats de nos travaux et avoir comparé ces résultats à la bibliographie existante, nous proposons une hypothèse physiopathologique qu'il conviendra d'étudier par la suite (Figure 32). De la même manière que ce que nous avons retrouvé dans la PAVM, la mucoviscidose ou dans d'autres pathologies respiratoires, nous pensons qu'un cercle vicieux se met en place au cours de la VM. En effet, les poumons ne sont pas adaptés à la présence du TE qui demeure une procédure invasive et perturbe l'écosystème local en particulier par la translocation de bactéries potentiellement pathogènes depuis l'oropharynx (*S. aureus*, ...). La VM engendre également l'apparition de microaspirations dans les voies pulmonaires inférieures et de microlésions de la trachée (voire de l'épithélium pulmonaire) facilitant une réponse inflammatoire locale. De plus, les disparitions des réflexes de la toux et de l'ascenseur muco-ciliaire vont à l'encontre de la physiologie pulmonaire et empêchent l'élimination des sécrétions.

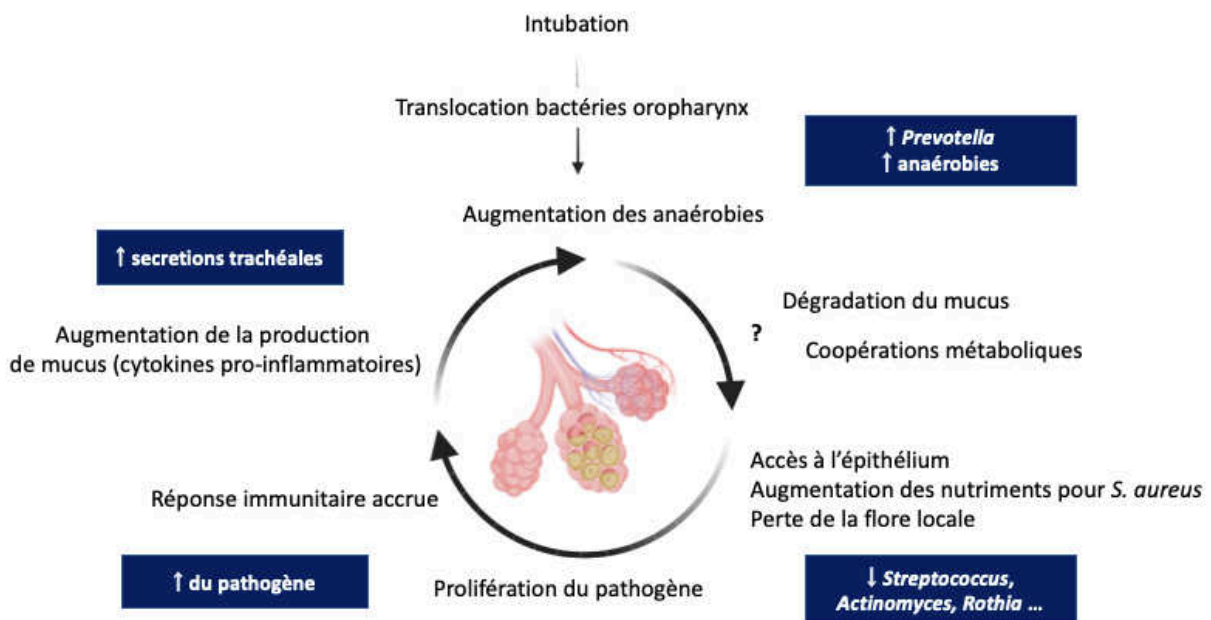


Figure 32 : Synthèse des résultats obtenus au cours de nos travaux et proposition d'une hypothèse physiopathologique

La perturbation locale du microbiote liée aux microaspirations répétées engendre une dysbiose locale qui pourrait promouvoir la réponse inflammatoire et faciliterait la mise à disposition de nutriments aux bactéries par la dégradation des sucres composant les mucus. La prolifération des bactéries locales engendrerait une réponse inflammatoire accrue qui serait responsable de la surproduction de mucus (augmentation du volume de sécrétion), contribuant à l'instauration d'une atmosphère anaérobie locale et à l'augmentation des nutriments mis à disposition des bactéries.

Ce cercle vicieux reste cependant soumis à de nombreuses variables qu'il conviendra d'étudier comme les voies métaboliques qui existent entre les bactéries retrouvées au niveau trachéal, mais également les voies immunitaires responsables de l'augmentation des sécrétions.

Perspectives

A la lueur de nos résultats obtenus durant ce doctorat, de nombreuses questions se posent encore ou doivent être confirmées. La physiopathologie de la PAVM précoce est compliquée et multifactorielle. Il est certain que cette compréhension passe par la mise en place d'études multicentriques et prospectives incluant des patients les plus homogènes possibles en termes de profils cliniques et microbiologiques pour limiter le nombre de variables, ce qui n'a été que peu réalisé jusqu'à présent dans les études portant sur le microbiote respiratoire dont l'exploration est, rappelons-le, assez jeune. Puis, dans un second temps, il faudra valider ces résultats sur des populations de patients aux profils plus adaptés à la réalité d'un service de Réanimation : patients ayant reçu des antibiotiques, patients polyopathologiques, motifs d'admission différents... De telles études doivent être notamment envisagées pour mieux évaluer la performance analytique du volume de sécrétion ou encore de la cinétique du microbiote respiratoire.

D'un point de vue plus fondamental, le développement de qPCR ciblant spécifiquement les genres et/ou espèces bactériennes d'intérêt (*Prevotella*, *Staphylococcus*, *Catonella*...) pourrait par exemple permettre de développer un outil plus rapide, plus pratique et moins cher pour évaluer les proportions de ces bactéries dans un échantillon respiratoire. Un ratio entre les quantités de *Prevotella* et de *Staphylococcus* rapporté à la quantité du gène codant l'ARNr16S total obtenus par des qPCR spécifiques pourrait permettre de mieux suivre et quantifier ces variations bactériennes au cours du temps. De précédentes études ont déjà développé de tels outils ciblant les pathogènes principaux retrouvés dans les voies respiratoires (*Enterobacterales*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*...), mais aucune étude ne s'est intéressée à l'évolution de la flore anaérobie par qPCR dans la PAVM [96,308]. Une meilleure compréhension de la diminution de certains taxons potentiellement protecteurs comme les *Rothia*, *Streptococcus* ou *Actinomyces* pourrait également permettre de développer des algorithmes de risque microbiologiques, voire peut-être d'envisager de nouvelles thérapies probiotiques plus adaptées à la physiologie pulmonaire. Enfin, des études *in vitro* dans un modèle mimant l'environnement respiratoire pourrait permettre d'observer les interactions bactériennes voire les interactions bactéries-hôte dans un modèle cellulaire d'épithélium respiratoire [309,310].

Pour tester notre hypothèse scientifique (Figure 32), il conviendrait de doser directement sur des échantillons respiratoires, un panel de métabolites d'intérêts. Villarreal *et al.* ont par exemple développé un protocole permettant le dosage des acides gras à chaîne courte sur matrice respiratoire [311]. D'autres équipes ont proposé des protocoles de quantification des cytokines et des principaux facteurs ou cellules de la réponse immunitaire

dans le poumon par cytométrie en flux [312–314]. La quantification des types de mucines ou de leur intégrité peut également être une piste intéressante pour confirmer l'augmentation de certains types de mucines, des kits de dosage par technique ELISA ciblant les mucines MUC5B et MUC5AC (majoritaires au niveau respiratoire) existent par exemple dans le commerce [315]. Enfin le dosage de composés issus de la dégradation des mucines (acides sialiques, fucose, N-acétylgalactosamine...) pourrait permettre de mesurer le niveau de dégradation du mucus par les bactéries ou la réponse inflammatoire [316].

Au-delà de la PAVM à *S. aureus*, des études similaires devraient être conduites pour évaluer l'évolution microbiologique des patients colonisés à *Enterobacterales* ou à *Pseudomonas aeruginosa* au niveau respiratoire. Ces bactéries posent également de nombreux challenges diagnostiques et thérapeutiques puisque le taux de bactéries résistantes aux antibiotiques est plus élevé que pour *S. aureus* ou d'autres bactéries de la flore oropharyngée.

Conclusion

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce Doctorat nous a permis de mieux comprendre l'évolution du microbiote respiratoire et des caractéristiques microbiologiques au cours de la VM. Nous avons notamment exploré l'impact de l'évolution du microbiote, de la culture microbiologique ou encore de la composition du génome bactérien sur l'apparition éventuelle d'une PAVM. Nos différents travaux ont notamment permis de révéler que l'évolution microbiologique du patient intubé-ventilé était très hétérogène, d'où la nécessité de suivre de façon cinétique chaque patient tout au long de la période d'intubation.

De plus, nous avons mis en évidence, lors des premiers jours de VM, une augmentation de certaines bactéries anaérobies de la flore oro-pharyngée concomitante au développement d'une PAVM précoce à *S. aureus*. Cette augmentation peut être le reflet d'une inflammation pulmonaire excessive avec, pour corolaire, une augmentation importante de la sécrétion de mucus telle que nous l'avons décrit. A la lueur de ces résultats, nous avons pu émettre une nouvelle hypothèse physiopathologique qu'il conviendra dorénavant d'étudier. Nous pensons qu'un cercle vicieux lié à la surproduction de mucus entraîne une réponse inflammatoire excessive qui favoriserait la transition de la trachéobronchite vers la pneumopathie, comme cela a pu être mis en évidence dans d'autres pathologies respiratoires.

L'exploration des caractéristiques génomiques d'isolats de *S. aureus* retrouvés lors de colonisation, de TAVM ou de PAVM a permis de révéler une population polyclonale mais n'a pas permis de mettre en évidence de déterminants génomiques différenciant le continuum colonisation-infection. Ce résultat renforce également notre hypothèse selon laquelle d'autres déterminants microbiologiques (tels que le microbiote respiratoire) et immunologiques seraient impliqués dans la survenue de la PAVM.

Ainsi, les futures études conduites chez le patient intubé-ventilé doivent prendre en considération les déterminants cliniques (motif d'admission, comorbidités, ...), microbiologiques (culture, microbiote respiratoire, importance du pathogène identifié), immunologiques (statut immunitaire, réponses inflammatoires, cytokines, ...) et métaboliques (dosage des produits issus du métabolisme bactérien, cellulaire et immunitaire) et ce de façon cinétique, afin de mieux comprendre la transition de la colonisation vers l'infection.

Références bibliographiques

1. Vincent JL, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, Machado FR, Marshall JC, *et al.* Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA*. 21 avr 2020;323(15):1478-87.
2. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*. 24 févr 2006;124(4):715-27.
3. Diaconu O, Sîriopol I, Poloşanu LI, Grigoraş I. Endotracheal Tube Biofilm and its Impact on the Pathogenesis of Ventilator-Associated Pneumonia. *J Crit Care Med*. 1 avr 2018;4(2):50-5.
4. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*. avr 2015;45(4):1150-62.
5. Klainer AS, Turndorf H, Wu WH, Maewal H, Allender P. Surface alterations due to endotracheal intubation. *Am J Med*. mai 1975;58(5):674-83.
6. Puyo CA, Peruzzi D, Earhart A, Roller E, Karanikolas M, Kollef MH, *et al.* Endotracheal tube-induced sore throat pain and inflammation is coupled to the release of mitochondrial DNA. *Mol Pain*. 2017;13:1744806917731696.
7. Brodsky MB, Levy MJ, Jedlanek E, Pandian V, Blackford B, Price C, *et al.* Laryngeal Injury and Upper Airway Symptoms After Oral Endotracheal Intubation With Mechanical Ventilation During Critical Care: A Systematic Review*. *Crit Care Med*. déc 2018;46(12):2010.
8. Sibley SR, Ball IM, D'Arsigny CL, Drover JW, Erb JW, Galvin IM, *et al.* Airway injury from the presence of endotracheal tubes and the association with subglottic secretion drainage: a prospective observational study. *Can J Anesth Can Anesth*. 1 déc 2022;69(12):1507-14.
9. Velly L, Pellegrini L. Comment je choisis ma sonde d'intubation en réanimation ? *Prat En Anesth Réanimation*. 1 oct 2013;17(5):260-5.
10. Rocha LA, Marques Ribas R, da Costa Darini AL, Gontijo Filho PP. Relationship between nasal colonization and ventilator-associated pneumonia and the role of the environment in transmission of *Staphylococcus aureus* in intensive care units. *Am J Infect Control*. déc 2013;41(12):1236-40.
11. Paling FP, Wolkewitz M, Bode LGM, Klein Klouwenberg PMC, Ong DSY, Depuydt P, *et al.* *Staphylococcus aureus* colonization at ICU admission as a risk factor for developing *S. aureus* ICU pneumonia. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. janv 2017;23(1):49.e9-49.e14.
12. Timmermann A, Russo SG, Eich C, Roessler M, Braun U, Rosenblatt WH, *et al.* The out-of-hospital esophageal and endobronchial intubations performed by emergency physicians. *Anesth Analg*. mars 2007;104(3):619-23.
13. Hernandez Padilla AC, Trampont T, Lafon T, Daix T, Cailloce D, Barraud O, *et al.* Is prehospital endobronchial intubation a risk factor for subsequent ventilator associated pneumonia? A retrospective analysis. *PLoS ONE*. 23 mai 2019;14(5):e0217466.

14. Baumann L, Harper K, Riblet N, Hatton C, Atchinson PR, Roginski M. Ventilator-associated pneumonia and intubation location in adults with traumatic injuries: Systematic review and meta-analysis. *J Trauma Acute Care Surg.* oct 2022;93(4):e130.
15. Mohr NM, Harland KK, Skeete D, Pearson K, Choi K. Duration of prehospital intubation is not a risk factor for development of early ventilator-associated pneumonia. *J Crit Care.* 1 août 2014;29(4):539-44.
16. Sottile FD, Marrie TJ, Prough DS, Hobgood CD, Gower DJ, Webb LX, *et al.* Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. *Crit Care Med.* avr 1986;14(4):265-70.
17. Larson E. Bacterial colonization of tracheal tubes of patients in a surgical intensive care unit. *Nurs Res.* 1970;19(2):122-8.
18. Inglis TJ, Millar MR, Jones JG, Robinson DA. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol.* sept 1989;27(9):2014-8.
19. Perkins SD, Woeltje KF, Angenent LT. Endotracheal tube biofilm inoculation of oral flora and subsequent colonization of opportunistic pathogens. *Int J Med Microbiol IJMM.* nov 2010;300(7):503-11.
20. Wilson A, Gray D, Karakiozis J, Thomas J. Advanced endotracheal tube biofilm stage, not duration of intubation, is related to pneumonia. *J Trauma Acute Care Surg.* avr 2012;72(4):916-23.
21. Adair CG, Gorman SP, Feron BM, Byers LM, Jones DS, Goldsmith CE, *et al.* Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* oct 1999;25(10):1072-6.
22. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, *et al.* Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care.* 2012;16(3):R93.
23. Danin PE, Girou E, Legrand P, Louis B, Fodil R, Christov C, *et al.* Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects. *Respir Care.* janv 2015;60(1):21-9.
24. Inglis TJ, Jones JG, Paxton S. Penetration of an aerosol, produced by film atomization, through the carinal bifurcation. *Br J Anaesth.* mai 1993;70(5):527-31.
25. Maldiney T, Pineau V, Neuwirth C, Ouzen L, Eberl I, Jeudy G, *et al.* Endotracheal tube biofilm in critically ill patients during the COVID-19 pandemic : description of an underestimated microbiological compartment. *Sci Rep.* 27 déc 2022;12(1):22389.
26. Thorarinsdottir HR, Kander T, Holmberg A, Petronis S, Klarin B. Biofilm formation on three different endotracheal tubes: a prospective clinical trial. *Crit Care.* 29 juin 2020;24:382.
27. Raad II, Mohamed JA, Reitzel RA, Jiang Y, Dvorak TL, Ghannoum MA, *et al.* The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. *Biomaterials.* avr 2011;32(11):2689-94.
28. Kurmoo Y, Hook AL, Harvey D, Dubern JF, Williams P, Morgan SP, *et al.* Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of

bacterial infections. *Biomater Sci.* 7 mars 2020;8(5):1464-77.

