



HAL
open science

Évaluation et caractérisation moléculaire du microbiote respiratoire du liquide de lavage broncho-alvéolaire obtenu des patients souffrant de pneumopathie sévère de la ville d'Abidjan, Côte d'Ivoire

S. Anne-Michèle Sopi N'Chott Épse Yéré

► To cite this version:

S. Anne-Michèle Sopi N'Chott Épse Yéré. Évaluation et caractérisation moléculaire du microbiote respiratoire du liquide de lavage broncho-alvéolaire obtenu des patients souffrant de pneumopathie sévère de la ville d'Abidjan, Côte d'Ivoire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 2021. Français. NNT: . tel-04191747

HAL Id: tel-04191747

<https://hal.science/tel-04191747>

Submitted on 30 Aug 2023

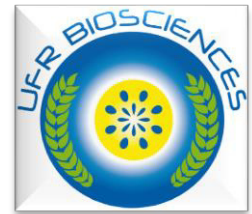
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Biologie et Santé

Année Universitaire
2020 / 2021

THÈSE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY

Spécialité : Biologie Fonctionnelle et Moléculaire
Option : Bactériologie -Biologie Moléculaire

Mme N'CHOTT SOPI ANNE-MICHELE SANDRINE Epse YÉRÉ

Numéro d'ordre
2426/2021

ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU MICROBIOTE RESPIRATOIRE DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVÉOLAIRE OBTENU DES PATIENTS SOUFFRANT DE PNEUMOPATHIE SÉVÈRE DE LA VILLE D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE

Commission du jury

Mme FAYE-KETTE Hortense	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
Mme KACOU-N'DOUBA Adèle	Professeur Titulaire	UFHB	Co-directeur
M. BLA Kouakou Brice	Maître de Conférences	UFHB	Rapporteur
Mme M'BENGUE Gbonon Valérie	Maître de Recherches	IPCI	Rapporteur
M. AKPA Eric Essoh	Maître de Conférences	UFHB	Examinateur

Soutenu publiquement
Le 01/07/2021

DÉDICACES

A mon père, N'CHOTT Bedah Théophile Désiré Sylvestre

Je voudrais te remercier pour cette éducation que tu m'as inculquée. J'ose croire que ce modeste travail t'apportera joie et fierté. Puisse Dieu le Tout Puissant t'accorder une longue vie et la santé afin de jouir du fruit des lourds sacrifices consentis.

A ma mère, AHOU- N'CHOTT Monchi Joséphine

Femme courageuse, exemplaire et dévouée à la famille, tu n'as jamais cessé de nous exhorter au travail. La réussite de tes enfants a toujours été ton principal souci. Tes conseils, ta présence et tes prières m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Je te remercie de l'infinie tendresse que tu as toujours eue à notre égard. Que Dieu t'accorde une longue vie ainsi que la santé pour que tu puisses savourer les fruits de ce travail abattu.

A mon frère et à mes sœurs : Evrard, Nadège, Rolande, Edith et Ange

Vous n'avez jamais douté de moi, m'avez aidé et encouragé tout au long de mes études. Puisse ce travail vous servir d'exemple et de défi. Il n'y a pas de difficultés insurmontables. Je souhaite à chacun de réussir dans la voie que vous vous êtes tracée. Ce travail vous est dédié en témoignage de notre grande affection.

A mon époux, YÉRE Tapouh Saint-Jeannot

Tu as été mon soutien dans les moments difficiles. Quand je n'avais plus d'espoir, tu as su trouver les mots pour me reconforter. Je ne serai pas arrivée là sans ton appui inconditionnel. Tu es merveilleux et très exceptionnel. Tu as cru en moi et voici maintenant le fruit de ce travail qui est aussi le tien. Merci mon amour de m'avoir soutenu dans cette aventure.

A ma fille, YÉRE Ketura Princesse Yannice

Que Dieu te bénisse et te donne l'intelligence d'atteindre ce niveau et bien plus encore. C'est pour toi que je me bats afin de te donner un avenir meilleur. Maman t'aime très fort.

AVANT- PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Santé de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny sous la direction scientifique des Professeurs **Djaman Allico Joseph**, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie à l'UFR Biosciences de l'UFHB de Cocody, Chef du département de Biochimie médicale et fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et **Kacou- N'douba Adèle**, Professeur Titulaire de Bactériologie-virologie à l'UFHB de Cocody, Responsable de l'Unité Pédagogique de Microbiologie au Département de Biologie et Sciences Fondamentales à l'UFR des Sciences Médicales d'Abidjan, Chef de Service de Biologie Médicale au CHU d'Angré,

Nous avons bénéficié de la collaboration de l'Unité de Bactériologie-Virologie, de l'Unité de Biochimie Fondamentale, de l'Unité de Sérologie Bactérienne et Virale, de l'Unité des Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, site de Cocody, de la plateforme de Biologie moléculaire et du Département des virus respiratoires de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, site d'Adiopodoumé.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de l'étiologie microbienne des infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) chez les patients hospitalisés au CHU de Cocody souffrant de pneumopathie aigue sévère.

La problématique des IRAS se situe aujourd'hui partout dans le monde au niveau du diagnostic étiologique pour la prise en charge adéquate du patient. En effet, les différences dans la répartition des agents étiologies selon les pays en fonction des études menées seraient à l'origine des nombreux échecs thérapeutiques.

Ainsi, nos travaux visent à rechercher les microorganismes responsables des IRAS par des méthodes conventionnelles et moléculaires chez les adultes hospitalisés au CHU de Cocody à Abidjan, Côte d'Ivoire.

Une telle approche permettrait dans l'amélioration du diagnostic des IRAS, de proposer un algorithme de prise en charge au laboratoire vu que ces infections sont un véritable problème de santé publique dans les pays en voie de développement particulièrement en Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

Je tiens à saluer et à remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de thèse de Doctorat en me prodiguant conseils, soutiens et réconforts.

Je tiens en premier lieu à remercier Monsieur **BALLO Zié**, Maître de Conférences Agrégé de Sciences Economiques, Chercheur Senior, Cellule d'Analyse des Politiques Economiques du CIREs, Président de ladite Université de me permettre de présenter cette thèse, fruit de plusieurs années d'étude.

Je remercie chaleureusement le doyen de l'UFR Biosciences Monsieur **KOUAMELAN Paul Essetchi**, Professeur Titulaire d'hydrobiologie de m'avoir accepté dans son département et me permettre d'achever mon cursus universitaire.

Un grand merci à Monsieur **YAPI Ahoua**, Professeur Titulaire de Biologie animale, Directeur du Laboratoire Biologie et Santé de l'Unité de Formation et de Recherche Biosciences de m'avoir accepté dans son laboratoire.

Je remercie profondément Madame **DOSSO Mireille**, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie à l'UFR des Sciences médicales de l'UFHB de Cocody, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Professeur de m'avoir accueillie au sein de votre institution où j'ai pu effectuer mes travaux de master 2 et de thèse. Votre rigueur et passion pour la cause de la science en général, pour la microbiologie en particulier, votre implication dans le développement de la recherche scientifique et dans la formation des chercheurs est remarquable. Vous êtes le garant de la formation de qualité en microbiologie. Vous resterez toujours une référence en microbiologie pour les jeunes chercheurs en devenir que nous sommes. Mon souhait est que vous ayez toujours la santé afin de continuer ce dynamique travail que vous effectuez au sein de la communauté scientifique.

Ma grande gratitude va à l'endroit de Monsieur **DJAMAN Allico Joseph**, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie à l'UFR Biosciences de l'UFHB de Cocody, Chef du département de Biochimie médicale et fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Vous n'avez pas hésité un seul instant à m'accepter dans votre laboratoire pour préparer le diplôme de Thèse unique malgré vos nombreuses charges. Votre rigueur scientifique, votre contact facile et votre enthousiasme à transmettre votre savoir forcent le respect et l'admiration de tous. La qualité de vos enseignements et tous les efforts déployés pour la formation de vos étudiants sont à saluer. Cher Maître, je suis reconnaissante vis-à-vis de ce que vous avez fait pour moi. Puisse Dieu faire aboutir tous vos projets et bénir toute votre famille.

Mes sincères remerciements à Madame **KACOU-N'DOUBA Adèle**, Professeur Titulaire de Bactériologie-virologie à l'UFHB de Cocody, Responsable de l'Unité Pédagogique de Microbiologie au Département de Biologie et Sciences Fondamentales à l'UFR des Sciences Médicales d'Abidjan, Chef de Service de Biologie Médicale au CHU d'Angré et co-directeur d'avoir accepté de coencadrer mes travaux de thèse. Vous avez su m'inculquer l'amour du travail bien fait dès les premiers instants de ma formation. Je vous serai toujours reconnaissante pour avoir initié mes premiers pas en microbiologie et pour la solide base que j'ai reçue en microbiologie. Soyez-en infiniment remerciée et que toutes vos activités soient couronnées de succès par la grâce de Dieu.

Je remercie chaleureusement Madame **FAYE-KETTE Hortense Yaobla**, Professeur titulaire de Bactériologie-virologie à la faculté des sciences médicales de l'UFHB de Cocody, Chef d'unité des Agents d'infection du Tractus Génital (UA-ITG) à l'Institut Pasteur, Responsable du Département Suivi et Évaluation de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et présidente du jury de cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'acceptant comme doctorante sur le projet dont vous étiez la coordinatrice. La ponctualité et la constance dans votre travail ont fait de moi un apprenant meilleur. Dans les moments de doutes, vous avez su trouver les mots pour me relancer. Votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien dans les moments difficiles m'ont été d'un grand réconfort. Que ce travail soit pour moi une occasion de vous témoigner ma reconnaissance pour votre investissement personnel à ma formation. Que Dieu vous rende au centuple l'effort que vous avez consenti pour ma formation.

Merci à Monsieur **BLA Kouakou Brice** Maître de Conférences à l'UFHB de Cocody et rapporteur de ma thèse. Cher maître, vous avez particulièrement contribué à l'amélioration du présent manuscrit de par vos critiques constructives. Soyez en remercié vous.

Mes remerciements vont également à l'endroit de Madame **M' BENGUE Gbonon Valérie**, Maître de Recherches à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et rapporteur de ma thèse. Vous avez accepté de participer à la validation de ce travail de par vos remarques constructives, soyez en remercié.

A Monsieur **AKPA Eric Essoh**, Maître de Conférences à l'UFHB de Cocody et examinateur du jury de la présente thèse, vos critiques ont permis d'améliorer le contenu de ce manuscrit en vue de l'obtention de mon diplôme de Doctorat de Thèse Unique de l'Université Félix Hpuphouet Boigny, merci infiniment.

Merci à **Monsieur HORO Kigninlman**, Professeur titulaire de pneumologie à la faculté des sciences médicales de l'UFHB de Cocody, Chef du service des Urgences au Centre Hospitalier Universitaire de Cocody pour avoir accepté que les prélèvements se fassent au sein du service qu'il dirige.

Merci à **Madame KOUAME Elogne Clarisse**, Chargé de recherche, chef de l'unité de bactériologie clinique (UBC), responsable qualité, hygiène et biosécurité pour m'avoir accueilli à bras ouverts sans aucune hésitation dans votre unité. Vos critiques constructives et vos conseils m'ont été très précieux durant tout mon stage à l'Institut Pasteur et dans votre unité.

Merci à **Madame KACOU N'gazon Solange**, Maître de recherche et responsable de la plateforme de Biologie Moléculaire (IPCI). Recevez mes plus vifs remerciements pour avoir jugé ce travail.

Merci à **Monsieur N'GUESSAN Raymond**, Directeur de recherche, Microbiologiste clinique et Chef de l'Unité des Mycobactéries Tuberculeuses et Atypiques (UMTA), pour avoir accepté que les échantillons de crachats soient analysés dans son laboratoire.

Merci à **Monsieur KOFFI Marc-Olivier et Madame KONE Alima**, Médecins au service de pneumophtisiologie du CHU de Cocody pour m'avoir aidé dans le recrutement des patients et dans la réalisation de fibroscopie bronchique.

Merci à **Monsieur KADJO Hervé**, Attaché de recherche au Département des virus respiratoires de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour avoir accepté que les manipulations de la partie virologie de mon manuscrit se fassent dans son laboratoire.

Merci à **Monsieur N'TAKPE Marius Adagba**, Attaché de recherche au Département des virus respiratoires de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour m'avoir encadré pour les manipulations au laboratoire de virologie.

Merci à **Monsieur AKO Aristide**, Chargé de recherche à l'unité de paludologie pour ses nombreux conseils sur les recherches bibliographiques et l'analyse de données.

Merci à **Monsieur TIECOURA Bertin**, Chargé de recherche à l'unité des antibiotiques (ASSURMI) de l'Institut Pasteur pour ses conseils et la correction afin d'en améliorer le contenu.