29. Klompas M, Branson R, Cawcutt K, Crist M, Eichenwald EC, Greene LR, *et al.* Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia, ventilator-associated events, and nonventilator hospital-acquired pneumonia in acute-care hospitals: 2022 Update. *Infect Control Hosp Epidemiol.* juin 2022;43(6):687-713.
30. Garrouste-Orgeas M, Chevret S, Arlet G, Marie O, Rouveau M, Popoff N, *et al.* Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* nov 1997;156(5):1647-55.
31. Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med.* juin 1992;20(6):740-5.
32. Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Chopin C. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med.* févr 1998;26(2):301-8.
33. Jones DJ, Munro CL, Grap MJ. Natural history of dental plaque accumulation in mechanically ventilated adults: a descriptive correlational study. *Intensive Crit Care Nurs.* déc 2011;27(6):299-304.
34. Sachdev M, Ready D, Brealey D, Ryu J, Bercades G, Nagle J, *et al.* Changes in dental plaque following hospitalisation in a critical care unit: an observational study. *Crit Care Lond Engl.* 4 sept 2013;17(5):R189.
35. Scannapieco FA, Ho AW. Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Periodontol.* janv 2001;72(1):50-6.
36. Pirrone M, Pinciroli R, Berra L. Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. *Curr Opin Infect Dis.* avr 2016;29(2):160-6.
37. Sands KM, Twigg JA, Lewis MAO, Wise MP, Marchesi JR, Smith A, *et al.* Microbial profiling of dental plaque from mechanically ventilated patients. *J Med Microbiol.* févr 2016;65(2):147-59.
38. Hamilton VA, Grap MJ. The role of the endotracheal tube cuff in microaspiration. *Heart Lung J Crit Care.* 2012;41(2):10.1016/j.hrtlng.2011.09.001.
39. Smulders K, van der Hoeven H, Weers-Pothoff I, Vandenbroucke-Grauls C. A randomized clinical trial of intermittent subglottic secretion drainage in patients receiving mechanical ventilation. *Chest.* mars 2002;121(3):858-62.
40. Vallés J, Artigas A, Rello J, Bonsoms N, Fontanals D, Blanch L, *et al.* Continuous aspiration of subglottic secretions in preventing ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med.* 1 févr 1995;122(3):179-86.
41. Rello J, Soñora R, Jubert P, Artigas A, Rué M, Vallés J. Pneumonia in intubated patients: role of respiratory airway care. *Am J Respir Crit Care Med.* juill 1996;154(1):111-5.
42. Rezoagli E, Cressoni M, Bellani G, Grasselli G, Pesenti AM, Kolobow T, *et al.* Prevention of Lung Bacterial Colonization With a Leak-Proof Endotracheal Tube Cuff: An Experimental Animal Study. *Respir Care.* sept 2019;64(9):1031-41.

43. Maertens B, Lin F, Chen Y, Rello J, Lathyris D, Blot S. Effectiveness of Continuous Cuff Pressure Control in Preventing Ventilator-Associated Pneumonia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Crit Care Med.* oct 2022;50(10):1430.
44. Torres A, El-Ebiary M, Soler N, Montón C, Fàbregas N, Hernández C. Stomach as a source of colonization of the respiratory tract during mechanical ventilation: association with ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* août 1996;9(8):1729-35.
45. Kostadima E, Kaditis AG, Alexopoulos EI, Zakynthinos E, Sfyras D. Early gastrostomy reduces the rate of ventilator-associated pneumonia in stroke or head injury patients. *Eur Respir J.* 1 juill 2005;26(1):106-11.
46. Metheny NA, Clouse RE, Chang YH, Stewart BJ, Oliver DA, Kollef MH. Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critically ill tube-fed patients: Frequency, outcomes, and risk factors. *Crit Care Med.* avr 2006;34(4):1007-15.
47. Kearns PJ, Chin D, Mueller L, Wallace K, Jensen WA, Kirsch CM. The incidence of ventilator-associated pneumonia and success in nutrient delivery with gastric versus small intestinal feeding: a randomized clinical trial. *Crit Care Med.* juin 2000;28(6):1742-6.
48. Nseir S, Zerimech F, Fournier C, Lubret R, Ramon P, Durocher A, *et al.* Continuous control of tracheal cuff pressure and microaspiration of gastric contents in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 nov 2011;184(9):1041-7.
49. Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, Morar R, Mahomed AG, *et al.* The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J.* 1 mars 1999;13(3):546-51.
50. Jeffrey M, Denny KJ, Lipman J, Conway Morris A. Differentiating infection, colonisation, and sterile inflammation in critical illness: the emerging role of host-response profiling. *Intensive Care Med.* juill 2023;49(7):760-71.
51. Keane S, Vallecoccia MS, Nseir S, Martin-Loeches I. How Can We Distinguish Ventilator-Associated Tracheobronchitis from Pneumonia? *Clin Chest Med.* 1 déc 2018;39(4):785-96.
52. Rouby JJ, Martin De Lassale E, Poete P, Nicolas MH, Bodin L, Jarlier V, *et al.* Nosocomial bronchopneumonia in the critically ill. Histologic and bacteriologic aspects. *Am Rev Respir Dis.* oct 1992;146(4):1059-66.
53. Craven DE, Hudcova J, Lei Y. Diagnosis of Ventilator-Associated Respiratory Infections (VARI): Microbiologic Clues for Tracheobronchitis (VAT) and Pneumonia (VAP). *Clin Chest Med.* sept 2011;32(3):547-57.
54. Martin-Loeches I, Nseir S, Valles J, Artigas A. From ventilator-associated tracheobronchitis to ventilator-associated pneumonia. *Réanimation.* 1 mai 2013;22(3):231-7.
55. Martin-Loeches I, Pova P, Rodríguez A, Curcio D, Suarez D, Mira JP, *et al.* Incidence and prognosis of ventilator-associated tracheobronchitis (TAVeM): a multicentre, prospective, observational study. *Lancet Respir Med.* nov 2015;3(11):859-68.
56. Torres A, Valencia M. Does ventilator-associated tracheobronchitis need antibiotic treatment? *Crit Care Lond Engl.* juin 2005;9(3):255-6.
57. Karvouniaris M, Makris D, Manoulakas E, Zygoulis P, Mantzaris K, Triantaris A, *et al.*

Ventilator-associated tracheobronchitis increases the length of intensive care unit stay. *Infect Control Hosp Epidemiol.* août 2013;34(8):800-8.

58. Nseir S, Di Pompeo C, Pronnier P, Beague S, Onimus T, Saulnier F, *et al.* Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *Eur Respir J.* déc 2002;20(6):1483-9.

59. Nseir S, Di Pompeo C, Soubrier S, Lenci H, Delour P, Onimus T, *et al.* Effect of ventilator-associated tracheobronchitis on outcome in patients without chronic respiratory failure: a case-control study. *Crit Care Lond Engl.* juin 2005;9(3):R238-245.

60. Martin-Loeches I, Pova P, Nseir S. Ventilator associated tracheobronchitis and pneumonia: one infection with two faces. *Intensive Care Med.* 2023;49(8):996-9.

61. Agrafiotis M, Siempos II, Falagas ME. Frequency, prevention, outcome and treatment of ventilator-associated tracheobronchitis: systematic review and meta-analysis. *Respir Med.* mars 2010;104(3):325-36.

62. Nseir S, Favory R, Jozefowicz E, Decamps F, Dewavrin F, Brunin G, *et al.* Antimicrobial treatment for ventilator-associated tracheobronchitis: a randomized, controlled, multicenter study. *Crit Care Lond Engl.* 2008;12(3):R62.

63. Craven DE, Chroneou A, Zias N, Hjalmarson KI. Ventilator-associated tracheobronchitis: the impact of targeted antibiotic therapy on patient outcomes. *Chest.* févr 2009;135(2):521-8.

64. Palmer LB, Rello J. Is There a Role for Inhaled Antibiotics in the Treatment of Ventilator-Associated Infections? *Semin Respir Crit Care Med.* juin 2017;38(3):359-70.

65. Maskin LP, Setten M, Rodríguez PO, Bonelli I, Attie S, Stryjewski ME, *et al.* Inhaled colistimethate sodium in ventilator-associated tracheobronchitis due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* févr 2015;45(2):199-200.

66. Papazian L, Klompas M, Luyt CE. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):888-906.

67. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 févr 2005;171(4):388-416.

68. Clavier T, Lefevre-Scelles A, Veber B. Pneumopathie acquise en Réanimation : que faut-il chercher et traiter en dehors de l'infection bactérienne ? *MAPAR.* 2015;

69. Shorr AF, Ilges DT, Micek ST, Kollef MH. The importance of viruses in ventilator-associated pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 29 sept 2022;1-6.

70. Suetens C, Savey A, Lepape A, Morales I, Carlet J, Fabry J. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation : vers une approche consensuelle en Europe Surveillance of nosocomial infections in intensive care units: towards a consensual approach in Europe. *Réanimation.* mai 2003;12(3):205-13.

71. Tejerina E, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Frutos-Vivar F, Aramburu J, Ballesteros D, *et al.* Accuracy of clinical definitions of ventilator-associated pneumonia: comparison with autopsy findings. *J Crit Care.* mars 2010;25(1):62-8.

72. Fàbregas N, Torres A, El-Ebiary M, Ramírez J, Hernández C, González J, *et al.* Histopathologic and microbiologic aspects of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology*. avr 1996;84(4):760-71.
73. Wermert D, Marquette CH, Copin MC, Wallet F, Fraticelli A, Ramon P, *et al.* Influence of Pulmonary Bacteriology and Histology on the Yield of Diagnostic Procedures in Ventilator-Acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. juill 1998;158(1):139-47.
74. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, *et al.* International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Eur Respir J*. sept 2017;50(3):1700582.
75. Griffith DM, Lewis S, Rossi AG, Rennie J, Salisbury L, Merriweather JL, *et al.* Systemic inflammation after critical illness: relationship with physical recovery and exploration of potential mechanisms. *Thorax*. 1 sept 2016;71(9):820-9.
76. Knight PH, Maheshwari N, Hussain J, Scholl M, Hughes M, Papadimos TJ, *et al.* Complications during intrahospital transport of critically ill patients: Focus on risk identification and prevention. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2015;5(4):256-64.
77. Claessens YE, Debray MP, Tubach F, Brun AL, Rammaert B, Hausfater P, *et al.* Early Chest Computed Tomography Scan to Assist Diagnosis and Guide Treatment Decision for Suspected Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 oct 2015;192(8):974-82.
78. Dessajan J, Timsit JF. Impact of Multiplex PCR in the Therapeutic Management of Severe Bacterial Pneumonia. *Antibiotics*. 18 janv 2024;13(1):95.
79. Luna CM, Sarquis S, Niederman MS, Sosa FA, Otaola M, Bailleau N, *et al.* Is a strategy based on routine endotracheal cultures the best way to prescribe antibiotics in ventilator-associated pneumonia? *Chest*. juill 2013;144(1):63-71.
80. Fagon JY, Chastre J, Wolff M, Gervais C, Parer-Aubas S, Stéphan F, *et al.* Invasive and noninvasive strategies for management of suspected ventilator-associated pneumonia. A randomized trial. *Ann Intern Med*. 18 avr 2000;132(8):621-30.
81. Giantsou E, Liratzopoulos N, Efraimidou E, Panopoulou M, Alepopoulou E, Kartali-Ktenidou S, *et al.* De-escalation therapy rates are significantly higher by bronchoalveolar lavage than by tracheal aspirate. *Intensive Care Med*. sept 2007;33(9):1533-40.
82. Michel F, Franceschini B, Berger P, Arnal JM, Gainnier M, Sainty JM, *et al.* Early Antibiotic Treatment for BAL-Confirmed Ventilator-Associated Pneumonia. *Chest*. 1 févr 2005;127(2):589-97.
83. Canadian Critical Care Trials Group. A randomized trial of diagnostic techniques for ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med*. 21 déc 2006;355(25):2619-30.
84. Kabak E, Hudcova J, Magyarics Z, Stulik L, Goggin M, Szijártó V, *et al.* The utility of endotracheal aspirate bacteriology in identifying mechanically ventilated patients at risk for ventilator associated pneumonia: a single-center prospective observational study. *BMC Infect Dis*. 29 août 2019;19(1):756.

85. Morris AC, Kefala K, Simpson AJ, Wilkinson TS, Everingham K, Kerlake D, *et al.* Evaluation of the effect of diagnostic methodology on the reported incidence of ventilator-associated pneumonia. *Thorax*. juin 2009;64(6):516-22.
86. Fagon J. Diagnostic des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. *Réanimation*. févr 2006;15(1):36-42.
87. Fernández-Barat L, Motos A, Ranzani OT, Bassi GL, Aguilera Xiol E, Senussi T, *et al.* Diagnostic Value of Endotracheal Aspirates Sonication on Ventilator-Associated Pneumonia Microbiologic Diagnosis. *Microorganisms*. 20 sept 2017;5(3):62.
88. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2017;36(11):1999-2006.
89. Fernando SM, Tran A, Cheng W, Klompas M, Kyeremanteng K, Mehta S, *et al.* Diagnosis of ventilator-associated pneumonia in critically ill adult patients—a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 1 juin 2020;46(6):1170-9.
90. Johanson WG, Seidenfeld JJ, Gomez P, de los Santos R, Coalson JJ. Bacteriologic diagnosis of nosocomial pneumonia following prolonged mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis*. févr 1988;137(2):259-64.
91. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic « blind » bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis*. mai 1991;143(5 Pt 1):1121-9.
92. Papazian L, Thomas P, Garbe L, Guignon I, Thirion X, Charrel J, *et al.* Bronchoscopic or blind sampling techniques for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. déc 1995;152(6 Pt 1):1982-91.
93. Aubas S, Aubas P, Capdevila X, Darbas H, Roustan JP, Du Cailar J. Bronchoalveolar lavage for diagnosing bacterial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med*. avr 1994;149(4 Pt 1):860-6.
94. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Leven M, Ortqvist A, *et al.* Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Eur Respir J*. 1 déc 2005;26(6):1138-80.
95. Rémic: référentiel en microbiologie médicale. 7e édition, 2022. Paris: Société française de microbiologie; 2022.
96. Clavel M, Barraud O, Moucadel V, Meynier F, Karam E, Ploy MC, *et al.* Molecular quantification of bacteria from respiratory samples in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. sept 2016;22(9):812.e1-812.e7.
97. Kunac A, Sifri ZC, Mohr AM, Horng H, Lavery RF, Livingston DH. Bacteremia and ventilator-associated pneumonia: a marker for contemporaneous extra-pulmonic infection. *Surg Infect*. avr 2014;15(2):77-83.
98. Agbaht K, Diaz E, Muñoz E, Lisboa T, Gomez F, Depuydt PO, *et al.* Bacteremia in patients with ventilator-associated pneumonia is associated with increased mortality: A study comparing bacteremic vs. nonbacteremic ventilator-associated pneumonia*: *Crit Care Med*.

sept 2007;35(9):2064-70.

99. Metersky ML, Kalil AC. Management of Ventilator-Associated Pneumonia: Guidelines. *Clin Chest Med.* déc 2018;39(4):797-808.
100. Luna CM, Videla A, Mattera J, Vay C, Famiglietti A, Vujacich P, *et al.* Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia. *Chest.* oct 1999;116(4):1075-84.
101. Rosbolt MB, Sterling ES, Fahy BG. The Utility of the Clinical Pulmonary Infection Score. *J Intensive Care Med.* janv 2009;24(1):26-34.
102. Fàbregas N, Ewig S, Torres A, El-Ebiary M, Ramirez J, de La Bellacasa JP, *et al.* Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax.* oct 1999;54(10):867-73.
103. Pham TN, Neff MJ, Simmons JM, Gibran NS, Heimbach DM, Klein MB. The clinical pulmonary infection score poorly predicts pneumonia in patients with burns. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc.* 2007;28(1):76-9.
104. Croce MA, Swanson JM, Magnotti LJ, Claridge JA, Weinberg JA, Wood GC, *et al.* The futility of the clinical pulmonary infection score in trauma patients. *J Trauma.* mars 2006;60(3):523-7; discussion 527-528.
105. Haliloglu M, Bilgili B, Bilginer H, Kasapoglu US, Sayan I, Aslan MS, *et al.* A new scoring system for early diagnosis of ventilator-associated pneumonia: LUPPIS. *Arch Med Sci AMS.* 10 août 2020;16(5):1040-8.
106. Gaudet A, Martin-Loeches I, Povoas P, Rodriguez A, Salluh J, Duhamel A, *et al.* Accuracy of the clinical pulmonary infection score to differentiate ventilator-associated tracheobronchitis from ventilator-associated pneumonia. *Ann Intensive Care.* 3 août 2020;10(1):101.
107. Rea-Neto A, Youssef NCM, Tuche F, Brunkhorst F, Ranieri VM, Reinhart K, *et al.* Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a systematic review of the literature. *Crit Care.* 2008;12(2):R56.
108. Ego A, Preiser JC, Vincent JL. Impact of Diagnostic Criteria on the Incidence of Ventilator-Associated Pneumonia. *Chest.* 1 févr 2015;147(2):347-55.
109. Wolffers O, Faltys M, Thomann J, Jakob SM, Marschall J, Merz TM, *et al.* An automated retrospective VAE-surveillance tool for future quality improvement studies. *Sci Rep.* 15 nov 2021;11:22264.
110. Bouadma L, Sonnevile R, Garrouste-Orgeas M, Darmon M, Souweine B, Voiriot G, *et al.* Ventilator-Associated Events: Prevalence, Outcome, and Relationship With Ventilator-Associated Pneumonia. *Crit Care Med.* sept 2015;43(9):1798-806.
111. Magill SS, Klompas M, Balk R, Burns SM, Deutschman CS, Diekema D, *et al.* Developing a New, National Approach to Surveillance for Ventilator-Associated Events: Executive Summary. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 déc 2013;57(12):1742-6.
112. Ramirez-Estrada S, Peña-Lopez Y, Eshwara VK, Rello J. Ventilator-associated events versus ventilator-associated respiratory infections—moving into a new paradigm or merging both concepts, instead? *Ann Transl Med.* nov 2018;6(21):425-425.