Merci à **Monsieur ANGORA Kpangbo Etienne**, Maître assistant au Département de parasitologie-mycologie de l'UFR des Sciences pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody pour m'avoir aidé dans les analyses statistiques.

Merci **Monsieur ANNE Jean- Claude**, Chargé de recherche à l'Unité de Bactériologie Clinique pour son aide et ses conseils constructifs lors des manipulations.

Merci à **Madame KANGAH-N'GORAN Tatiana**, Attaché de recherche à l'Unité de Bactériologie Clinique pour son aide, ses conseils, son suivi durant ces années passées au sein de cette unité. Avec tout mon respect comme j'ai l'habitude de l'appeler affectueusement « maman ».

Merci à **Madame OKPO- BOYOU Sophia**, Attaché de recherche à l'Unité de Bactériologie Clinique pour son aide et ses conseils sur le travail. Tu n'as cessé de m'encourager et me motiver à terminer ce travail.

Merci à **M. TOTY Abalé**, Attaché de recherche à l'unité des antibiotiques (ASSURMI) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, pour son aide lors de la rédaction du manuscrit et pour les corrections sur la forme et le fond du travail ainsi que pour le soutien moral quand je désespérais.

Merci à **A M. OUATTARA Mohamed Baguy**, Attaché de recherche à l'unité de Production des Intrants de Laboratoire (UPIL) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Docteur pour votre assistance, vos remarques et votre soutien dans la rédaction.

Merci à **Messieurs SEVEDE Daouda, DOUMBIA Moussa et Mademoiselle KOUAKOU Viviane**, de l'Unité de Sérologie Bactérienne et Virale (USBV) de l'IPCI. Merci docteurs d'avoir accepté que les analyses sur la recherche de la sérologie VIH s'effectuent dans votre laboratoire.

Je remercie également l'ensemble du corps Enseignement de l'UPR pharmacodynamique-biochimie de l'UFR Biosciences pour l'encadrement dont j'ai bénéficié tout au long de ces années universitaires.

Merci aux Techniciens Supérieurs de l'Unité de Bactériologie Clinique: Monsieur **N'GUESSAN Florentin**, Monsieur **KOICHI Désiré**, Monsieur **AKEKE Gustave** et Monsieur **DALLO** pour leur aide, leur précieuse formation pratique à la paillasse pendant mes travaux durant ces longues années.

Merci aux Techniciens Supérieurs de la plate-forme de biologie moléculaire : Monsieur **YAVO Albert**, Madame **MAMBÉ Perpétue**, Madame **SANGARÉ Flany** et Monsieur **SYLLA Aboubacar** pour leur assistance lors de mon passage à cette plateforme pour mes manipulations.

Merci au Technicien biotechnologiste Monsieur **COULIBALY Ferilaha** et Madame **SECK-ANGU Hortense** pour m'avoir assisté au laboratoire lors des manipulations.

Merci à mes amis docteurs **TAHOU Eric**, **YAO Kouamé René**, **KOUADIO Innocent**, **YAO Djeha Rosine**, **GNONDJUI Albert**, **AKE Armande**, **N'ZI konan Sylvère**, **AYEKOUE Jules** et en particulier à ma sœur de « cœur » Dr **GADOU Victoire épouse KOUASSI BLÉ**, en souvenir des meilleurs moments passés ensemble, j'ai trouvé en toi plus qu'une amie. Tu as su m'encourager et me soutenir quand j'étais désespérée, ce travail est également le tien.

A toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à ce long travail et dont j'ai omis de citer les noms, acceptez mes remerciements et excuses.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES	I
AVANT- PROPOS	III
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIX
LISTE DES FIGURES.....	XXII
LISTE DES TABLEAUX.....	XXII
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1- Appareil respiratoire	5
1.1- Anatomie et physiologie de l'appareil respiratoire	5
1.2- Voies respiratoires supérieures ou voies aériennes supérieures	5
1.3- Voies respiratoires inférieures ou voies aériennes inférieures	5
1.3.1- Trachée	7
1.3.2- Arbre bronchique	7
1.3.3- Les poumons	7
1.4- Microbiote respiratoire	10
2- Infections respiratoires basses ou inférieures.....	10
2.1- Généralités.....	10
2.2- Pneumonie	10
2.2.1- Définition.....	10
2.2.2- Type de pneumonie.....	12
2.2.2.1- Pneumonie nosocomiale	12
2.2.2.2- Pneumonie communautaire.....	12
3- Etiologies des pneumonies.....	12
3.1- Bactéries impliqués dans les pneumonies	13
3.1.1- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
3.1.1.1- Généralités	13
3.1.1.2- Caractères morphologiques.....	13
3.1.1.3- Caractères cultureux.....	13
3.1.1.4- Caractères biochimiques	13
3.1.1.5- Epidémiologie	14
3.1.2- <i>Haemophilus influenzae</i>	14

3.1.2.1- Généralités	14
3.1.2.2- Caractère morphologique	14
3.1.2.3- Caractères cultureux.....	15
3.1.2.4- Caractères biochimiques	15
3.1.3- <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.1.3.1- Généralités	17
3.1.3.2- Caractères morphologiques.....	17
3.1.3.3- Caractères cultureux.....	17
3.1.3.4- Caractères biochimiques	17
3.1.3.5- Facteur de virulence et de pathogénicité.....	18
3.1.4- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
3.1.4.1- Généralités	18
3.1.4.2- Caractères morphologiques.....	18
3.1.4.3- Caractères biochimiques	19
3.1.4.4- Facteurs de pathogénicité et de virulence	19
3.1.5- <i>Moraxella catarrhalis</i>	19
3.1.5.1- Généralités	19
3.1.5.2- Caractères bactériologiques	19
3.1.5.3- Epidémiologie et facteur de virulence	19
3.1.6- <i>Legionella pneumophila</i>	20
3.1.6.1- Généralités	20
3.1.6.2- Caractères morphologiques.....	20
3.1.6.3- Caractéristiques culturelles	20
3.3.6.4- Epidémiologie	21
3.1.7- <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	21
3.1.7.1- Généralités	21
3.1.7.2- Caractères morphologique et structuraux	21
3.1.7.3- Caractères cultureux.....	21
3.1.7.4- Caractères biochimiques	22
3.1.7.5- Epidémiologie	22
3.1.8- <i>Chlamydomphila ou Chlamydia pneumoniae</i>	23
3.1.8.1- Généralités	23
3.1.8.2- Caractères morphologiques et structuraux	23
3.1.8.3- Caractère cultureux	23
3.1.8.4- Caractères biochimiques	24
3.1.8.5- Epidémiologie	24