113. Peña-López Y, Ramírez-Estrada S, Rello J. Ventilator-Associated Events: Definitions and Uses. *Encycl Respir Med*. 2022;523-9.
114. Klompas M. Ventilator-Associated Events: What They Are and What They Are Not. *Respir Care*. 1 août 2019;64(8):953-61.
115. Pouly O, Lecailtel S, Six S, Préau S, Wallet F, Nseir S, *et al*. Accuracy of ventilator-associated events for the diagnosis of ventilator-associated lower respiratory tract infections. *Ann Intensive Care*. 13 janv 2020;10(1):6.
116. Dudeck MA, Weiner LM, Allen-Bridson K, Malpiedi PJ, Peterson KD, Pollock DA, *et al*. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, Data Summary for 2012, Device-associated Module. *Am J Infect Control*. déc 2013;41(12):1148-66.
117. Launey Y, Asehnoune K, Lasocki S, Dahyot-Fizelier C, Huet O, Le Pabic E, *et al*. Risk factors for ventilator-associated pneumonia due to *Staphylococcus aureus* in patients with severe brain injury: A multicentre retrospective cohort study. *Anaesth Crit Care Pain Med*. 26 nov 2020;
118. Battaglini D, Parodi L, Cinotti R, Asehnoune K, Taccone FS, Orengo G, *et al*. Ventilator-associated pneumonia in neurocritically ill patients: insights from the ENIO international prospective observational study. *Respir Res*. 31 mai 2023;24(1):146.
119. Robba C, Reborá P, Banzato E, Wieggers EJA, Stocchetti N, Menon DK, *et al*. Incidence, Risk Factors, and Effects on Outcome of Ventilator-Associated Pneumonia in Patients With Traumatic Brain Injury: Analysis of a Large, Multicenter, Prospective, Observational Longitudinal Study. *Chest*. déc 2020;158(6):2292-303.
120. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, Guyatt GH, Leasa D, *et al*. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med*. 15 sept 1998;129(6):433-40.
121. Novosel TJ, Hodge LA, Weireter LJ, Britt RC, Collins JN, Reed SF, *et al*. Ventilator-associated pneumonia: depends on your definition. *Am Surg*. août 2012;78(8):851-4.
122. REA-REZO. Surveillance des infections associées aux soins en réanimation adulte - Rapport annuel 2022. 2023 sept.
123. Rouzé A, Nseir S. Hospital-Acquired Pneumonia/Ventilator-Associated Pneumonia and Ventilator-Associated Tracheobronchitis in COVID-19. *Semin Respir Crit Care Med*. avr 2022;43(2):243-7.
124. Langer M, Cigada M, Mandelli M, Mosconi P, Tognoni G. Early onset pneumonia: a multicenter study in intensive care units. *Intensive Care Med*. 1987;13(5):342-6.
125. Ibrahim EH, Ward S, Sherman G, Kollef MH. A comparative analysis of patients with early-onset vs late-onset nosocomial pneumonia in the ICU setting. *Chest*. mai 2000;117(5):1434-42.
126. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Rüdén H, Vonberg RP, Welte T. Early- and late-onset pneumonia: is this still a useful classification? *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2009;53(7):2714-8.
127. Hedrick TL, Smith RL, McElearney ST, Evans HL, Smith PW, Pruett TL, *et al*. Differences in Early- and Late-Onset Ventilator-Associated Pneumonia Between Surgical and

Trauma Patients in a Combined Surgical or Trauma Intensive Care Unit. *J Trauma Acute Care Surg.* mars 2008;64(3):714.

128. Restrepo MI, Peterson J, Fernandez JF, Qin Z, Fisher AC, Nicholson SC. Comparison of the Bacterial Etiology of Early-Onset and Late-Onset Ventilator-Associated Pneumonia in Subjects Enrolled in 2 Large Clinical Studies. *Respir Care.* juill 2013;58(7):1220-5.

129. Ibn Saied W, Souweine B, Garrouste-Orgeas M, Ruckly S, Darmon M, Bailly S, *et al.* Respective impact of implementation of prevention strategies, colonization with multiresistant bacteria and antimicrobial use on the risk of early- and late-onset VAP: An analysis of the OUTCOMEREA network. *PloS One.* 2017;12(11):e0187791.

130. Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Combaux D, Dombret MC, *et al.* Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* févr 1998;157(2):531-9.

131. Giantsou E, Liratzopoulos N, Efrimidou E, Panopoulou M, Alepopoulou E, Kartali-Ktenidou S, *et al.* Both early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia are caused mainly by potentially multiresistant bacteria. *Intensive Care Med.* 1 nov 2005;31(11):1488-94.

132. Khan R, Al-Dorzi HM, Tamim HM, Rishu AH, Balkhy H, El-Saed A, *et al.* The impact of onset time on the isolated pathogens and outcomes in ventilator associated pneumonia. *J Infect Public Health.* 1 mars 2016;9(2):161-71.

133. Arayasukawat P, So-ngern A, Reechaipichitkul W, Chumpangern W, Arunsurat I, Ratanawatkul P, *et al.* Microorganisms and clinical outcomes of early- and late-onset ventilator-associated pneumonia at Srinagarind Hospital, a tertiary center in Northeastern Thailand. *BMC Pulm Med.* 30 janv 2021;21(1):47.

134. Garnacho-Montero J, Corcia-Palomo Y, Amaya-Villar R, Martin-Villen L. How to treat VAP due to MDR pathogens in ICU patients. *BMC Infect Dis.* 28 nov 2014;14:135.

135. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 1996;153(5):1711-25.

136. Ben Lakhal H, M'Rad A, Naas T, Brahmi N. Antimicrobial Susceptibility among Pathogens Isolated in Early- versus Late-Onset Ventilator-Associated Pneumonia. *Infect Dis Rep.* 27 avr 2021;13(2):401-10.

137. Sader HS, Streit JM, Carvalhaes CG, Huband MD, Shortridge D, Mendes RE, *et al.* Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from respiratory samples of patients hospitalized with pneumonia in Western Europe, Eastern Europe and the USA: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2016–19). *JAC-Antimicrob Resist.* 1 sept 2021;3(3):dlab117.

138. Chaudhury A, Rani AS, Kalawat U, Sumant S, Verma A, Venkataramana B. Antibiotic resistance & pathogen profile in ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India. *Indian J Med Res.* sept 2016;144(3):440-6.

139. Bonell A, Azarrafiy R, Huong VTL, Viet TL, Phu VD, Dat VQ, *et al.* A Systematic Review and Meta-analysis of Ventilator-associated Pneumonia in Adults in Asia: An Analysis of National Income Level on Incidence and Etiology. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 18 janv 2019;68(3):511-8.

140. SPF. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte : Réseau REA-Raisin, France, Résultats 2016.
141. Warren DK, Shukla SJ, Olsen MA, Kollef MH, Hollenbeak CS, Cox MJ, *et al.* Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center. *Crit Care Med.* mai 2003;31(5):1312-7.
142. Melsen WG, Rovers MM, Groenwold RHH, Bergmans DCJJ, Camus C, Bauer TT, *et al.* Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis.* août 2013;13(8):665-71.
143. Ferrer M, Torres A. Epidemiology of ICU-acquired pneumonia. *Curr Opin Crit Care.* oct 2018;24(5):325-31.
144. Bekaert M, Timsit JF, Vansteelandt S, Depuydt P, Vésin A, Garrouste-Orgeas M, *et al.* Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2011;184(10):1133-9.
145. Li Y, Liu C, Xiao W, Song T, Wang S. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Ventilator-Associated Pneumonia in Traumatic Brain Injury: A Meta-analysis. *Neurocrit Care.* févr 2020;32(1):272-85.
146. Nguile-Makao M, Zahar JR, Français A, Tabah A, Garrouste-Orgeas M, Allaouchiche B, *et al.* Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: respective impact of main characteristics at ICU admission and VAP onset using conditional logistic regression and multi-state models. *Intensive Care Med.* mai 2010;36(5):781-9.
147. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 avr 2002;165(7):867-903.
148. Six S, Jaffal K, Ledoux G, Jaillette E, Wallet F, Nseir S. Hyperoxemia as a risk factor for ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Lond Engl.* 22 juin 2016;20(1):195.
149. Foucrier A, Mourvilier B, Wolff M, Bouadma L. Bundles et prévention des pneumonies acquises sous ventilation mécanique. *Médecine Intensive Réanimation.* 2012;21(Suppl. 2):434-44.
150. Khan R, Al-Dorzi HM, Al-Attas K, Ahmed FW, Marini AM, Mundekadan S, *et al.* The impact of implementing multifaceted interventions on the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Am J Infect Control.* 1 mars 2016;44(3):320-6.
151. Lim KP, Kuo SW, Ko WJ, Sheng WH, Chang YY, Hong MC, *et al.* Efficacy of ventilator-associated pneumonia care bundle for prevention of ventilator-associated pneumonia in the surgical intensive care units of a medical center. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* juin 2015;48(3):316-21.
152. Plantinga NL, Wittekamp BHJ, Leleu K, Depuydt P, Van den Abeele AM, Brun-Buisson C, *et al.* Oral mucosal adverse events with chlorhexidine 2% mouthwash in ICU. *Intensive Care Med.* avr 2016;42(4):620-1.
153. Bouadma L, Klompas M. Oral care with chlorhexidine: beware! *Intensive Care Med.* 1 juill 2018;44(7):1153-5.
154. Lederberg J, McCray A. 'Ome sweet 'omics - a genealogical treasury of words. In: *Scientist.* 7^e éd. 2001. p. 8-8.

155. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 30 juin 2020;8:103.
156. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 30 juill 2015;3:31.
157. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, *et al.* Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 23 avr 2022;7(1):1-28.
158. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. juin 2012;486(7402):207-14.
159. Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol*. 1985;6:143-51.
160. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. oct 2004;17(4):840-62.
161. Bukin YuS, Galachyants YuP, Morozov IV, Bukin SV, Zakharenko AS, Zemskaya TI. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data*. 5 févr 2019;6:190007.
162. Ikegami H, Noguchi S, Fukuda K, Akata K, Yamasaki K, Kawanami T, *et al.* Refinement of microbiota analysis of specimens from patients with respiratory infections using next-generation sequencing. *Sci Rep*. 1 oct 2021;11(1):19534.
163. Paulo AC, Lança J, Almeida ST, Hilty M, Sá-Leão R. The upper respiratory tract microbiota of healthy adults is affected by *Streptococcus pneumoniae* carriage, smoking habits, and contact with children. *Microbiome*. 2 sept 2023;11:199.
164. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 22 mars 2016;17:135.
165. López-Aladid R, Fernández-Barat L, Alcaraz-Serrano V, Bueno-Freire L, Vázquez N, Pastor-Ibáñez R, *et al.* Determining the most accurate 16S rRNA hypervariable region for taxonomic identification from respiratory samples. *Sci Rep*. 9 mars 2023;13(1):3974.
166. Soriano-Lerma A, Pérez-Carrasco V, Sánchez-Marañón M, Ortiz-González M, Sánchez-Martín V, Gijón J, *et al.* Influence of 16S rRNA target region on the outcome of microbiome studies in soil and saliva samples. *Sci Rep*. 12 août 2020;10(1):13637.
167. Jones CB, White JR, Ernst SE, Sfanos KS, Peiffer LB. Incorporation of Data From Multiple Hypervariable Regions when Analyzing Bacterial 16S rRNA Gene Sequencing Data. *Front Genet*. 2022;13:799615.
168. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*. 6 nov 2019;10(1):5029.
169. Deissová T, Zapletalová M, Kunovský L, Kroupa R, Grolich T, Kala Z, *et al.* 16S rRNA gene primer choice impacts off-target amplification in human gastrointestinal tract biopsies and microbiome profiling. *Sci Rep*. 3 août 2023;13(1):12577.

170. Fromentin M, Bridier-Nahmias A, Legoff J, Mercier-Delarue S, Ranger N, Vuillard C, *et al.* The 16S rRNA lung microbiome in mechanically ventilated patients: a methodological study. *Exp Lung Res.* 2 janv 2022;48(1):23-34.
171. Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Appl Environ Microbiol.* oct 2013;79(19):5962-9.
172. Kembel SW, Wu M, Eisen JA, Green JL. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(10):e1002743.
173. Gao Y, Wu M. Accounting for 16S rRNA copy number prediction uncertainty and its implications in bacterial diversity analyses. *ISME Commun.* 10 juin 2023;3(1):1-9.
174. Větrovský T, Baldrian P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE.* 27 févr 2013;8(2):e57923.
175. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, *et al.* Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 12 nov 2014;12:87.
176. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome.* 17 déc 2018;6(1):226.
177. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* juin 2019;38(6):1059-70.
178. Dyrhovden R, Rippin M, Øvrebø KK, Nygaard RM, Ulvestad E, Kommedal Ø. Managing Contamination and Diverse Bacterial Loads in 16S rRNA Deep Sequencing of Clinical Samples: Implications of the Law of Small Numbers. *mBio.* 12(3):e00598-21.
179. Gao B, Chi L, Zhu Y, Shi X, Tu P, Li B, *et al.* An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies. *Biomolecules.* 2 avr 2021;11(4):530.
180. Ibal JC, Park YJ, Park MK, Lee J, Kim MC, Shin JH. Review of the Current State of Freely Accessible Web Tools for the Analysis of 16S rRNA Sequencing of the Gut Microbiome. *Int J Mol Sci.* janv 2022;23(18):10865.
181. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* déc 2017;11(12):2639-43.
182. Park SC, Won S. Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using a Mock Community. *Genomics Inform.* déc 2018;16(4):e24.
183. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci.* mars 2020;65(3):674-85.
184. Bent SJ, Forney LJ. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J.* juill 2008;2(7):689-95.

185. Kers JG, Saccenti E. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Front Microbiol.* 3 mars 2022;12:796025.
186. van Alphen L, Jansen HM, Dankert J. Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* juin 1995;151(6):2094-9.
187. Wilson R. Bacterial infections of the bronchial tree. *Curr Opin Pulm Med.* mars 1997;3(2):105-10.
188. Segal LN, Blaser MJ. A brave new world: the lung microbiota in an era of change. *Ann Am Thorac Soc.* janv 2014;11 Suppl 1(Suppl 1):S21-27.
189. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, *et al.* Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2011;184(8):957-63.
190. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, *et al.* Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLOS ONE.* 5 janv 2010;5(1):e8578.
191. Man WH, de Steenhuijsen Piters WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* mai 2017;15(5):259-70.
192. Meldrum OW, Chotirmall SH. Mucus, Microbiomes and Pulmonary Disease. *Biomedicines.* 13 juin 2021;9(6):675.
193. Belizário J, Garay-Malpartida M, Faintuch J. Lung microbiome and origins of the respiratory diseases. *Curr Res Immunol.* 1 janv 2023;4:100065.
194. Remot A, Descamps D, Noordine ML, Boukadiri A, Mathieu E, Robert V, *et al.* Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J.* mai 2017;11(5):1061-74.
195. Human Microbiome Project (HMP) Data Portal [Internet]. [cité 10 févr 2024]. Disponible sur: <https://portal.hmpdacc.org/>
196. Natalini JG, Singh S, Segal LN. The dynamic lung microbiome in health and disease. *Nat Rev Microbiol.* avr 2023;21(4):222-35.
197. Pérez-Cobas AE, Rodríguez-Beltrán J, Baquero F, Coque TM. Ecology of the respiratory tract microbiome. *Trends Microbiol.* 1 sept 2023;31(9):972-84.
198. Huffnagle G, Dickson R, Lukacs N. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol.* mars 2017;10(2):299-306.
199. Thibeault C, Suttorp N, Opitz B. The microbiota in pneumonia: From protection to predisposition. *Sci Transl Med.* 13 janv 2021;13(576):eaba0501.
200. Kumpitsch C, Koskinen K, Schöpf V, Moissl-Eichinger C. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biol.* 7 nov 2019;17(1):87.
201. Weaver D, Gago S, Bromley M, Bowyer P. The Human Lung Mycobiome in Chronic Respiratory Disease: Limitations of Methods and Our Current Understanding. *Curr Fungal Infect Rep.* 1 sept 2019;13(3):109-19.

202. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, *et al.* Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *mBio*. 20 janv 2015;6(1):e02284-14.
203. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, *et al.* Analysis of the lung microbiome in the « healthy » smoker and in COPD. *PloS One*. 22 févr 2011;6(2):e16384.
204. Lin L, Yi X, Liu H, Meng R, Li S, Liu X, *et al.* The airway microbiome mediates the interaction between environmental exposure and respiratory health in humans. *Nat Med*. juill 2023;29(7):1750-9.
205. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci*. 29 juin 2010;107(26):11971-5.
206. Bosch AATM, de Steenhuijsen Piters WAA, van Houten MA, Chu MLJN, Biesbroek G, Kool J, *et al.* Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 déc 2017;196(12):1582-90.
207. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WOCM, Braun-Fahrlander C, *et al.* Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 24 févr 2011;364(8):701-9.
208. Pulvirenti G, Parisi GF, Giallongo A, Papale M, Manti S, Savasta S, *et al.* Lower Airway Microbiota. *Front Pediatr*. 27 sept 2019;7:393.
209. Willner D, Haynes MR, Furlan M, Schmieder R, Lim YW, Rainey PB, *et al.* Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. *ISME J*. févr 2012;6(2):471-4.
210. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an Ecology of the Lung: New Conceptual Models of Pulmonary Microbiology and Pneumonia Pathogenesis. *Lancet Respir Med*. mars 2014;2(3):238-46.
211. Vandecandelaere I, Matthijs N, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vosters P, De Bus L, *et al.* Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. *PloS One*. 2012;7(6):e38401.
212. Huebinger RM, Liu MM, Dowd SE, Rivera-Chavez FA, Boynton J, Carey C, *et al.* Examination with next-generation sequencing technology of the bacterial microbiota in bronchoalveolar lavage samples after traumatic injury. *Surg Infect*. juin 2013;14(3):275-82.
213. Marino PJ, Wise MP, Smith A, Marchesi JR, Riggio MP, Lewis MAO, *et al.* Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. *J Crit Care*. juin 2017;39:149-55.
214. Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, *et al.* Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care*. 2017;37:30-7.
215. Cifuentes EA, Sierra MA, Yepes AF, Baldión AM, Rojas JA, Álvarez-Moreno CA, *et al.* Endotracheal tube microbiome in hospitalized patients defined largely by hospital environment. *Respir Res*. déc 2022;23(1):1-11.

216. Huebinger RM, Smith AD, Zhang Y, Monson NL, Ireland SJ, Barber RC, *et al.* Variations of the lung microbiome and immune response in mechanically ventilated surgical patients. *PLOS ONE*. 24 oct 2018;13(10):e0205788.
217. Lamarche D, Johnstone J, Zytaruk N, Clarke F, Hand L, Loukov D, *et al.* Microbial dysbiosis and mortality during mechanical ventilation: a prospective observational study. *Respir Res*. 7 déc 2018;19(1):245.
218. Bustos IG, Martín-Loeches I, Acosta-González A, Chotirmall SH, Dickson RP, Reyes LF. Exploring the complex relationship between the lung microbiome and ventilator-associated pneumonia. *Expert Rev Respir Med*. 2023;17(10):889-901.
219. Kelly BJ, Imai I, Bittinger K, Laughlin A, Fuchs BD, Bushman FD, *et al.* Composition and dynamics of the respiratory tract microbiome in intubated patients. *Microbiome*. 11 févr 2016;4:7.
220. Woo S, Park SY, Kim Y, Jeon JP, Lee JJ, Hong JY. The Dynamics of Respiratory Microbiota during Mechanical Ventilation in Patients with Pneumonia. *J Clin Med*. 27 févr 2020;9(3):638.
221. Woo S, Park SY, Kim Y, Jeon JP, Lee JJ, Hong JY. The Dynamics of Respiratory Microbiota during Mechanical Ventilation in Patients with Pneumonia. *J Clin Med*. Févr 2020 ;9(3).
222. Zakharkina T, Martin-Loeches I, Matamoros S, Povoia P, Torres A, Kastelijin JB, *et al.* The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. *Thorax*. 2017;72(9):803-10.
223. Emonet S, Lazarevic V, Leemann Refondini C, Gaïa N, Leo S, Girard M, *et al.* Identification of respiratory microbiota markers in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2019;45(8):1082-92.
224. Baek M gyung, Woo SJ, Kim NE, Baek C, Won S, Kim Y, *et al.* Respiratory microbiome profiles differ by recent hospitalization and nursing home residence in patients on mechanical ventilation. *J Transl Med*. 7 déc 2020;18(1):464.
225. Kitsios GD, Yang H, Yang L, Qin S, Fitch A, Wang XH, *et al.* Respiratory Tract Dysbiosis Is Associated with Worse Outcomes in Mechanically Ventilated Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 déc 2020;202(12):1666-77.
226. Qi X, Qu H, Yang D, Zhou L, He YW, Yu Y, *et al.* Lower respiratory tract microbial composition was diversified in *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia patients. *Respir Res*. 27 2018;19(1):139.
227. Fenn D, Abdel-Aziz MI, van Oort PMP, Brinkman P, Ahmed WM, Felton T, *et al.* Composition and diversity analysis of the lung microbiome in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Lond Engl*. 6 juill 2022;26(1):203.
228. Fromentin M, Ricard JD, Roux D. Respiratory microbiome in mechanically ventilated patients: a narrative review. *Intensive Care Med*. mars 2021;47(3):292-306.
229. Françoise A, Héry-Arnaud G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes*. 11 mai 2020;11(5):536.
230. Wang L, Cai Y, Garssen J, Henricks PAJ, Folkerts G, Braber S. The Bidirectional Gut-

Lung Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 mai 2023;207(9):1145-60.

231. Sole ML, Yooseph S, Talbert S, Abomoelak B, Deb C, Rathbun KP, *et al.* Pulmonary Microbiome of Patients Receiving Mechanical Ventilation: Changes Over Time. *Am J Crit Care Off Publ Am Assoc Crit-Care Nurses.* 1 mars 2021;30(2):128-32.

232. Cotoia A, Paradiso R, Ferrara G, Borriello G, Santoro F, Spina I, *et al.* Modifications of lung microbiota structure in traumatic brain injury ventilated patients according to time and enteral feeding formulas: a prospective randomized study. *Crit Care.* 21 juin 2023;27(1):244.

233. Harrigan JJ, Abdallah HO, Clarke EL, Oganisian A, Roy JA, Lautenbach E, *et al.* Respiratory Microbiome Disruption and Risk for Ventilator-Associated Lower Respiratory Tract Infection. *Clin Infect Dis.* 1 mai 2022;74(9):1564-71.

234. Morris AC, Gadsby N, McKenna JP, Hellyer TP, Dark P, Singh S, *et al.* 16S pan-bacterial PCR can accurately identify patients with ventilator-associated pneumonia. *Thorax.* 1 nov 2017;72(11):1046-8.

235. Ren Y, Liang J, Li X, Deng Y, Cheng S, Wu Q, *et al.* Association between oral microbial dysbiosis and poor functional outcomes in stroke-associated pneumonia patients. *BMC Microbiol.* 24 oct 2023;23(1):305.

236. Zhou P, Zou Z, Wu W, Zhang H, Wang S, Tu X, *et al.* The gut-lung axis in critical illness: microbiome composition as a predictor of mortality at day 28 in mechanically ventilated patients. *BMC Microbiol.* 18 déc 2023;23(1):399.

237. Montassier E, Kitsios GD, Radder JE, Le Bastard Q, Kelly BJ, Panzer A, *et al.* Robust airway microbiome signatures in acute respiratory failure and hospital-acquired pneumonia. *Nat Med.* nov 2023;29(11):2793-804.

238. Pérez-Cobas AE, Ginevra C, Rusniok C, Jarraud S, Buchrieser C. The respiratory tract microbiome, the pathogen load, and clinical interventions define severity of bacterial pneumonia. *Cell Rep Med.* 19 sept 2023;4(9):101167.

239. Marimón JM, Sorarrain A, Ercibengoa M, Azcue N, Alonso M, Vidaur L. Lung microbiome on admission in critically ill patients with acute bacterial and viral pneumonia. *Sci Rep.* 18 oct 2023;13(1):17724.

240. de Steenhuijsen Pitera WAA, Huijskens EGW, Wyllie AL, Biesbroek G, van den Bergh MR, Veenhoven RH, *et al.* Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *ISME J.* janv 2016;10(1):97-108.

241. Alexandre Y, Le Blay G, Boisramé-Gastrin S, Le Gall F, Héry-Arnaud G, Gouriou S, *et al.* Probiotics: a new way to fight bacterial pulmonary infections? *Med Mal Infect.* janv 2014;44(1):9-17.

242. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization: Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria. 2001, pp 1–4. In.

243. Khailova L, Petrie B, Baird CH, Dominguez Rieg JA, Wischmeyer PE. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium longum* attenuate lung injury and inflammatory response in experimental sepsis. *PLoS One.* 2014;9(5):e97861.

244. Sharif S, Greer A, Skorupski C, Hao Q, Johnstone J, Dionne JC, *et al.* Probiotics in Critical Illness: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Crit Care Med.* 1 août 2022;50(8):1175-86.
245. Johnstone J, Meade M, Lauzier F, Marshall J, Duan E, Dionne J, *et al.* Effect of Probiotics on Incident Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Patients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 21 sept 2021;326(11):1024-33.
246. Smith AD, Zhang Y, Barber RC, Minshall CT, Huebinger RM, Allen MS. Common Lung Microbiome Identified among Mechanically Ventilated Surgical Patients. *PLOS ONE.* 29 nov 2016;11(11):e0166313.
247. Meyer S. Analyse prospective par séquençage haut-débit de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine respiratoire isolées au service de Réanimation Polyvalente du CHU de Limoges. 9 avr 2021;135.
248. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol IJMM.* févr 2010;300(2-3):98-103.
249. Webb SA, Kahler CM. Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. *Crit Care.* 2008;12(6):234.
250. Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr.* mars 2019;7(2).
251. Laux C, Peschel A, Krismer B. *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. *Microbiol Spectr.* 19 avr 2019;7(2):10.1128/microbiolspec.gpp3-0029-2018.
252. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* déc 2005;5(12):751-62.
253. Rigail J, Gavid M, Fayolle M, Morgene MF, Lelonge Y, Grattard F, *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal colonization level and intracellular reservoir: a prospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mai 2023;42(5):621-9.
254. Cespedes C, Saïd-Salim B, Miller M, Lo SH, Kreiswirth BN, Gordon RJ, *et al.* The Clonality of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *J Infect Dis.* 2005;191(3):444-52.
255. Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *Semin Immunopathol.* mars 2012;34(2):281-97.
256. Jacobs DM, Shaver A. Prevalence of and outcomes from *Staphylococcus aureus* pneumonia among hospitalized patients in the United States, 2009-2012. *Am J Infect Control.* 1 avr 2017;45(4):404-9.
257. Paling FP, Hazard D, Bonten MJM, Goossens H, Jafri HS, Malhotra-Kumar S, *et al.* Association of *Staphylococcus aureus* Colonization and Pneumonia in the Intensive Care Unit. *JAMA Netw Open.* 1 sept 2020;3(9):e2012741.
258. Adams CE, Dancer SJ. Dynamic Transmission of *Staphylococcus aureus* in the Intensive Care Unit. *Int J Environ Res Public Health.* 22 mars 2020;17(6):2109.

259. Dancer SJ, Adams CE, Smith J, Pichon B, Kearns A, Morrison D. Tracking *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit using whole-genome sequencing. *J Hosp Infect.* sept 2019;103(1):13-20.
260. Contou D, Claudinon A, Pajot O, Micaëlo M, Longuet Flandre P, Dubert M, *et al.* Bacterial and viral co-infections in patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia admitted to a French ICU. *Ann Intensive Care.* 7 sept 2020;10(1):119.
261. Lee GR, Gallo D, Alves de Souza RW, Tiwari-Heckler S, Csizmadia E, Harbison JD, *et al.* Trauma-induced heme release increases susceptibility to bacterial infection. *JCI Insight.* 6(20):e150813.
262. Magret M, Amaya-Villar R, Garnacho J, Lisboa T, Díaz E, Dewaele J, *et al.* Ventilator-associated pneumonia in trauma patients is associated with lower mortality: results from EU-VAP study. *J Trauma.* oct 2010;69(4):849-54.
263. Decavèle M, Gault N, Moyer JD, Gennequin M, Allain PA, Foucrier A. Prediction models of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* ventilator associated pneumonia relapse in trauma and brain injury patients: A retrospective analysis. *J Crit Care.* déc 2021;66:20-5.
264. Magyarics Z, Leslie F, Bartko J, Rouha H, Luperchio S, Schörghofer C, *et al.* Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Ascending-Dose Study of the Penetration of a Monoclonal Antibody Combination (ASN100) Targeting *Staphylococcus aureus* Cytotoxins in the Lung Epithelial Lining Fluid of Healthy Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2019;63(8):e00350-19.
265. François B, Jafri HS, Chastre J, Sánchez-García M, Eggimann P, Dequin PF, *et al.* Efficacy and safety of suvatoxumab for prevention of *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia (SAATELLITE): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, phase 2 pilot trial. *Lancet Infect Dis.* sept 2021;21(9):1313-23.
266. Miller LS, Fowler VG, Shukla SK, Rose WE, Proctor RA. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. *FEMS Microbiol Rev.* 16 déc 2019;44(1):123-53.
267. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 25 juin 2022;7(1):1-27.
268. Rajar P, Dhariwal A, Salvadori G, Junges R, Åmdal HA, Berild D, *et al.* Microbial DNA extraction of high-host content and low biomass samples: Optimized protocol for nasopharynx metagenomic studies. *Front Microbiol.* 21 déc 2022;13:1038120.
269. McCann CD, Jordan JA. Evaluation of MoYsis™ Complete5 DNA Extraction Method for Detecting *Staphylococcus aureus* DNA from Whole Blood in a Sepsis Model Using PCR/Pyrosequencing. *J Microbiol Methods.* avr 2014;99:1-7.
270. Thoendel M, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, Yao JZ, Chia N, Hanssen AD, *et al.* Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing. *J Microbiol Methods.* 1 août 2016;127:141-5.
271. Roquilly A, Torres A, Villadangos JA, Netea MG, Dickson R, Becher B, *et al.* Pathophysiological role of respiratory dysbiosis in hospital-acquired pneumonia. *Lancet Respir Med.* 1 août 2019;7(8):710-20.

272. Alagna L, Mancabelli L, Magni F, Chatenoud L, Bassi G, Del Bianco S, *et al.* Changes in upper airways microbiota in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med Exp.* 2 mars 2023;11(1):17.
273. Doré P, Robert R, Grollier G, Rouffineau J, Lanquetot H, Charrière JM, *et al.* Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of a protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 avr 1996;153(4):1292-8.
274. Grollier G, Doré P, Robert R, Ingrand P, Gréjon C, Fauchere JL. Antibody response to *Prevotella spp.* in patients with ventilator-associated pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol.* janv 1996;3(1):61-5.
275. Meyer S, Hernandez-Padilla AC, Barraud O. Le rôle des bactéries anaérobies dans la survenue de la Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. *Rev Francoph Lab.* déc 2020;2020(527):32-9.
276. Adolf LA, Heilbronner S. Nutritional Interactions between Bacterial Species Colonising the Human Nasal Cavity: Current Knowledge and Future Prospects. *Metabolites.* 27 mai 2022;12(6):489.
277. Lucas SK, Villarreal AR, Ahmad MM, Itabiyi A, Feddema E, Boyer HC, *et al.* Anaerobic Microbiota Derived from the Upper Airways Impact *Staphylococcus aureus* Physiology. *Infect Immun.* 2021;89(9):15.
278. Bertelsen A, Elborn JS, Schock BC. Microbial interaction: *Prevotella spp.* reduce *P. aeruginosa* induced inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc.* juill 2021;20(4):682-91.
279. Lamoureux C, Guilloux CA, Beauruelle C, Jolivet-Gougeon A, Héry-Arnaud G. Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Crit Rev Microbiol.* févr 2019;45(1):103-17.
280. Ting HSL, Chen Z, Chan JYK. Systematic review on oral microbial dysbiosis and its clinical associations with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* août 2023;45(8):2120-35.
281. Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, *et al.* Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci Rep.* 18 sept 2017;7(1):11773.
282. Segal LN, Clemente JC, Tsay JCJ, Koralov SB, Keller BC, Wu BG, *et al.* Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol.* 4 avr 2016;1:16031.
283. Flynn JM, Niccum D, Dunitz JM, Hunter RC. Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLOS Pathog.* 22 août 2016;12(8):e1005846.
284. Mirković B, Murray MA, Lavelle GM, Molloy K, Azim AA, Gunaratnam C, *et al.* The Role of Short-Chain Fatty Acids, Produced by Anaerobic Bacteria, in the Cystic Fibrosis Airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 déc 2015;192(11):1314-24.
285. Ghorbani P, Santhakumar P, Hu Q, Djadeu P, Wolever TMS, Palaniyar N, *et al.* Short-chain fatty acids affect cystic fibrosis airway inflammation and bacterial growth. *Eur Respir J.* oct 2015;46(4):1033-45.
286. Parks NA, Magnotti LJ, Weinberg JA, Zarzaur BL, Schroepfel TJ, Swanson JM, *et al.* Use of the clinical pulmonary infection score to guide therapy for ventilator-associated

pneumonia risks antibiotic overexposure in patients with trauma. *J Trauma Acute Care Surg.* juill 2012;73(1):52-8; discussion 58-59.