3.2- Champignons impliqués dans les pneumonies: cas de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	24
3.2.1- Généralités	24
3.2.2- Epidémiologie.....	25
3.2.3- Diagnostic biologique.....	25
3.3- Virus impliqués dans les IRAS	25
3.3.1- Virus influenza.....	26
3.3.2- Virus respiratoire syncytial.....	30
3.3.3- Métapneumovirus humain	30
3.3.4- Virus Para-influenza	31
3.3.5- Coronavirus.....	31
3.3.6- Adénovirus.....	31
3.3.7- Bocavirus humain	32
3.3.8- Entérovirus.....	33
3.3.9- Rhinovirus.....	33
4- Les méthodes moléculaires	34
4.1- Extraction	34
4.2- PCR classique.....	35
4.2.1- Dénaturation initiale	35
4.2.2- Phase de dénaturation	35
4.2.3- Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces	36
4.2.4- Phase d'élongation.....	36
4.2.5- Détection.....	36
4.3- PCR quantitative ou RT-PCR en temps réel	36
MATERIEL ET METHODES.....	40
1- Matériel	41
1.1- Cadre d'étude.....	41
1.2- Type d'étude	41
1.3- Période d'étude	41
1.4- Population d'étude.....	41
1.5- Matériel biologique	41
1.6- Matériel technique.....	43
1.6.1- Matériel et réactifs pour la caractérisation phénotypique.....	43
1.6.1.1- Matériel pour l'ensemencement et l'isolement des souches bactériennes.....	43
1.6.1.2- Réactifs pour l'identification des bactéries.....	43
1.6.1.3- Matériel et réactifs pour la réalisation de l'antibiogramme	44
1.6.2- Matériel et réactifs pour la caractérisation moléculaire.....	47

2- Méthodes.....	52
2.1- Test de la sérologie au VIH.....	52
2.2- Recherche du bacille tuberculeux.....	52
2.3- Echantillonnage.....	52
2.3.1- Critères d'inclusion.....	53
2.3.2- Critères de non-inclusion.....	53
2.4- Collecte et analyses des données.....	53
2.5- Considérations éthiques.....	53
2.6- Identification des bactéries par les méthodes conventionnelles.....	53
2.6.1- Examen microscopique et coloration de Gram direct des échantillons de LBA.....	54
2.6.2- Ensemencement.....	54
2.6.3- Etude bactériologique.....	55
2.6.3.1- Recherche des enzymes respiratoires.....	55
2.6.3.1.1- Test de recherche de l'oxydase.....	55
2.6.3.1.2- Test de la recherche à la catalase.....	55
2.6.3.1.3- Recherche de la coagulase.....	56
2.6.3.3.4- Test de recherche de désoxyribonucléase (ADNase).....	56
2.6.3.3.5- Test d'optochine.....	57
2.6.3.2- Tests d'identification biochimiques.....	57
2.6.3.2.1- Utilisation du citrate de simmons.....	57
2.6.3.2.2- Détermination de la production d'uréase et d'indole.....	57
2.6.3.4.3- Milieu Lysine- fer.....	58
2.6.3.4.4- Milieu kligler- hajna.....	58
2.6.3.3- Test complémentaire : Test de mobilité.....	59
2.6.3.4- Traitement avec les antimicrobiens.....	59
2.6.3.4.1- L'antibiogramme.....	59
2.6.3.4.2- Préparation de l'inoculum bactérien.....	59
2.6.3.4.3- Ensemencement de la gélose Mueller Hinton MH et Mueller Hinton F.....	59
2.6.3.4.4- Pose des disques et pré diffusion des antibiotiques.....	60
2.6.3.4.5- Lecture et interpretation d'antibiogramme.....	60
2.6.3.4.6- Détection de la production des β -lactamase à spectre élargi (BLSE).....	60
2.7- Extraction et amplification du matériel génétique des agents pathogènes.....	61
2.7.1- Extraction et amplification d'ADN des bactéries.....	61
2.7.2- Extraction et amplification de l'ADN de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	64
2.7.3- Extraction et amplification de l'ARN et l'ADN viral.....	65
RESULTATS.....	69

1- Caractéristiques de la population	70
1.1- Fréquence des infections respiratoires aiguës sévères	70
1.2- Répartition des patients selon l'âge.....	70
1.3- Répartition des patients selon le genre	70
1.4- Caractéristiques socio-économiques des patients.....	70
1.5- Saisons de survenue.....	70
2- Sérologie VIH	73
2.1- Age et statut VIH.....	73
2.2- Sexe et statut VIH.....	73
3- Identification des bactéries dans le LBA	75
3.1- Identification phénotypique des bactéries par la méthode de culture	75
3.2- Identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
3.3- Distribution des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> selon le sexe et l'âge.....	77
3.4- Identification de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	77
3.5- Profil de sensibilité des bactéries isolées aux antibiotiques	77
3.5.1- Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques	77
3.5.1.1- β -lactamines	77
3.5.1.2- Résistance des souches aux aminosides.....	80
3.5.1.3- Résistance des souches aux fluoroquinolones	80
3.5.1.4- Les autres antibiotiques.....	80
3.5.2- Résistance de la souche de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aux antibiotiques	80
4- Détection des agents pathogènes respiratoires par PCR multiplex.....	80
4.1- Détection et identification des bactéries par PCR multiplex en temps réel	80
4.2- Comparaison de la culture et de la PCR.....	82
4.3- Détection et identification de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel	82
4.3.1- Age et détection de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	82
4.3.2- Détection de <i>Pneumocystis jirovecii</i> selon le sexe et l'âge	85
4.3.3- Classification des patients atteints de <i>Pneumocystis jirovecii</i> et leur statut sérologique VIH.....	Erreur ! Signet non défini.
4.3.4- Détection de <i>Pneumocystis jirovecii</i> en fonction des saisons climatiques	85
4.4- Virus respiratoires	87
4.4.1- Répartition des virus respiratoires en fonction de l'âge et du sexe	87
4.4.2- Répartition des virus respiratoires en fonction des saisons	87
4.4.3- Détection et identification des virus respiratoires par PCR multiplex en temps réel ...	87
4.5- Détection de l'étiologie de la pneumonie dans le LBA.....	87
DISCUSSION	92

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
ANNEXES	125
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	135