287. O'Horo JC, Thompson D, Safdar N. Is the Gram Stain Useful in the Microbiologic Diagnosis of VAP? A Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 15 août 2012;55(4):551-61.

288. Yoshimura J, Yamakawa K, Ohta Y, Nakamura K, Hashimoto H, Kawada M, *et al.* Effect of Gram Stain-Guided Initial Antibiotic Therapy on Clinical Response in Patients With Ventilator-Associated Pneumonia: The GRACE-VAP Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open.* 8 avr 2022;5(4):e226136.

289. Ranzani OT, Motos A, Chiurazzi C, Ceccato A, Rinaudo M, Li Bassi G, *et al.* Diagnostic accuracy of Gram staining when predicting staphylococcal hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 1 nov 2020;26(11):1456-63.

290. Seligman R, Seligman BGS, Konkewicz L, dos Santos RP. Accuracy of tracheal aspirate gram stain in predicting *Staphylococcus aureus* infection in ventilator-associated pneumonia. *BMC Anesthesiol.* 23 janv 2015;15(1):19.

291. Combes A, Figliolini C, Trouillet JL, Kassis N, Wolff M, Gibert C, *et al.* Incidence and Outcome of Polymicrobial Ventilator-Associated Pneumonia. *Chest.* 1 mai 2002;121(5):1618-23.

292. Hauber HP, Foley SC, Hamid Q. Mucin overproduction in chronic inflammatory lung disease. *Can Respir J J Can Thorac Soc.* sept 2006;13(6):327-35.

293. Powell J, Garnett JP, Mather MW, Cooles FAH, Nelson A, Verdon B, *et al.* Excess Mucin Impairs Subglottic Epithelial Host Defense in Mechanically Ventilated Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* août 2018;198(3):340-9.

294. Munckhof WJ, Nimmo GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Stephens AJ, Williams G, *et al.* Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* févr 2009;15(2):149-55.

295. Berdal JE, Bjørnholt J, Blomfeldt A, Smith-Erichsen N, Bukholm G. Patterns and dynamics of airway colonisation in mechanically-ventilated patients. *Clin Microbiol Infect.* 1 mai 2007;13(5):476-80.

296. Armand-Lefèvre L, Ruimy R, Philippon A, Andremont A. L'histoire de *Staphylococcus aureus* ST398: un paradigme médical du 21ème siècle. *Bull Académie Vét Fr.* 2010;163(3):261-8.

297. van Cleef BAGL, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M, *et al.* Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Humans, Europe. *Emerg Infect Dis.* mars 2011;17(3):502-5.

298. Vandendriessche S, Kadlec K, Schwarz S, Denis O. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm(T)* in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* nov 2011;66(11):2455-9.

299. Kashif A, McClure JA, Lakhundi S, Pham M, Chen S, Conly JM, *et al.* *Staphylococcus aureus* ST398 Virulence Is Associated With Factors Carried on Prophage ϕ Sa3. *Front*

Microbiol. 2019;10:2219.

300. Zeggay A, Atchon A, Valot B, Hocquet D, Bertrand X, Bouiller K. Genome Analysis of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 Strains Isolated from Patients with Invasive Infection. *Microorganisms*. 30 mai 2023;11(6):1446.
301. Marimuthu K, Pittet D, Harbarth S. The effect of improved hand hygiene on nosocomial MRSA control. *Antimicrob Resist Infect Control*. 26 nov 2014;3(1):34.
302. Hetem DJ, Derde LPG, Empel J, Mroczkowska A, Orczykowska-Kotyna M, Kozińska A, *et al*. Molecular epidemiology of MRSA in 13 ICUs from eight European countries. *J Antimicrob Chemother*. janv 2016;71(1):45-52.
303. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, *et al*. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect*. avr 2003;53(4):274-82.
304. Ransom EM, Potter RF, Dantas G, Burnham CAD. Genomic Prediction of Antimicrobial Resistance: Ready or Not, Here It Comes! *Clin Chem*. 1 oct 2020;66(10):1278-89.
305. Manara S, Pasolli E, Dolce D, Ravenni N, Campana S, Armanini F, *et al*. Whole-genome epidemiology, characterisation, and phylogenetic reconstruction of *Staphylococcus aureus* strains in a paediatric hospital. *Genome Med*. 13 nov 2018;10(1):82.
306. Lacoma A, Laabei M, Sánchez-Herrero JF, Young B, Godoy-Tena G, Gomes-Fernandes M, *et al*. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from the Respiratory Tract in Mechanically-Ventilated Patients. *Toxins*. 6 févr 2021;13(2):122.
307. Roe C, Stegger M, Lilje B, Johannesen TB, Ng KL, Sieber RN, *et al*. Genomic analyses of *Staphylococcus aureus* clonal complex 45 isolates does not distinguish nasal carriage from bacteraemia. *Microb Genomics*. août 2020;6(8):mgen000403.
308. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, *et al*. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect*. août 2015;21(8):788.e1-788.e13.
309. Barron SL, Saez J, Owens RM. In Vitro Models for Studying Respiratory Host-Pathogen Interactions. *Adv Biol*. juin 2021;5(6):2000624.
310. Doryab A, Groll J. Biomimetic In Vitro Lung Models: Current Challenges and Future Perspective. *Adv Mater*. 2023;35(13):2210519.
311. Villarreal AR, Lucas SK, Fletcher JR, Hunter RC. High-throughput quantification of microbial-derived organic acids in mucin-rich samples via reverse phase high performance liquid chromatography. *J Med Microbiol*. juin 2023;72(6).
312. Pathak KV, McGilvrey MI, Hu CK, Garcia-Mansfield K, Lewandoski K, Eftekhari Z, *et al*. Molecular Profiling of Innate Immune Response Mechanisms in Ventilator-associated Pneumonia. *Mol Cell Proteomics*. 1 oct 2020;19(10):1688-705.
313. Hisert KB, Liles WC, Manicone AM. A Flow Cytometric Method for Isolating Cystic Fibrosis Airway Macrophages from Expecterated Sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juill 2019;61(1):42-50.

314. Lay JC, Peden DB, Alexis NE. Flow cytometry of sputum: assessing inflammation and immune response elements in the bronchial airways. *Inhal Toxicol.* juin 2011;23(7):392-406.
315. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, Fardon TC, Finch S, Mateus EF, *et al.* Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis. *Respirol Carlton Vic.* oct 2015;20(7):1082-8.
316. Zanin M, Baviskar P, Webster R, Webby R. The Interaction between Respiratory Pathogens and Mucus. *Cell Host Microbe.* 10 févr 2016;19(2):159-68.

Annexes

Annexe 1 : Tableau de synthèse des études ayant analysé le microbiote respiratoire chez le patient intubé-ventilé en Réanimation.....	213
Annexe 2 : Revue de la littérature publiée dans la Revue Francophone des Laboratoires en 2020.....	218

Annexe 1 : Tableau de synthèse des études ayant analysé le microbiote respiratoire chez le patient intubé-ventilé en Réanimation

Etude	Nombre patients inclus	Type patients inclus	Critères inclusion/exclusion	Délai moyen intubation - PAVM	Type d'échantillons	Étude cinétique	Région variable amplifiée, Plateforme	Évolution diversité	Bactéries significatives entre groupes
Huebinger et al., 2013	12 patients suspect de PAVM	Hétérogène Présence d'antibiotiques pour la moitié des patients	Patients avec CPIS ≥ 6	4 à 19 jours	12 LBA	Non	V1-V3, 454	Diversité très variable selon les échantillons	Prédominance de Proteobacteria, Firmicutes et Tenericutes (<i>Mycoplasma</i>) Corrélation inverse entre le nombre de jours de ventilation et le nombre d'espèces retrouvées dans le microbiote pulmonaire
Kelly et al., 2016	4 patients PAVM 12 "contrôles sains"	Hétérogène (sepsis, pneumopathies, aspiration, leucémie aiguë...) Patients avec antibiotiques à l'admission	Aucun listé	Non précisé	42 écouvillons pharyngés + 42 AET	Oui	V1-V2, 454	Diversité alpha diminuée chez les patients intubés. Index de Shannon diminue avec le temps d'intubation (PRH, PRB)	Groupe contrôle : prédominance de Prevotellaceae, Streptococcaceae et Veillonellaceae Groupe intubés : grande hétérogénéité, taxon majoritaire dans échantillons haut et bas
Zakharkina et al., 2017	11 PAVM, 6 HAP, 18 patients intubés contrôles	Assez homogène (coma, défaillance respiratoire ou choc cardiogénique)	Intubation pour cause non-infectieuse Pas d'antibiothérapie dans les 5 jours précédant l'admission VM > 48h Age > 18 ans Exclusion si décès < 72h	8 jours (5 à 16 jours)	111 AET	Oui	V1-V2, 454	Durée de VM associée à une diminution de l'index de Shannon. Pas de lien entre antibiothérapie et diminution de la diversité Pas de changement de diversité alpha entre patients PAVM et non PAVM.	Les genres <i>Burkholderia</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Pseudomonas</i> sont plus fréquents dans le groupe PAVM
Huebinger et al., 2018	6 patients PAVM 16 patients intubés non PAVM	Assez homogène (essentiellement des trauma) Antibiothérapie hétérogène entre groupes	Age > 18 ans VM > 48h	Non précisé	LBA	Non	V4, IonTorrent	Diversité du groupe "culture négative" plus grande que celle du groupe "culture positive". Pas d'analyse selon le statut infectieux	Prédominance de <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Neisseria</i> et <i>Fusobacterium</i> Association entre patients avec un pathogène majoritaire dans le LBA et niveau de production de cytokines pro inflammatoires

Lamarche et al., 2018	34 patients PAVM 35 "contrôles sains"	Hétérogène (sepsis, pneumopathies, BPCO, trauma...)	Age > 18 ans Pas d'antibiothérapie dans les 6 derniers mois	Non précisé	29 AET groupe PAVM. Prélèvements entre 2 et 4 jours post intubation 7 LBA, 14 écouvillons nasal ou oral chez les donneurs sains	Non	V3, Illumina	Index de Shannon et de Simpson dans les AET inversement corrélés au score APACHE II. Index diminués chez les patients décédés. Index de diversité peuvent être des marqueurs de pronostic	Diminution drastique des genres <i>Neisseria</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Corynebacterium</i> chez les patients intubés Quantification totale du 16S dans les AET identiques entre patients décédés et survivants
Panzer et al., 2018	74 patients intubés : 38 fumeurs, 15 passifs, 21 non-fumeurs	Homogène (uniquement des patients trauma)	Patient admis pour cause de trauma	Non précisé	74 AET à l'admission, 30 AET à 48h	Oui T0 et T48h	V4, Illumina	Pas de modifications des index de diversité selon le statut fumeur	Composition du microbiote différente selon le statut fumeur à l'admission et à 48h. Microbiote des non-fumeur enrichit en <i>Streptococcus</i> , <i>Rothia</i> et <i>Neisseria</i> Développement d'un SDRa associé à l'augmentation d'Enterobacterales, de <i>Prevotella</i> et de <i>Fusobacterium</i>
Qi et al., 2018	36 patients PAVM 18 patients intubés non PAVM.	Hétérogènes (chirurgie, défaillance respiratoire, trauma...) Tous les patients PAVM ont reçus des antibiotiques avant l'admission	Age > 18 ans, VM > 48h, Patients documentés avec <i>P. aeruginosa</i> durant la période de VM	Non précisé	94 AET (24h post VAP, à J7 et à J14)	Oui 24h post PAVM, à J7 et à J14 post PAVM	V3-V4, Illumina	Index de Shannon diminué chez les patients PAVM vs contrôles Index de Shannon stable entre le jour 1 et 7 chez les patients PAVM	Microbiote des contrôles dominé par <i>Neisseria</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> et <i>Alloprevotella</i> Microbiote des patients PAVM dominé par <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , Enterobacteriaceae (<i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>) et Lachnospiraceae Pas de modification du taxon dominant post antibiothérapie Pas de différence du microbiote entre patients décédés et patients extubés Corrélation négative entre l'abondance de <i>Lactobacillus</i> et le CPIS le jour du diagnostic
Emonet et al., 2019	18 PAVM 36 patients intubés contrôles	Hétérogène (patients trauma, choc cardiogéniques, défaillance respiratoires...)	VM > 48 h Patients sans antibiothérapie à l'admission (moins de 24h)	PAVM > 5 jours	240 écouvillons oro-pharyngés 235 AET 24 LBA 88 échantillons contrôles (écouvillons et AET)	Oui J0, J3, JVAP-3, JVAP, JVAP+3	V3-V4, Illumina	Diminution de la diversité au cours du temps Grande variabilité inter-individuelle	Augmentation progressive des Proteobacteria (Enterobacterales) et des Tenericutes (<i>Mycoplasma</i>) mais diminution des Firmicutes (<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> et <i>Staphylococcus</i>) dans le groupe PAVM. La quantité d'ADN humain et bactérien était supérieure chez les patients PAVM au niveau respiratoire haut et bas entre J0 et JVAP.