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNase	:	Acide désoxyribonucléase
ADV	:	Adénovirus
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
ARNr	:	Acide ribonucléique ribosomique
BCC	:	Bouillon cœur cervelle
BCYE	:	Buffered charcoal yeast extract (Extrait de levure de charbon tamponné)
BLSE	:	β -lactamase à spectre étendu
BoV	:	Bocavirus
°C	:	Dégré celsius
CA-SFM	:	Comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie
CE	:	Corps élémentaire
C.H.U	:	Centre Hospitalier Universitaire
CO₂	:	Dioxyde de carbone
CoV	:	Coronavirus
CR	:	Corps réticulé
DNTP	:	Désoxynucléotidetriphosphate
DO	:	Densité optique
EMB	:	Eosine Bleu de Méthylène
FTD	:	Fast track diagnostic
GSC	:	Gélose au sang cuit
GSF	:	Gélose au sang frais
HA	:	Hémagglutinine

HBoV	:	Bocavirus humain
IRA	:	Infections respiratoires aiguës
IRAS	:	Infections respiratoires aiguës sévères
LBA	:	Liquide de lavage broncho-alvéolaire
MH	:	Gélose Muller Hinton
MPVH	:	Métopneumovirus humain
NA	:	Neuraminidase
NP	:	Nucléoprotéine
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
PAC	:	Pneumopathies Aiguës Communautaires
PCR	:	Réaction en chaîne de polymérisation
PIV	:	Virus Para-influenzae
PPH	:	Pneumophtisiologie
RNP	:	Ribonucléopoteine
RT-PCR	:	Retro-transcriptase inverse de la réaction en chaîne de polymérisation
Taq	:	Thermus aquaticus
UFC	:	Unité formant colonie
VIH	:	Virus de l'immuno déficience humain
VRS	:	Virus respiratoire syncytial

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma des voies respiratoires inférieures (Seikel <i>et al.</i> , 2010)	6
Figure 2: Arbre broncho- pulmonaire (Huchon, 2000)	8
Figure 3: Anatomie des poumons (Loubna et Bahaeddine, 2018)	9
Figure 4: Etat des sacs alvéolaires en cas de pneumonie (Halima, 2015).....	11
Figure 5: Représentation schématique du virus influenza A ou B (Krammer <i>et al.</i> , 2018).....	28
Figure 6 : Cycle de réplication du virus influenza (Medina et García-sastre, 2011).....	29
Figure 7: Principe de la sonde d'hydrolyse ou TaqMan (Dubosson, 2011).....	38
Figure 8 : Organigramme de recrutement des patients adultes atteints de pneumonie	42
Figure 9: Répartition des cas des pneumopathies selon le sexe.....	71
Figure 10: Incidence de survenue des cas de pneumonie selon les saisons climatiques.....	72
Figure 11: Classification des patients selon les tranches d'âge et le statut sérologique	74
Figure 12: Répartition des résultats de la culture en fonction de l'âge	76
Figure 13: Comparaison des résultats de la PCR bactériologique en fonction de l'âge	83
Figure 14 : Répartition des taux de détection des virus en fonction des tranches d'âge.....	88
Figure 15: Répartition des virus détectés selon les saisons climatiques en Cote d'Ivoire.....	88
Figure 16: Proportion des microorganismes chez les patients de l'étude	91
Figure 17: Algorithme du diagnostic microbiologique des IRAS selon l'étude	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractères biochimiques d' <i>Haemophilus</i> (Sampo, 2013).	16
Tableau II: Méthodes moléculaires utilisées pour les diagnostics (Olofsson et al., 2011).....	39
Tableau III: Liste des antibiotiques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> CA-SFM, 2016	45
Tableau IV: Liste antibiotiques pour <i>Streptococcus pneumoniae</i> CA-SFM, 2016	46
Tableau V: Différents constituants du kit Fast Track Diagnostic bacterial pneumonia_CAP	48
Tableau VI: Bactéries recherchées et gènes ciblés	49
Tableau VII: Amorces et sondes utilisées pour la recherche des virus respiratoires	50
Tableau VIII: Amorces, sondes et colorants des sondes du kit Fast Track Diagnostic et du thermocycler.....	63
Tableau IX: Virus respiratoires détectés par le kit Invitrogen Superscript [®] III	66
Tableau X: Préparation du mélange réactionnel pour les virus à ARN.....	67
Tableau XI: Préparation du mélange réactionnel pour les virus à ADN	67
Tableau XII: Informations sur les patients	71
Tableau XIII: Répartition des patients selon la profession	72
Tableau XIV: Répartition des patients en fonction du statut sérologique VIH et du genre	74
Tableau XV: Comparaison des résultats de la culture et du sexe des patients de l'étude	76
Tableau XVI: Niveau de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	78
Tableau XVII: Profil de sensibilité des souches de <i>K. pneumoniae</i> et <i>S. pneumoniae</i>	79
Tableau XVIII: Résultat des bactéries détectées par la méthode de PCR multiplex en temps réel .	81
Tableau XIX: Comparaison des résultats de la culture et de la PCR multiplex	83
Tableau XX: Résultat des méthodes PCR temps réel et de culture	84
Tableau XXI: Répartition de <i>Pneumocystis jirovecii</i> en fonction des tranches d'âge des patients .	84
Tableau XXII: Répartition de <i>Pneumocystis jirovecii</i> en fonction du statut VIH des patients.....	86
Tableau XXIII: Répartition des virus mis en évidence par la PCR	89
Tableau XXIV: Flore du microbiote respiratoire de tous les patients inclus dans l'étude	89

INTRODUCTION

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont des pathologies très fréquentes, touchant aussi bien les adultes que les enfants (**Dorin, 2012**). Elles comptent parmi les principales causes d'hospitalisation et de décès dans le monde (**Razanajatovo et al., 2018**). Leur évolution est potentiellement grave selon leur localisation au niveau de l'arbre respiratoire (**Dorin, 2012**). Ces infections respiratoires peuvent se présenter sous deux formes cliniques : Les formes aiguës et les formes aiguës sévères encore appelées infections respiratoires aiguës sévères (IRAS).