Sommerstein et al., 2019	5 patients PAVM 5 patients intubés non PAVM	Homogène (patients neurologiques : neurotrauma, AVC, hémorragie méningée)	Age > 18 ans, Durée de VM > 48h, Patients immunocompétents, Pas d'infection active à l'admission Patients sans antibiothérapie dans les 3 mois précédant l'admission sauf prophylaxie	PAVM entre J5 et J7	51 AET 71 écouvillons oro-pharyngés	Oui Pas d'homogénéité de date de prélèvement	V4, Illumina	Diminution de la diversité chez les patients documentés à Enterobacterales (n = 3) mais pas chez les patients documentés à <i>Haemophilus</i> (n = 2) Pas de corrélation significative entre patient PAVM et contrôles	-
Baek et al., 2020	41 patients PAVM 19 patients intubés non PAVM	Hétérogène (défaillances respiratoires, neurologique, arrêt cardiaque, post-opératoire)	Age > 18 ans, Durée de VM > 7jours	Non précisé	180 AET	Oui J1, J3, J7	V3-V4, Illumina	Pas de modification de la diversité alpha et bêta entre les deux groupes Variabilité du microbiote non associée à la mortalité	Abondance des <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> et <i>Corynebacterium</i> augmentée dans le groupe PAVM. <i>Streptococcus</i> et <i>Prevotella</i> augmentés dans le groupe non PAVM. Association significative entre proportion de <i>Corynebacterium ulcerans</i> et survenue de PAVM
Kitsios et al., 2020	72 patients SDRA 229 patients intubés sans SDRA 20 patients non intubés	Très hétérogène (patients immunodéprimés, avec maladies chroniques, avec ou sans aspiration...) 32% des patients avec des antibiotiques à l'admission, 80% avec antibiotiques durant le séjour	Présence d'une trachéostomie, VM > 72h avant inclusion	Non précisé	256 AET 262 écouvillons oropharyngés 23 LBA, 19 crachats chez pa	Non	V3-V4, Illumina	Très grande hétérogénéité entre les résultats de microbiote Index de Shannon plus faible chez les patients intubé ventilés que chez les volontaires sains : dysbiose Identification de clusters avec une plus grande proportion de SDRA si index de Shannon bas	Différents clusters avec soit une prédominance de bactéries oropharyngées (<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i>), soit une prédominance de bactéries pathogènes (<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i>).
Woo et al., 2020	19 patients PAVM 41 patients intubés non PAVM	Hétérogène (défaillances respiratoires, neurologiques, post-opératoire...)	Age > 18 ans, Début de la VM moins de 48h post admission, Durée de VM > 7j, Absence de maladies neuromusculaires (type SLA)	Non précisé	216 AET	Oui J1, J3, J7	V3-V4, Illumina	Index de Shannon similaire à J0, J3, J7 entre patient PAVM et non PAVM Mais index de Shannon significativement diminué entre J1 et J7 dans le groupe PAVM avec échec d'extubation. Pas de différence de diversité selon la mortalité	<i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Rothia</i> et <i>Neisseria</i> prédominant dans le groupe PAVM. <i>Streptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Granulicatella</i> , et <i>Mycoplasma</i> dans le groupe non-PAVM. Prédiction entre mortalité à 28 jours et abondance de <i>Streptococcus</i> (sensibilité = 86%, spécificité = 63%)
De Pascale et al., 2020	10 patients intubés COVID-19 16 patients intubés non COVID-19	Non précisé	Pas de critères précisés. Documentation microbiologique uniquement à <i>S. aureus</i>	Entre 4 et 19 jours	26 LBA	Non	V3-4, Illumina	Pas de différence significative de diversité selon le statut COVID	Patients COVID développent plus de PAVM que les patients non COVID malgré un microbiote similaire <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> et <i>Olsenella</i> sont enrichis dans le groupe COVID

Sole et al., 2021	7 patients intubés aspirés quotidiennement 9 contrôles non aspirés quotidiennement	Non précisé	Durée VM > 5 j	Non évalué	79 AET 79 prélèvements oropharyngés	Oui 5 échantillons /patient. Jours non précisés	V3-V4, Illumina	Très grande variabilité des résultats entre patients Index de Shannon diminue au cours du temps	Différence significative de composition du microbiote entre les deux groupes interventionnels.
Suleiman et al., 2021	142 patients COVID-19	Homogène (défaillance respiratoire liée au COVID-19)	Age > 18 ans, Durée de VM > 7jours PCR COVID-19 positive	Non évalué	142 LBA 135 écouvillons oro-pharyngés	Non	Métagénomique	Pas de différences significatives de diversité alpha et bêta selon la durée de VM ou la survie.	Culture bactérienne positive dans le LBA n'est pas associée à une issue plus défavorable. L'identification de bactéries de flore respiratoire était associée à une augmentation de la durée de VM
Duran-Manuel et al., 2022	117 patients intubé COVID-19 Pas de patients contrôles	Non précisé	Age > 18 ans, Suspicion de PAVM (pas de critères cliniques établis)	Non précisé	117 LBA	Non	V3-V4, Illumina	Pas de différence de diversité selon le sexe ou l'âge	-
Fenn et al., 2022	90 patients intubés PAVM 2 témoins négatifs	Hétérogène (post-opératoire, trauma, défaillances respiratoires...) Diversité des cultures microbiologiques (P. aeruginosa, S. aureus, Enterobacterales, Haemophilus...)	Age > 18 ans, VM > 48h Suspicion clinique de PAVM	Entre 5 et 12 jours	90 LBA dans les 24h post diagnostic	Non	V4-V5, Illumina	Diminution significative de la diversité si culture microbienne positive : dysbiose augmentée si culture microbienne positive Perte de diversité associée à une augmentation d'IL-1b dans les LBA	Sensibilité et la VPP de l'analyse du 16S étaient très bonne pour P. aeruginosa et K. pneumoniae mais très faibles pour les genres Staphylococcus (PPV 30%) et Haemophilus (PPV 36%)
Harrigan et al., 2022	83 patients trachéotomisés : 20 infectés et 63 non infectés	Hétérogène Patients avec des durées sous VM variables avant inclusion Patients avec maladies chroniques (BPCO, asthme, leucémie...) Antibiothérapie fréquente avant admission	Age > 18 ans, Dépendance à la VM Documentation microbiologique essentiellement à P. aeruginosa et à S. aureus	Non précisé	1066 AET	Oui J0 puis toutes les 24 à 72h jusqu'à J30	V1-V2, Illumina	Pas de différence de diversité au cours de l'intubation sur 3 semaines Présence d'un faible index de Shannon de façon répétée est associé à un risque accru d'infections respiratoires Le risque d'infections respiratoires augmente si l'index de Shannon est bas et si la charge bactérienne totale augmente.	-

Alagna et al., 2023	13 PAVM 22 patients contrôles	Homogène (neurotrauma, AVC ischémique, hémorragie méningée)	Age > 18 ans MV > 48h Pas d'infection active à l'admission Intubation pour cause non-infectieuse	13 PAVM < 7 jours 5 PAVM > 7 jours	64 ETA	Oui	V3, Illumina	Grande hétérogénéité des résultats entre patients Pas de différences de richesse entre J0 et J3 mais différence de richesse entre patients PAVM et non PAVM	Diminution significative d' <i>Actinomyces</i> , <i>Rothia</i> , <i>Granulicatella</i> et <i>Streptococcus</i> entre J0 et J3 au cours de l'intubation. Corrélation négative entre abondance de <i>Streptococcus</i> et survenue de PAVM. Augmentation significative des genres <i>Porphyromonas</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Prevotella 7</i> , <i>Peptostreptococcus</i> et <i>Fusobacterium</i> à J3 dans le groupe PAVM.
Cotoia et al., 2023	10 PAVM 21 patients intubés non PAVM.	Homogène (patients avec trauma crânien). Culture microbiologique diverse (Klebsiella, Staphylococcus, Pseudomonas, Acinetobacter)	Age > 18 ans MV > 48h Motif d'admission : trauma crânien	PAVM > 14 jours	61 LBA	Oui J0 et J7	V2-V3-V4-V6,7-V8-V9 Ion Torrent	Pas de différence de diversité selon l'âge, le sexe, le statut fumeur ou le type de nutrition Pas de différence de diversité alpha mais présence d'une différence de diversité bêta selon le statut PAVM à J7	Augmentation des genres <i>Acinetobacter</i> dans le groupe PAVM et <i>Staphylococcus</i> dans le groupe non-PAVM
Meyer et al., 2023	12 patients : 4 PAVM, 8 non PAVM	Homogène (patients neuro-lésés). Pas d'antibiothérapie avant admission	Age > 18 ans	PAVM précoces (< 7 jours)	62 AET	Oui	V2-V3-V4-V6,7-V8-V9 Ion Torrent	Grande hétérogénéité des résultats entre patients Pas de différence de diversité entre les groupes	Augmentation des genres <i>Prevotella</i> , <i>Catonella</i> , <i>Howardella</i> et <i>Pasteurellaceae</i> dans le groupe PAVM. La composition du microbiote peut prédire la survenue de PAVM
Ren et al., 2023	50 patients pneumopathie associé à l'AVC, 10 patients PAVM, 104 patients contrôles non PAVM	Homogène (patients post-AVC)	Patient admis pour AVC	Non précisé	Écouvillons oropharyngés	Oui 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7j et 10j	V3-V4, Illumina	Perte de diversité du microbiote oral au cours de l'intubation	Faible abondance en <i>Streptococcus</i> associé à la survenue de pneumopathie lié à l'AVC Corrélation négative entre les abondances relatives de <i>Fusobacteria</i> , <i>Lactobacillales</i> , <i>Rothia</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> et l'utilisation d'antibiotiques Corrélation négative entre les abondances de <i>Prevotella</i> , <i>Rothia</i> , <i>Veillonella</i> et <i>Pseudomonas</i> et la durée de VM

Le rôle des bactéries anaérobies dans la survenue de la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

Sylvain Meyer^{a,b,*}, Ana Catalina Hernandez-Padilla^a, Olivier Barraud^{a,b}

a UMR INSERM I092 : Anti-infectieux, supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques, Faculté de médecine, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025, Limoges cedex France

b Service de bactériologie-virologie-hygiène, CHU de Limoges, 2 avenue Martin Luther-King, 87042 Limoges cedex France

*Auteur correspondant

Adresse e-mail: sylvain.meyer@unilim.fr (S. Meyer).

RÉSUMÉ

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) reste, encore aujourd'hui, l'infection associée aux soins la plus fréquente dans les services de réanimation. Les bactéries aérobies telles que les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont clairement les pathogènes les plus fréquemment impliqués dans sa survenue. Néanmoins, la découverte de bactéries anaérobies dans les prélèvements profonds respiratoires chez ces patients, a fait reconsidérer le rôle de la flore orale anaérobie dans les années 1990 sans apporter de réponse claire. L'évolution des technologies actuelles de recherche avec l'accès au séquençage haut-débit a permis de mettre en évidence le microbiote pulmonaire profond et de reconsidérer la place des bactéries anaérobies dans la survenue de la PAVM.



© Pascal bachelet / BSJP

MOTS CLÉS

- ▶ bactérie anaérobie
- ▶ microbiote
- ▶ pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
- ▶ réanimation
- ▶ séquençage haut-débit

KEYWORDS

- ▶ anaerobic bacteria
- ▶ intensive care unit
- ▶ microbiota
- ▶ next generation sequencing
- ▶ ventilator acute pneumonia

ABSTRACT

Role of anaerobic bacteria on the development of Ventilator associated pneumonia

Ventilator associated pneumonia (VAP) remains, until today, the most frequent nosocomial infection in the Intensive Care Units. Aerobic bacteria such as Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are the most documented pathogens. However, the discovery of anaerobic bacteria from samples of the lower respiratory tract (LRT) in these patients in the 1990s, suggested the implication of anaerobic oral flora on VAP pathophysiology without providing a clear answer. The recent evolution of research technologies such as Next Generation Sequencing has revealed the existence of a LRT microbiota, allowing to revisit the question over the role of anaerobic bacteria on the development of VAP.

© 2020 – Elsevier Masson SAS
Tous droits réservés.

Introduction

Les infections associées aux soins concernent à l'heure actuelle près de 5 % des patients hospitalisés en France, et sont majoritairement consécutives à l'utilisation de dispositifs invasifs (sondes, cathéters, assistance cardio-respiratoire...) [1]. Les services de réanimation sont particulièrement exposés à cette problématique avec en premier lieu des complications respiratoires telles que la pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM), qui représente plus de 50 % des infections survenant chez le patient intubé et ventilé [2]. La ventilation mécanique (VM) est une intervention vitale requise en service de réanimation lorsque la respiration autonome du patient est déficiente. Près de 40 % des patients admis en service de réanimation sont au moins sous VM durant leur séjour et jusqu'à 27 % d'entre eux vont développer une PAVM [3,4].

Même si la prise en charge pour réduire les facteurs de risques s'est beaucoup développée ces dernières années [5,6], la fréquence et la gravité de cette pathologie en réanimation interrogent toujours, et ce d'autant que le diagnostic de la PAVM reste complexe car basé sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et microbiologiques [7]. La démocratisation de nouvelles technologies utilisées jusqu'à présent en recherche clinique permet de mieux investiguer la physiopathologie de la PAVM et, en particulier, de mieux cerner le rôle des bactéries anaérobies, rôle qui fût longtemps débattu au sein de la communauté scientifique.

Cette revue a pour objectif de décrire d'un point de vue microbiologique l'importance de la PAVM dans les services de réanimation et plus particulièrement, le rôle des bactéries anaérobies, qui reste aujourd'hui encore controversé. Nous détaillerons également l'apport du séquençage haut-débit (ou en anglais NGS pour *Next Generation Sequencing*) dans la compréhension de la physiopathologie de la PAVM.

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique

Définition et épidémiologie

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique est la complication infectieuse majeure, qui survient dans les services de réanimation chez les patients intubés et ventilés. Elle est définie comme une pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine de manière invasive par

l'intermédiaire d'un tube endotrachéal ou d'une trachéotomie après au moins 48 heures d'intubation [8]. Il est actuellement estimé que 9 à 27 % des patients vont en développer une au cours de leur séjour [4]. L'apparition d'une PAVM entraîne un risque de surmortalité évalué entre 20 et 50 %, en fonction du délai d'introduction d'une antibiothérapie adaptée et une mortalité attribuée estimée à 13 % [9]. De plus, elle implique une augmentation de la durée d'hospitalisation d'en moyenne sept jours et un surcoût des soins évalué entre 10 000 et 40 000 dollars par hospitalisation [10,11]. Elle entraîne également une surconsommation d'antibiotiques, ce qui en fait un enjeu important de santé publique à l'heure où la prescription d'antibiotiques doit être raisonnée [12].

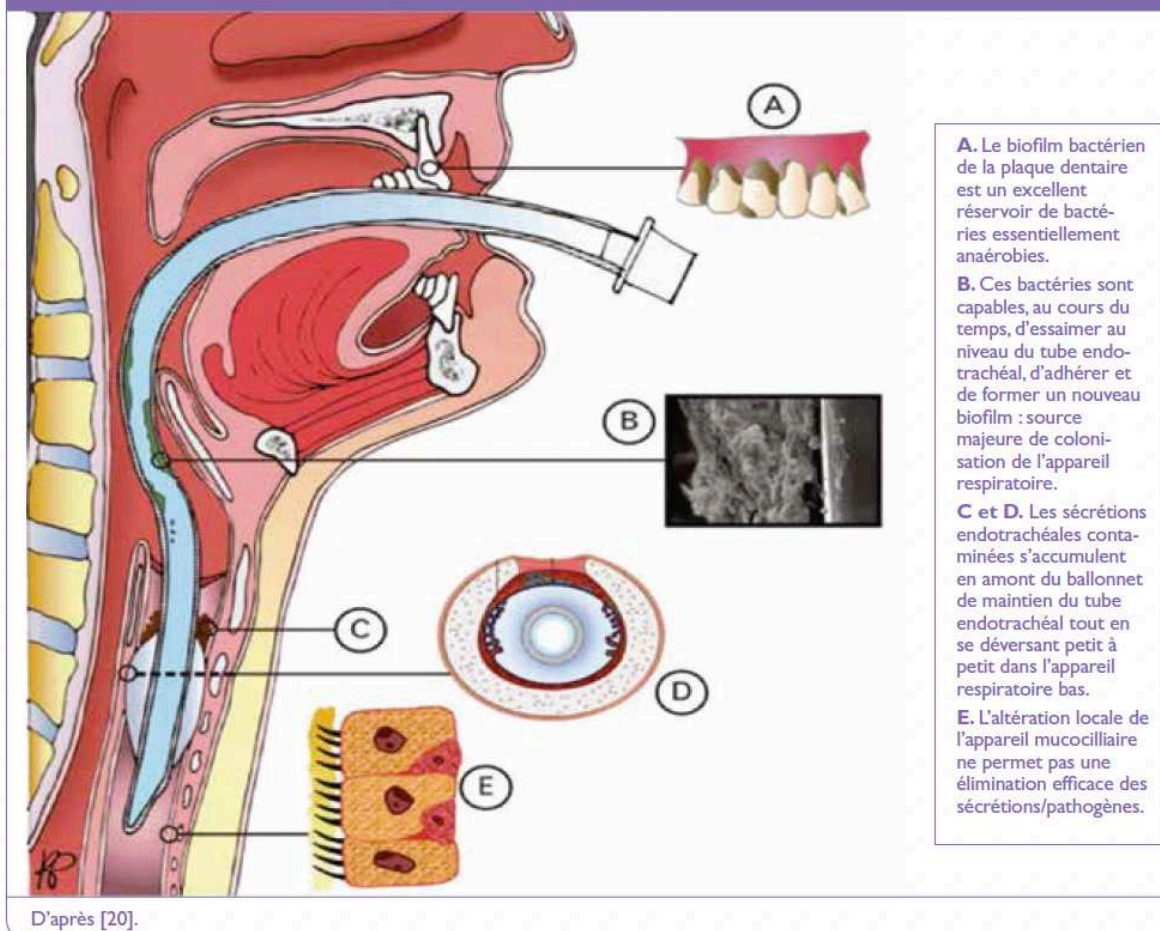
Physiopathologie de la PAVM : ce que l'on sait

La survenue de la PAVM, c'est-à-dire l'histoire naturelle de la maladie, est à ce jour toujours peu comprise. La VM est en soi un facteur de risque de développer une PAVM et chaque jour sous VM augmente ce risque [2]. Une longue durée de VM ou l'utilisation préalable d'antibiotiques ont montré être particulièrement associées à une fréquence plus élevée de la maladie. Son délai de survenue est très variable allant de quelques heures à plusieurs semaines après l'intubation [13]. Néanmoins, certains patients ne développeront aucune infection alors que la durée de VM est prolongée. D'autres patients vont présenter une colonisation des voies respiratoires par des pathogènes reconnus, sans pour autant conduire au développement d'une PAVM.