Ces infections respiratoires aiguës sévères se scindent en infections hautes et basses en fonction de leur localisation au niveau de l'arbre respiratoire (**Dorin, 2012**). La pneumopathie est la forme la plus grave de l'ensemble des infections respiratoires basses (**Delmont et al., 2016**). Elle est une maladie du parenchyme pulmonaire distal aux bronchioles terminales causée par une infection des bactéries, des virus, des champignons et moins fréquemment par des parasites (**Peto et al., 2014**). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que les infections respiratoires aiguës provoquent environ 4 millions de décès annuels, soit plus de 60 décès pour 100 000 habitants (**Hatem et al., 2019**). Ainsi, en Côte d'Ivoire, le taux de décès associé aux pneumonies et en particulier aux IRAS est passé de 32,5% à 36% (**Horo et al., 2012**). Par ailleurs, dans la plupart des pays à faible revenu, il existe peu de données sur le fardeau de la pneumopathie chez les adultes malgré une augmentation du nombre de cas (**Micek et al., 2014**). Certains facteurs favorisent la survenue des IRAS tels que la pauvreté, l'hygiène, la promiscuité (**Ngombe, 2014**). De même, les adultes de 65 ans et plus, les femmes enceintes et les personnes souffrant de maladies chroniques présentent un risque élevé de complications pouvant entraîner une hospitalisation et la mort (**Barnes et al., 2018**).

La pneumopathie est une maladie mortelle nécessitant une identification rapide de l'agent pathogène et une intervention thérapeutique afin de contrôler la gravité de l'infection. Anciennement dénommé « flore » bactérienne ou fongique, le microbiote est l'ensemble des micro-organismes constitutifs d'un milieu donné (**Egron, 2014**). Etant donné que tous les microorganismes présents dans les voies respiratoires basses représentent des agents étiologiques potentiels, il est nécessaire de détecter les microorganismes du microbiote qui pourraient être difficilement cultivables (**Rogers et al., 2015**). Il faut aussi souligner le défi d'obtenir des échantillons appropriés des voies respiratoires basses pour les diagnostics car les prélèvements de ce type sont des prélèvements invasifs ce qui compliquent la détermination de l'étiologie microbienne des IRAS. Cela a conduit à une augmentation de la morbidité, de la mortalité et à la mauvaise gestion des patients atteints de pneumopathie (**Welte, 2012**).

Le diagnostic étiologique des IRAS qui conditionne une prise en charge thérapeutique adéquate du patient reste donc un problème et un défi majeur de santé publique dans le monde en général, et en Afrique en particulier car malgré l'utilisation de techniques moléculaires, 37% des IRAS restent sans étiologies (Verani *et al.*, 2013). En dépit des nombreux progrès qui ont été effectués aussi bien en matière de diagnostic et de traitement, le pronostic des pneumonies nosocomiales reste sombre, essentiellement du fait de la gravité de la maladie sous-jacente (Attig, 2017).

Plusieurs études ont révélé des différences dans la distribution des agents responsables des IRAS selon les pays (Micek *et al.*, 2014). En effet, ces différences d'étiologie peuvent entraîner une réponse médiocre au traitement choisi pour couvrir les agents pathogènes courants dans les études réalisées dans les pays à revenu élevé (Holter *et al.*, 2015). Par conséquent, la connaissance des agents étiologiques des IRAS au niveau local est essentielle pour prendre des décisions rationnelles concernant le traitement.

Les germes couramment rencontrés sont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae type b* (Hib), le virus respiratoire syncytial (VRS) et *Pneumocystis jirovecii* (Aubry et Gauzère, 2021). Récemment, les avancées de l'analyse de l'ADN ont permis de connaître de nouveaux germes qui donnent les maladies bactériennes, virales, parasitaires qu'on n'arrivait pas à voir avec les anciennes méthodes de diagnostic.

En Côte d'Ivoire, seuls des données sur la tuberculose sont disponibles comme cause des IRAS. Peu de données sur les étiologies microbiennes des IRAS n'ont été abordées. Malheureusement le diagnostic de ces infections repose encore sur l'aspect clinique. C'est pourquoi, l'amélioration du diagnostic étiologique par l'approche moléculaire est importante. D'où l'intérêt de cette étude dans laquelle nous avons formulé la question suivante du fait de la forte morbidité et mortalité des IRAS en Côte d'Ivoire, il paraît opportun de savoir comment améliorer le diagnostic de ces infections par des techniques de microbiologie conventionnelles et moléculaires ?

Pour répondre à cette question, notre objectif principal était de déterminer la diversité des microorganismes responsables des IRAS chez les adultes en Côte d'Ivoire par des méthodes de microbiologie conventionnelles associées aux méthodes de microbiologie moléculaires.

Des objectifs spécifiques ont été assignés. Il s'agit de :

1. Identifier les bactéries dans le liquide lavage broncho-alvéolaire
2. Mettre en évidence *Pneumocystis jirovecii* par les techniques de biologie moléculaire
3. Détecter les virus par les techniques de biologie moléculaire de PCR multiplex en temps réel.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Appareil respiratoire

1.1- Anatomie et physiologie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est l'ensemble des organes assurant les premières étapes de la respiration (**Jeuge-Maynard *et al.*, 2010**). Il est composé des voies respiratoires supérieures et inférieures qui assurent la ventilation. Chaque partie a ses propres propriétés anatomiques. Par ordre, de l'extérieur vers l'intérieur, les principales structures du tractus respiratoire sont :

- Le tractus respiratoire supérieur qui est constitué des narines, des cavités nasales, du pharynx, du larynx et de la trachée (**Sonké, 2017**).
- Le tractus respiratoire profond qui est constitué des bronches et des poumons (**Colville et Bassert, 2016**).

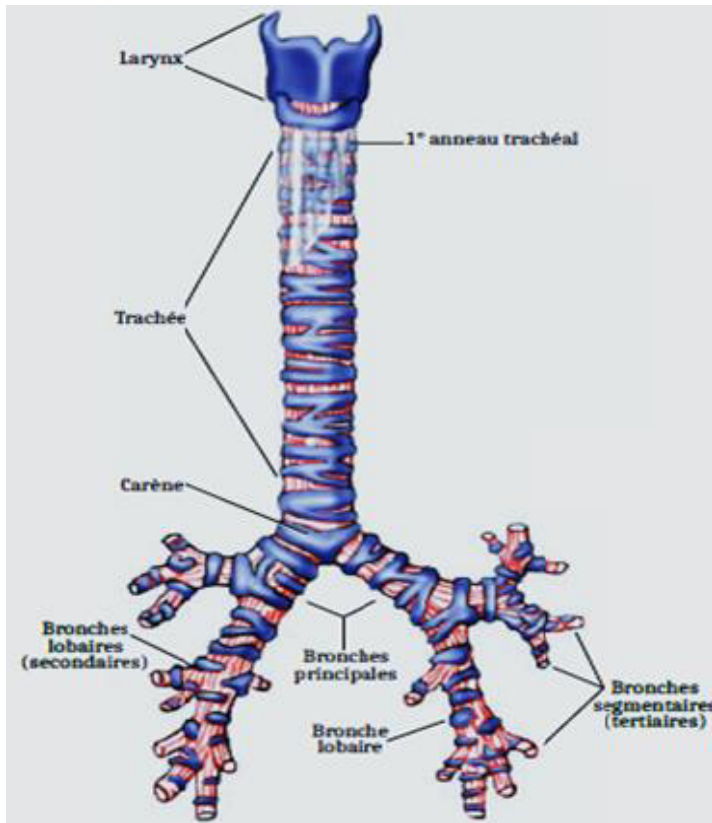
1.2- Voies respiratoires supérieures ou voies aériennes supérieures

Les voies respiratoires supérieures sont extra thoraciques. Elles sont constituées des fosses nasales, de la bouche, du pharynx, du larynx support des cordes vocales, de la trachée artère (cartilagineuse), de la luette, de l'épiglotte, de la glotte, des sinus (**Sonké, 2017**).

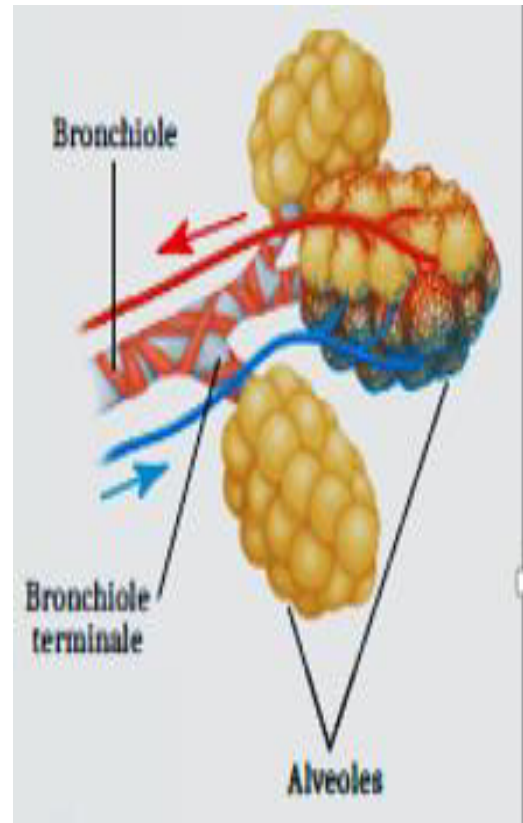
1.3- Voies respiratoires inférieures ou voies aériennes inférieures

Les voies respiratoires inférieures sont intra thoraciques et sont réparties en 2 zones qui sont la zone de conduction et la zone de transition. Les voies extra pulmonaires comprennent la trachée et les voies intra pulmonaires comprennent les bronches. La zone respiratoire comprend les conduits, les sacs alvéolaires et les alvéoles pulmonaires (**Sanogo, 2010**).

Les voies respiratoires inférieures se divisent en bronches lobaires (secondaire) puis en bronches tertiaires de diamètre de plus en plus petit. Quand les voies aériennes inférieures deviennent de diamètre inférieur à un millimètre, le cartilage disparaît et ces voies seront appelées bronchioles. Ces bronchioles pénètrent éventuellement dans des sacs alvéolaires qui contiennent des sacs aériens appelés alvéoles. C'est à cet endroit que se fait l'échange des gaz avec le sang. Certaines bronchioles ont des alvéoles dans leurs parois, pour cela, elles sont appelées bronchioles respiratoires (**Djebili, 2017**). Les voies aériennes inférieures se prolongent par la trachée et les nombreuses bifurcations bronchiques jusqu'aux alvéoles (**Figure 1**).



A



B

Figure 1: Schéma des voies respiratoires inférieures (Seikel *et al.*, 2010)

(A) : Vue schématique des voies aériennes inférieures

(B) terminaisons alvéolaires

1.3.1- Trachée

La trachée est un tube cylindrique qui s'étend du larynx à la bifurcation bronchique. Elle est formée par une série de cartilages trachéaux en forme de « c » qui lui procure sa rigidité. Ces 12 cartilages sont reliés entre eux par des ligaments annulaires qui rendent la trachée flexible. La partie dorsale de la trachée est complétée par le muscle trachéal. Ce muscle lisse affecte sur le diamètre de la trachée (**Djebil, 2017**).

1.3.2- Arbre bronchique

L'arbre bronchique est un composé de divisions successives asymétriques à partir de la bifurcation trachéale c'est-à-dire fait de haut en bas de bronches souches, de bronches lobaires, de bronches segmentaires, de bronches sub-segmentaires, de bronchioles, de bronchioles terminales, de bronchioles respiratoires, de conduits alvéolaires et d'alvéoles pulmonaires (**Sanogo, 2010**). L'ensemble des ramifications, appelé arbre bronchique forme une structure hiérarchique complexe maximisant les surfaces d'échange où oxygène, gaz carbonique et vapeur d'eau essentiellement migrent vers le réseau de capillaires sanguins (**Hartenstein et Silva, 2018**) (**Figure 2**).

1.3.3- Les poumons

Les poumons sont en nombre de deux localisées dans le thorax. Chaque poumon est de forme conique. La base est la partie caudale du poumon reposant sur le diaphragme et l'apex est la partie crâniale située à l'entrée du thorax. Le hile du poumon est la partie médiane où les bronches principales, les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les nerfs entrent et sortent du poumon. Les lobes du poumon sont définis par la présence des bronches lobaires (secondaires), ils sont distingués par la présence de fissures profondes dans la partie ventrale du poumon (**Akers et Denbow, 2013**). Les poumons sont entourés par une membrane séreuse dite la plèvre (membrane pleurale) constituée de deux couches. La couche qui tapisse la cavité thoracique est la couche pariétale et celle qui adhère au poumon est la couche viscérale. L'espace entre les deux couches contient le liquide pleural qui permet le glissement des deux couches durant la respiration. L'artère pulmonaire transporte le sang désoxygéné provenant du cœur vers le poumon, et la veine pulmonaire transporte le sang après son oxygénation du poumon vers le cœur (**Akers et Denbow, 2013**) (**Figure 3**).