À ce jour, il est admis que la majorité des PAVM sont dues au passage sous glottique des germes colonisant l'oropharynx. Il a été montré, grâce au NGS, une association entre le microbiote de la flore orale et de la plaque dentaire et le microbiote pulmonaire chez des patients atteints de PAVM [14,15]. La flore buccale peut permettre le développement d'éventuels pathogènes, qui vont au cours du temps migrer le long du tube endotrachéal (TET) par micro-inhalation de sécrétions salivaires (*figure 1*). Ce procédé est dénommé « transcolonisation » [16]. La formation de biofilm à la surface du TET va rapidement devenir une source majeure de colonisation des voies respiratoires inférieures (bronches, bronchioles et alvéoles) conduisant, en fonction des défenses de l'hôte, au développement d'une PAVM [17]. L'intubation, à savoir la pose du TET, est également un facteur favorisant puisque le nombre de tentatives d'intubation ou encore le lieu de l'intubation peuvent engendrer de multiples microlésions de

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique représente plus de 50 % des infections survenant chez le patient intubé et ventilé

Figure 1. Représentation schématique de la physiopathologie lors de l'intubation endotrachéale.



A. Le biofilm bactérien de la plaque dentaire est un excellent réservoir de bactéries essentiellement anaérobies.

B. Ces bactéries sont capables, au cours du temps, d'essaimer au niveau du tube endotrachéal, d'adhérer et de former un nouveau biofilm : source majeure de colonisation de l'appareil respiratoire.

C et D. Les sécrétions endotrachéales contaminées s'accumulent en amont du ballonnet de maintien du tube endotrachéal tout en se déversant petit à petit dans l'appareil respiratoire bas.

E. L'altération locale de l'appareil mucociliaire ne permet pas une élimination efficace des sécrétions/pathogènes.

l'appareil mucociliaire mais aussi l'introduction directe d'un pathogène dans les voies respiratoires [18]. Ainsi, après 72 heures de réanimation, il est estimé que 60% des patients sont déjà colonisés au niveau respiratoire par des germes de l'oropharynx [19]. Bien entendu, d'autres facteurs favorisant la survenue de la PAVM ont été identifiés, qui sont essentiellement liés à l'hôte (âge, état nutritionnel) et à l'état de ses défenses immunitaires (immunodépression, pathologies sous-jacentes). L'origine du prélèvement respiratoire est essentielle pour documenter le caractère infectieux ou colonisateur des germes retrouvés. La présence de bactéries à partir d'un échantillon prélevé profondément dans l'arbre respiratoire (lavage broncho-alvéolaire, brossage distal protégé) est ainsi plus en faveur d'une infection puisqu'il diminue le risque de contamination par la flore orale, mais ce type de prélèvement nécessite un geste invasif réalisé à l'aide d'un fibroscope et donc difficile à réaliser au quotidien [9]. Un prélèvement plus supérieur,

tel que l'aspiration endotrachéale permet de documenter plus facilement le processus de colonisation par micro-aspirations répétées.

► Bactéries isolées des prélèvements respiratoires dans la PAVM

Les bactéries aérobies

De nombreuses études ont affirmé l'implication de certaines bactéries aérobies dans l'apparition de la PAVM, telles que les enterobactérales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou *Acinetobacter baumannii* [21]. Ces bactéries colonisent les voies respiratoires des patients sous VM après une durée d'intubation plus ou moins longue et sont reconnues comme directement responsables de la survenue de la PAVM. Cependant, un

pathogène est identifié dans environ 70 % des cas suspects, avec une variation de la documentation microbiologique de 40 à 90 % selon les services de réanimation [22]. Les principales recommandations de prise en charge de la PAVM sont actuellement adaptées à l'isolement de ces pathogènes en culture microbiologique et l'antibiothérapie empirique utilisée lors d'une PAVM cible principalement ces pathogènes [9].

Les anaérobies : acteurs ou figurants dans la PAVM ?

La littérature concernant le rôle des bactéries anaérobies strictes dans le poumon et leur imputabilité dans l'apparition de la PAVM reste aujourd'hui encore peu claire. Les modalités de prélèvement, d'acheminement et de culture sont particulièrement critiques pour la conservation et la détection des bactéries anaérobies en culture microbiologique. Initialement, très peu de bactéries anaérobies étaient retrouvées chez ces patients. Une étude prospective du début des années 1990 ne retrouvait par exemple qu'un seul prélèvement respiratoire profond sur 185 contenant une bactérie anaérobie (*Veillonella parvula*) considérée par les auteurs comme non pathogène [23]. D'autres publications similaires ne retrouvaient également pas d'anaérobies par culture microbiologique [24,25].

Néanmoins, d'autres équipes ont pu mettre en évidence des bactéries anaérobies dans des prélèvements respiratoires plus ou moins profonds. Il a par exemple été retrouvé que 59 % des patients intubés hébergeaient, dans des prélèvements endotrachéaux, des bactéries anaérobies en association avec des bactéries aérobies ou des levures, et que 8 % des patients intubés présentaient des anaérobies dans des prélèvements respiratoires profonds [26,27]. De plus, il a été démontré que les PAVM documentées avec des bactéries anaérobies étaient plus fréquentes lors d'une intubation orotrachéale que lors d'une ventilation par trachéotomie et qu'elles survenaient préférentiellement les cinq premiers jours d'intubation [28]. Cela confirme l'origine buccale de ces bactéries anaérobies et le rôle de la flore orale dans le processus de microaspiration. Bien entendu, l'imputabilité de ces anaérobies était à l'époque faible puisque remise en question par une éventuelle contamination oropharyngée lors du prélèvement. Pour documenter l'éventuel caractère invasif de ces anaérobies, Grollier *et al.* ont cherché à mettre en évidence la présence d'anticorps anti-*Prevotella* par Elisa et Western blot dans le sérum de patients pris en charge pour une PAVM documentée microbiologiquement à ces anaérobies.

Ils ont ainsi retrouvé une réponse humorale anti-*Prevotella* plus importante chez ces patients, ce qui suggère, selon eux, un caractère invasif de ces anaérobies [29].

Le recours à une antibiothérapie dont le spectre permet de couvrir les principales bactéries anaérobies fait d'ailleurs toujours débat. Une étude a par exemple mis en évidence que les patients traités par antibiothérapie couvrant les principales bactéries anaérobies présentaient un meilleur pronostic que ceux traités par antibiotiques à spectre plus étroit. Les auteurs concluent même que ces bactéries ne doivent pas être négligées puisqu'elles peuvent présenter de nombreux facteurs de virulence et d'invasion [30]. Néanmoins, les bactéries anaérobies retrouvées au niveau respiratoire ne présentent que peu de résistance aux traitements classiques de la prise en charge d'une PAVM et il est donc aujourd'hui difficile de confirmer cette hypothèse. Leur intérêt a ainsi grandement diminué d'un point de vue thérapeutique et prise en charge du patient à tel point que les recommandations officielles n'en tiennent pas compte [9].

Les PAVM documentées avec des bactéries anaérobies étaient plus fréquentes lors d'une intubation orotrachéale

La flore digestive, l'autre source des anaérobies ?

Les bactéries anaérobies de la flore digestive peuvent également jouer un rôle dans l'apparition de la PAVM. L'estomac est d'ailleurs une source reconnue de colonisation des voies respiratoires par mécanisme de reflux gastro-œsophagien [31]. Une étude plus récente de Clavier T *et al.* a montré que la nutrition entérale était un facteur de risque de présenter une plus grande proportion d'anaérobies dans le poumon [27]. En effet, la présence d'une sonde nasogastrique est une source de colonisation par des bactéries de la flore intestinale contenant de nombreuses bactéries anaérobies (*Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Peptostreptococcus sp.*...). La nutrition entérale alcalinise également le contenu gastrique, favorisant ainsi la prolifération bactérienne le long de la sonde. La présence de telles bactéries anaérobies dans leur étude était quasiment systématiquement associée à une bactérie aérobie, ce qui pourrait suggérer un rôle facilitateur de ces anaérobies.

Ainsi, même si la pathogénicité des bactéries anaérobies dans la PAVM reste toujours incertaine faute d'étude clinique de grande envergure, leur présence dans les voies respiratoires interroge. L'arrivée de moyens technologiques performants comme l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou le NGS permet de mieux détecter et identifier les bactéries anaérobies difficilement cultivables et donc de mieux objectiver leur abondance et leur rôle dans les voies respiratoires.

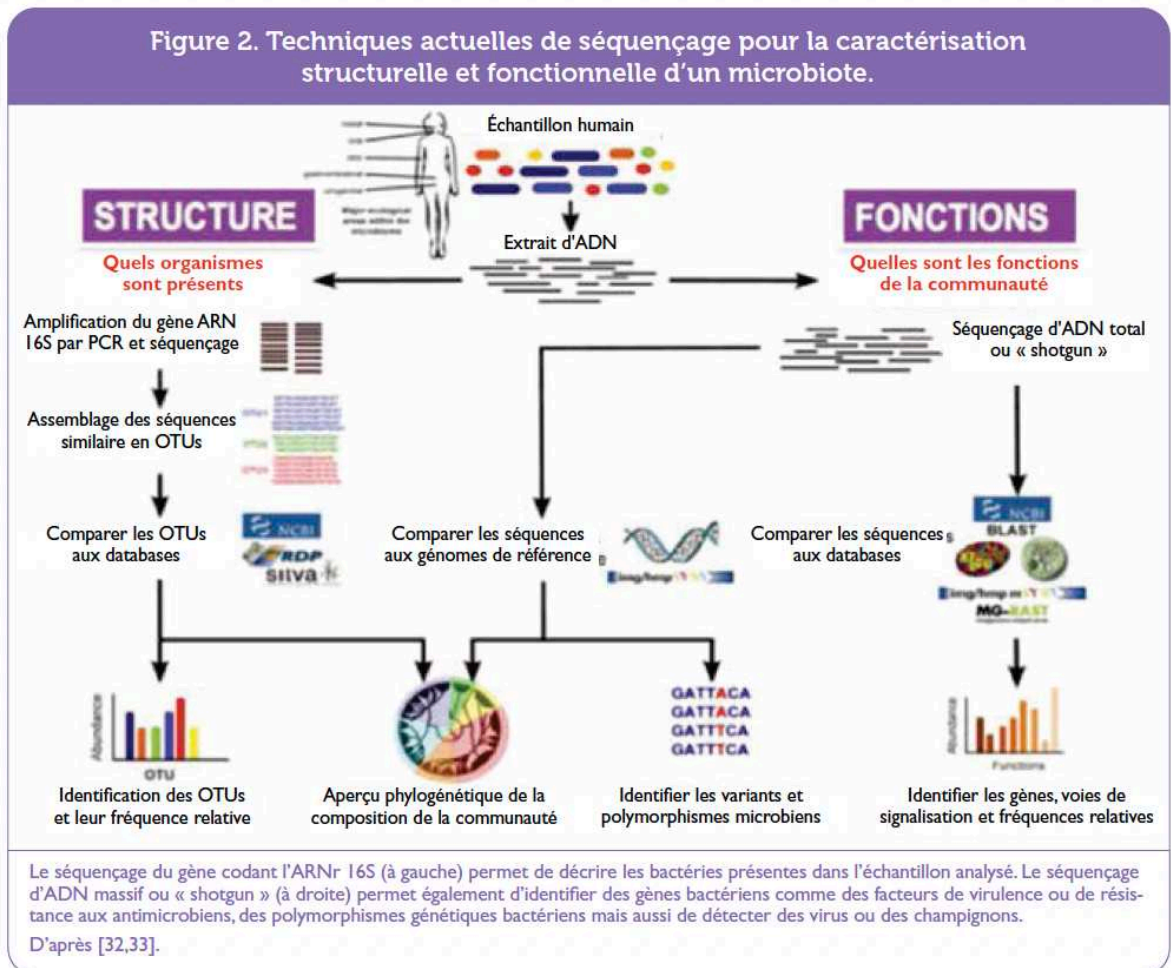
► Apport du séquençage haut débit dans la compréhension de la physiopathologie de la PAVM

Une nouvelle technologie au service d'un nouveau microbiote

Le séquençage nouvelle génération ou haut-débit (NGS) permet de séquencer massivement des millions de fragments d'ADN simultanément. Deux techniques de NGS sont principalement utilisées pour l'analyse du microbiote, à savoir la métataxonomique et le séquençage dit *shotgun*. La métataxonomique consiste à amplifier et séquencer le gène codant l'ARN ribosomique 16S, qui est uniquement présent au sein du règne procaryote. Sa forte variabilité inter-espèces est utilisée pour évaluer la distance taxonomique entre les différentes espèces

bactériennes présentes dans l'échantillon analysé et permettre leur identification par comparaison des séquences à une base de données. La technique de séquençage « *shotgun* » permet quant-à-elle de séquencer directement le contenu global en ADN d'un échantillon biologique de façon non ciblée. Cette stratégie est particulièrement intéressante pour analyser à la fois la présence de bactéries, virus, champignons et parasites ou pour explorer la composition ou la fonction des gènes présents au sein d'une communauté bactérienne. Néanmoins, la présence de fortes quantités d'ADN humain dans l'échantillon à séquencer, comme cela est fréquemment le cas dans les prélèvements respiratoires, diminue la profondeur du séquençage et la couverture génomique des procaryotes. Son utilisation est donc encore peu répandue. (figure 2)

Les applications du NGS en microbiologie clinique sont nombreuses et apportent de nouvelles perspectives à la discipline. La métataxonomique et le séquençage *shotgun* ont permis d'investiguer massivement les flores



microbiennes. Celles-ci sont devenues en quelques années un attrait scientifique majeur pour améliorer la compréhension des interactions hôtes-microorganismes et des processus physiopathologiques. Il est désormais possible d'analyser à moindre coût le contenu génomique microbien d'un prélèvement, d'évaluer la proportion et la taxonomie microbienne ou encore d'apprécier la présence de gènes de résistance [34]. Le microbiote respiratoire fait l'objet ces dernières années d'une attention toute particulière puisqu'il s'agit d'un microbiote « jeune ». En effet, jusqu'à peu, les poumons étaient considérés comme stériles [35]. Mais l'analyse de prélèvements profonds de patients sains a permis de mettre en évidence une flore pulmonaire constituée en partie de bactéries anaérobies strictes avec une masse bactérienne cent à mille fois plus faible que la sphère respiratoire haute (**tableau 1**). Ceci explique la difficulté de détection de ces bactéries en culture microbiologique standard. Les premiers résultats de séquençage ont révélé que la très grande majorité des bactéries présentes dans les poumons ne sont pas cultivables ou identifiables par les méthodes conventionnelles de bactériologie. L'intérêt pour cette flore et son évolution s'est accru et a permis de relancer l'intérêt des bactéries anaérobies dans diverses pathologies respiratoires : mucoviscidose, bronchopneumopathie chronique obstructive, asthme ou encore PAVM.

Utilisation du NGS pour étudier la physiopathologie de la PAVM

Très rapidement, le NGS a pu confirmer l'origine buccale et plus particulièrement dentaire des bactéries retrouvées dans des prélèvements respiratoires de patients présentant une PAVM, confirmant ainsi l'hypothèse de la « transcolonisation ». La présence de pathogènes respiratoires dans la plaque dentaire est un facteur de risque de développer une PAVM, ce qui confirme l'importance de réaliser des soins locaux pour maintenir une hygiène buccale et ainsi prévenir l'apparition de la PAVM [15].

Plusieurs études ont déjà tenté d'analyser la composition et la richesse du microbiote respiratoire chez les patients développant une PAVM. Il a ainsi été mis en évidence une diversité microbienne qui diminue au fur et à mesure de l'intubation indépendamment de l'utilisation d'antibiotiques ou du développement d'une PAVM. Ce déclin est dû à la disparition de certains genres bactériens de la flore pulmonaire comme les *Streptococcus* ou certaines bactéries anaérobies (*Veillonella*, *Fusobacteria*...) et *a contrario* à l'apparition de bactéries aérobies telles que les protéobactéries ou les *Pseudomonadales* [39].

Tableau 1. Bactéries retrouvées par NGS dans le microbiote pulmonaire sain chez l'homme.

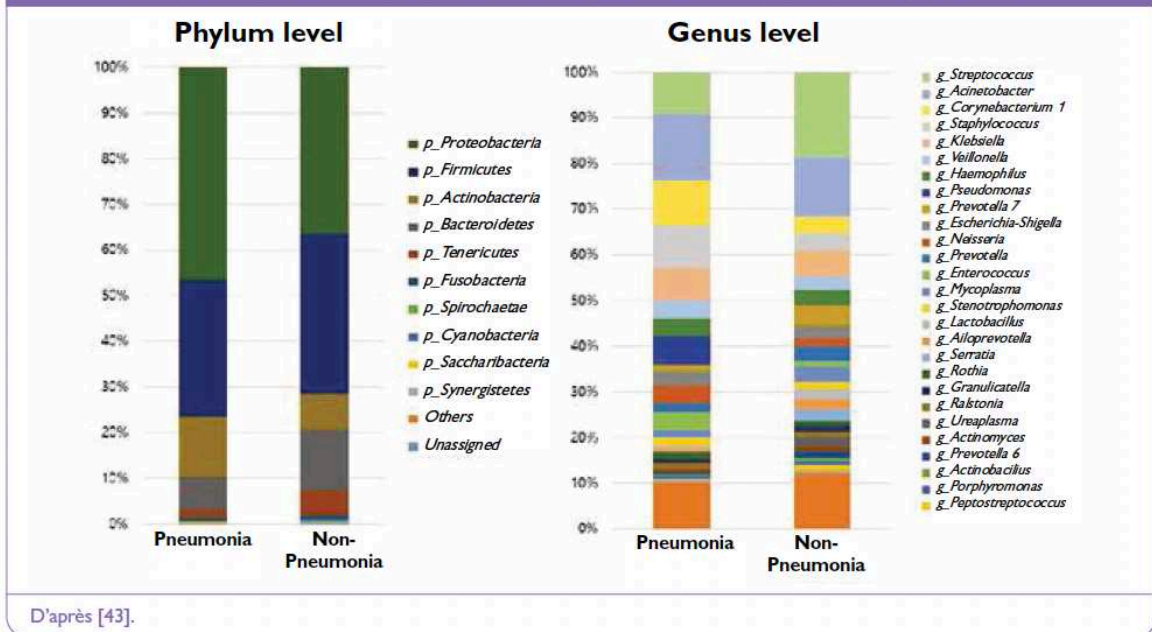
Localisation	Quantité bactérienne	Familles bactériennes (Phylum) les plus prévalentes
Nasopharynx	Haute 4,4 x 10 ⁶ /mL	<i>Staphylococcaceae</i> (Firmicutes) <i>Propionibacteriaceae</i> (Actinobacteria) <i>Corynebacteriaceae</i> (Firmicutes) <i>Streptococcaceae</i> (Firmicutes) <i>Veillonellaceae</i> (Firmicutes) <i>Prevotellaceae</i> (Bacteroidetes)
Oropharynx	Haute 6,8 x 10 ⁷ /mL	<i>Streptococcaceae</i> (Firmicutes) <i>Veillonellaceae</i> (Firmicutes) <i>Prevotellaceae</i> (Bacteroidetes) <i>Fusobacteriaceae</i> (Fusobacteria) <i>Neisseriaceae</i> (Betaproteobacteria) <i>Porphyromonadaceae</i> (Bacteroidetes) <i>Lachnospiraceae</i> (Firmicutes)
Lavage buccal	Haute 1,9 x 10 ⁷ /mL	<i>Streptococcaceae</i> (Firmicutes) <i>Veillonellaceae</i> (Firmicutes) <i>Prevotellaceae</i> (Bacteroidetes) <i>Fusobacteriaceae</i> (Fusobacteria) <i>Neisseriaceae</i> (Betaproteobacteria) <i>Porphyromonadaceae</i> (Bacteroidetes) <i>Lachnospiraceae</i> (Firmicutes)
Lavage broncho-alvéolaire	Faible 2,6 x 10 ⁴ /mL	<i>Streptococcaceae</i> (Firmicutes) <i>Veillonellaceae</i> (Firmicutes) <i>Prevotellaceae</i> (Bacteroidetes) <i>Fusobacteriaceae</i> (Fusobacteria) <i>Neisseriaceae</i> (Betaproteobacteria) <i>Porphyromonadaceae</i> (Bacteroidetes) <i>Lachnospiraceae</i> (Firmicutes)

D'après [36-38].

Ces changements s'effectuent non seulement dans les voies respiratoires basses mais également au niveau de l'oropharynx, ce qui confirme le lien étroit entre ces deux localisations anatomiques. Lors du diagnostic de PAVM, les pathogènes respiratoires aérobies prédominent en proportion et en quantité au sein du microbiote, ce qui conduit à cette perte de diversité [40]. Par ailleurs, beaucoup de bactéries anaérobies et de mycoplasmes ont également pu être mis en évidence chez ces patients [39,41].

L'étude menée par Otsuji et al. a confirmé la diminution de diversité bactérienne attribuée également à la diminution globale des anaérobies des voies respiratoires profondes entre le début de l'intubation et la survenue de la pneumonie [42]. Woo et al. retrouve, en plus, une prédominance de *Streptococcus* et de *Prevotella* chez les patients ne développant pas de PAVM sur des

Figure 3. Différence de composition du microbiote respiratoire en phylum et en genre bactérien entre patients ayant développé ou non une PAVM.



aspirations endotrachéales (figure 3). Néanmoins, lors de la survenue d'une pneumonie, il est retrouvé une augmentation de *Pseudomonas* et de *Corynebacterium* mais également de *Veillonella* [43]. Ces deux études prouvent que le rôle des anaérobies n'est pas aussi simple et que chaque espèce bactérienne composant cette flore pulmonaire entretient des relations différentes avec les pathogènes impliqués dans la PAVM.

Le NGS présente certaines limites pour pouvoir conduire des études cliniques à plus grande échelle. En effet, le manque de standardisation, le manque de données de reproductibilité entre les différentes technologies disponibles sur le marché ou la grande diversité de pipelines bio-informatique sont autant de freins pour conduire un projet de grande ampleur. De plus, il faut mettre en perspective l'extrême « jeunesse » de ce microbiote, qui lié au manque de description du microbiote pulmonaire chez le sujet sain et à la nécessité d'un prélèvement invasif, complique l'analyse comparative des résultats. Enfin, la documentation par le NGS de plusieurs micro-organismes rend le diagnostic de la PAVM beaucoup plus complexe, ce d'autant qu'elle peut être mono ou plurimicrobienne. La présence de co-infections bactériennes « synergiques » (si elles existent) avec des bactéries anaérobies dépend très probablement du pathogène présent, ce qui suggère que la physiopathologie de la maladie est fortement dépendante du ou des germes incriminés. Il apparaît donc évident que le

NGS ne peut pas répondre seul à toutes ses questions. Une association avec des techniques de métabolomique et de transcriptomique est envisagée pour pleinement comprendre les interactions entre pathogènes et flore, et ainsi pouvoir mieux comprendre les interactions et le rôle des différentes espèces anaérobies composant le microbiote respiratoire [44]. ■

Déclaration de liens d'intérêts: l'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

Points à retenir

- ▶ La PAVM reste l'infection associée aux soins la plus fréquente dans les services de réanimation. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou les enterobactériales sont directement impliquées dans sa survenue.
- ▶ Les bactéries anaérobies de la flore orale jouent un rôle dans la physiopathologie de la PAVM via le tube endotrachéal et/ou les sondes gastriques mais leur rôle pathogène reste discuté.
- ▶ Le NGS a permis de mettre en évidence un microbiote respiratoire pulmonaire profond essentiellement de bactéries anaérobies. C'est un outil intéressant pour mieux investiguer le rôle des bactéries anaérobies et non cultivables dans la physiopathologie de la PAVM.

Références

- [1] INVS Santé-Publique France, « Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2017 / 2018 ».
- [2] Cook D. Ventilator associated pneumonia: perspectives on the burden of illness. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S31-37.
- [3] Wunsch H, Wagner J, Herlim M et al. ICU occupancy and mechanical ventilator use in the United States. *Crit Care Med.* déc 2013;41(12):2712-9.
- [4] American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 févr 2005;171(4):388-416.
- [5] Coppadoro A, Bellani G, Foti G. Non-Pharmacological Interventions to Prevent Ventilator-Associated Pneumonia: A Literature Review. *Respir Care.* déc 2019;64(12):1586-95.
- [6] Speck K, Rawat N, Weiner NC et al. A systematic approach for developing a ventilator-associated pneumonia prevention bundle. *Am J Infect Control.* 01 2016;44(6):652-6.
- [7] Klompas M. Interobserver variability in ventilator-associated pneumonia surveillance. *Am J Infect Control.* avr 2010;38(3):237-9.
- [8] Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins, « Définition des infections associées aux soins » 2007.
- [9] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016;63(5):e61-111.
- [10] Fagon JY, Chastre J, Hance AJ et al. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med.* mars 1993;94(3):281-8.
- [11] Craig CP, Connelly S. Effect of intensive care unit nosocomial pneumonia on duration of stay and mortality. *Am J Infect Control.* août 1984;12(4):233-8.
- [12] Safdar N, Dezfoulian C, Collard HR, Saint S. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. *Crit Care Med.* 2005;33(10):2184-93.
- [13] Rodrigues PM, Carmo Neto E, Santos LR, Knibel MF. Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and impact on the clinical evolution of ICU patients. *J Bras Pneumol Publicacao Of Soc Bras Pneumol E Tisiologia.* nov 2009;35(11):1084-91.
- [14] Sands KM, Twigg JA, Lewis MAO et al. Microbial profiling of dental plaque from mechanically ventilated patients. *J Med Microbiol.* 2016;65(2):147-59.
- [15] Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care.* 2017; 37:30-7.
- [16] Soussan R, Schimpf C, Pilmis B et al. Ventilator-associated pneumonia: The central role of transcolonization. *J Crit Care.* 2019;50: 155-61.
- [17] Vandecastelaere I, Coenye T. Microbial composition and antibiotic resistance of biofilms recovered from endotracheal tubes of mechanically ventilated patients. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:137-55.
- [18] Hernandez Padilla AC, Tramont T, Lafon T et al. Is prehospital endobronchial intubation a risk factor for subsequent ventilator associated pneumonia? A retrospective analysis. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217466.
- [19] Messika J, La Combe B, Ricard J-D. Oropharyngeal colonization: epidemiology, treatment and ventilator-associated pneumonia prevention. *Ann Transl Med.* 2018;6(21):426.
- [20] Pirrone M, Pincioli R, Berra L. Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. *Curr Opin Infect Dis.* avr 2016;29(2):160-6.
- [21] Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(4):328-34.
- [22] Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2017;36(11):1999-2006.
- [23] Marik PE, Careau P. The role of anaerobes in patients with ventilator-associated pneumonia and aspiration pneumonia: a prospective study. *Chest.* 1999;115(1):178-83.
- [24] Mier L, Dreyfuss D, Darchy B et al. Is penicillin G an adequate initial treatment for aspiration pneumonia? A prospective evaluation using a protected specimen brush and quantitative cultures. *Intensive Care Med.* 1993;19(5):279-84.
- [25] Papazian L, Thomas P, Garbe L et al. Bronchoscopic or blind sampling techniques for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* déc 1995;152(6 Pt 1):1982-91.
- [26] Agvald-Ohman C, Wernerman J, Nord CE, Edlund C. Anaerobic bacteria commonly colonize the lower airways of intubated ICU patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;9(5):397-405.
- [27] Clavier T, Gouin P, Frebourg N et al. Incidence of anaerobic bacteria in patients with suspected pneumonia in surgical Intensive Care Unit. *Minerva Anesthesiol.* 2014;80(10):1076-83.
- [28] Doré P, Robert R, Grollier G et al. Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of a protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(4 Pt 1):1292-8.
- [29] Grollier G, Doré P, Robert R et al. Antibody response to *Prevotella* spp. in patients with ventilator-associated pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(1):61-5.
- [30] Robert R, Grollier G, Doré P et al. Nosocomial pneumonia with isolation of anaerobic bacteria in ICU patients: therapeutic considerations and outcome. *J Crit Care.* sept 1999;14(3):114-9.
- [31] Torres A, El-Ebiary M, Soler N et al. Stomach as a source of colonization of the respiratory tract during mechanical ventilation: association with ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* 1996;9(8):1729-35.
- [32] Héry-Arnaud G. Microbiome, Virome et Mycobiome, 17^e Journées nationales d'infectiologie. 2016.
- [33] Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. Lewitter F, Kann M, éditeurs. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002808.
- [34] Almeida M. Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative. 2013;162.
- [35] Dickson RP, Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog.* 2015;11(7):e1004923.
- [36] Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(12):827-35.
- [37] Charlson ES, Bittinger K, Haas AR et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2011;184(8):957-63.
- [38] Liu CM, Price LB, Hungate BA et al. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Sci Adv.* 2015;1(5): e1400216.
- [39] Zakharkina T, Martin-Loeches I, Matamoros S et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. *Thorax.* 2017;72(9):803-10.
- [40] Kelly BJ, Imai I, Bittinger K et al. Composition and dynamics of the respiratory tract microbiome in intubated patients. *Microbiome.* 11 févr 2016;4:7.
- [41] Emonet S, Lazarevic V, Leemann Refondini C et al. Identification of respiratory microbiota markers in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2019;45(8):1082-92.
- [42] Otsuji K, Fukuda K, Ogawa M et al. Dynamics of microbiota during mechanical ventilation in aspiration pneumonia. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):260.
- [43] Woo S, Park S-Y, Kim Y et al. The Dynamics of Respiratory Microbiota during Mechanical Ventilation in Patients with Pneumonia. *J Clin Med.* 2020;9(3).
- [44] Bos LDJ, Kalil AC. Changes in lung microbiome do not explain the development of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2019;45(8):1133-5.

De la colonisation à l'infection : suivi de la composition du microbiote respiratoire et des caractéristiques microbiologiques des aspirats endotrachéaux des patients intubés-ventilés.

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est l'infection associée aux soins la plus fréquente dans les services de Réanimation et la complication infectieuse respiratoire majeure du patient intubé-ventilé. Elle fait suite à la colonisation des voies respiratoires inférieures par des bactéries de la flore oro-pharyngée, digestive ou environnementale. La transition de la colonisation vers l'infection n'est, pour l'heure, pas bien comprise mais la présence d'une dysbiose pulmonaire au cours de la ventilation mécanique (VM) suggère un rôle important du microbiote respiratoire dans sa survenue. L'objectif principal de ce travail était de mieux comprendre l'évolution du microbiote respiratoire du patient intubé-ventilé, en particulier dans le contexte des PAVM précoces (< 7 jours) à *Staphylococcus aureus*. Pour cela, dans une première étude, l'analyse quotidienne du microbiote des aspirats endotrachéaux (AET) a montré une forte variabilité inter-individuelle du microbiote au cours de la VM. Chez les patients développant une PAVM à *S. aureus*, l'augmentation de bactéries anaérobies a été observée un à deux jours avant la survenue de la PAVM, ce qui pourrait suggérer des coopérations métaboliques entre bactéries. Dans une deuxième étude, nous avons collecté l'intégralité des AET dans une cohorte homogène de patients intubés-ventilés et avons mis en évidence une augmentation significative du volume journalier des AET précédant le diagnostic de PAVM précoce, avec une spécificité de 93%. Enfin, dans une troisième étude, le séquençage de 180 génomes entiers de *S. aureus* isolés de prélèvements respiratoires de patients sous VM, a révélé une population polyclonale. L'analyse des gènes de virulence n'a pas montré de corrélation avec la survenue de PAVM précoces. A travers ces trois études, nous avons révélé des signatures microbiologiques complexes au cours de la VM, qui pourraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

Mots-clés : Pneumopathie acquise sous Ventilation Mécanique, Microbiote, Réanimation, *Staphylococcus aureus*, Microbiologie

From colonization to infection: kinetics of the respiratory microbiota and microbiological characteristics of endotracheal aspirates in mechanically ventilated patients.

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most frequent healthcare-associated infection in the ICU and the main respiratory infectious complication of mechanically ventilated (MV) patients. VAP follows the oropharyngeal, digestive or environmental bacterial colonization of the lower respiratory tract. The transition from colonization to infection is not yet fully understood. A respiratory microbiota dysbiosis has been recently shown to occur during MV, which suggests an important role of the respiratory microbiota in VAP. The goal of this PhD work was to better characterize the microbiological evolution of MV patients, particularly in early *Staphylococcus aureus* VAP (< 7 days). In a first study, analysis of daily respiratory microbiota revealed an inter-individual variability of respiratory microbiota during MV. In *S. aureus* VAP patients, the increase of some anaerobic bacteria was detected one to two days before VAP occurrence, which could suggest a metabolic cooperation between bacteria. In a second study, we collected all endotracheal aspirates (ETAs) of MV patients in a homogeneous population. We notably found a significant increase in the daily ETA volume before VAP diagnosis with a specificity of 93%. Finally, in a third study, we sequenced the whole genomes of 180 *S. aureus* isolated from respiratory samples of MV patients. We revealed a polyclonal population with no correlation between virulence profile and *S. aureus* VAP development. With these three studies, we showed complex microbiological signatures during MV, which could help to better understand early VAP pathophysiology.

Keywords: Ventilator associated Pneumonia, Microbiota, Intensive Care Unit, *Staphylococcus aureus*, Microbiology