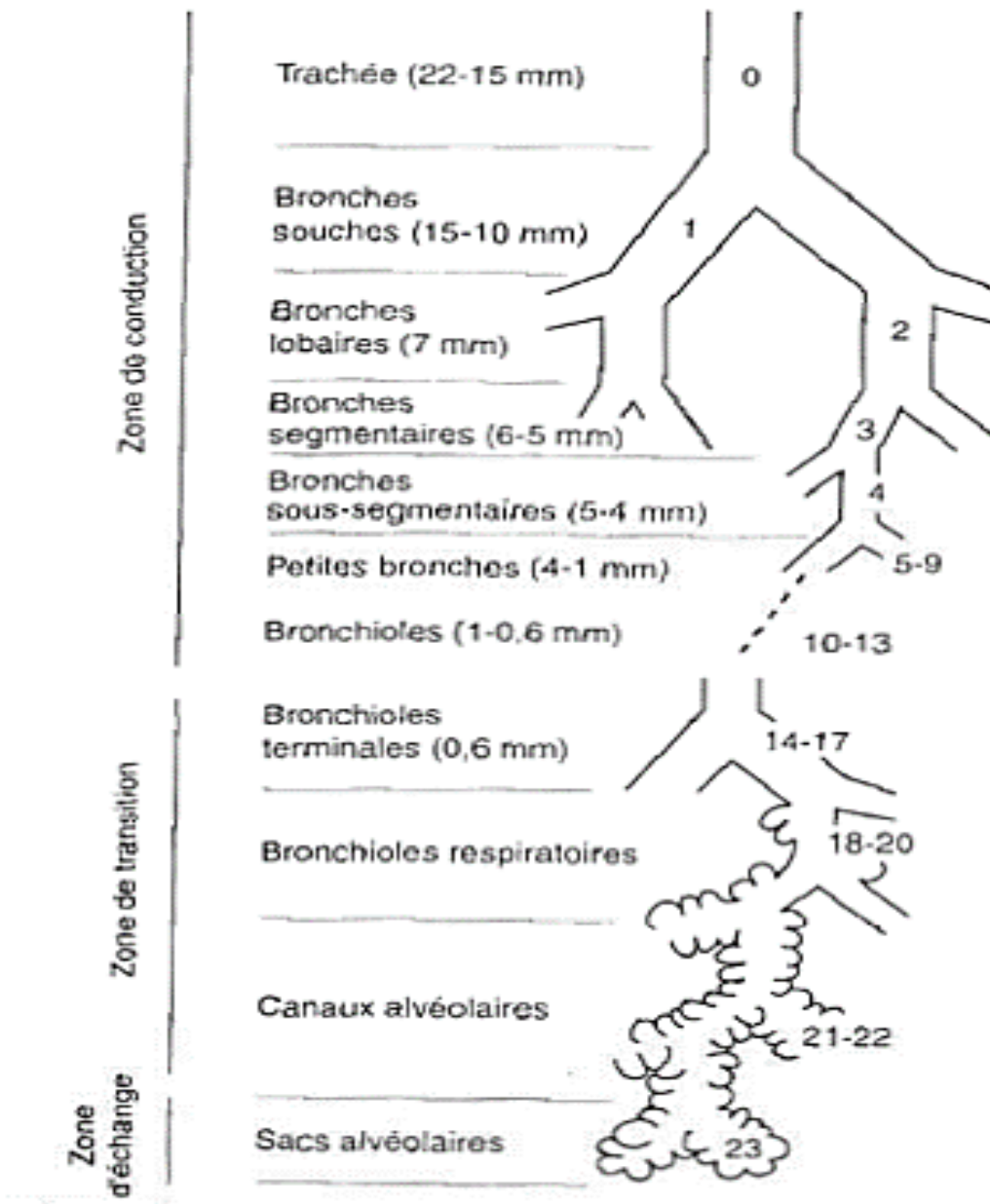


Figure 2: Arbre broncho- pulmonaire (Huchon, 2000)

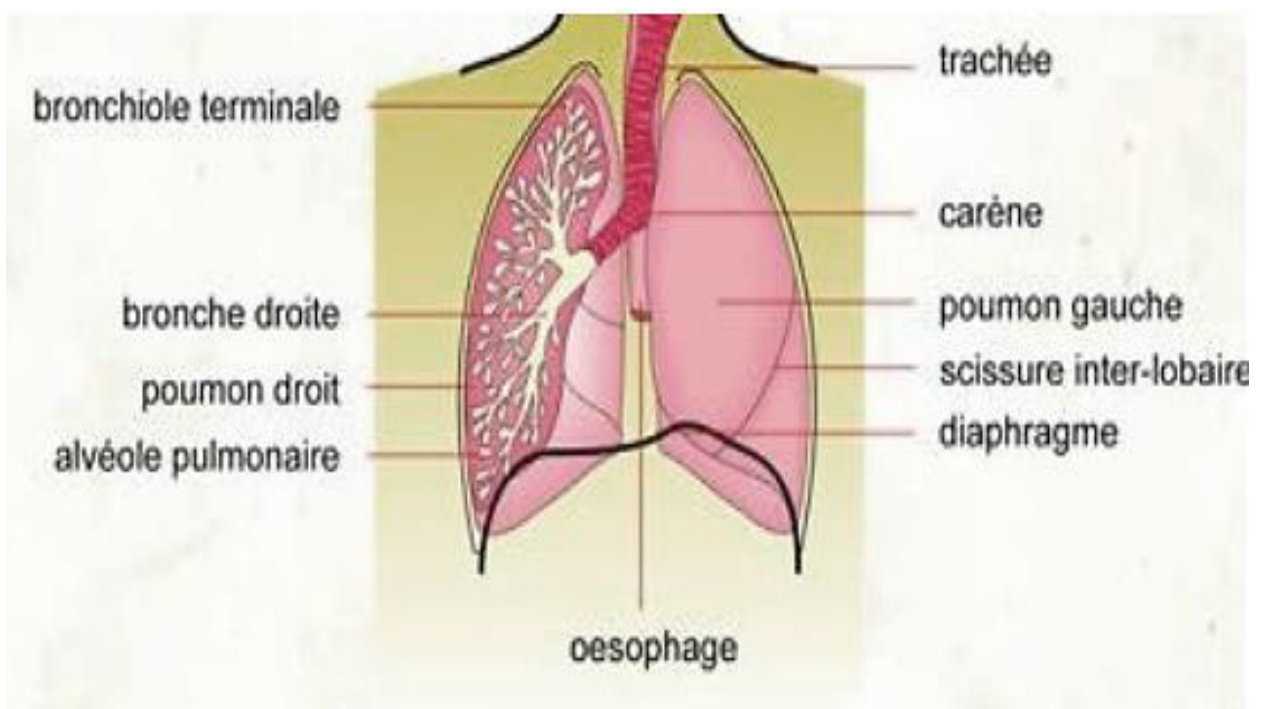


Figure 3: Anatomie des poumons (Loubna et Bahaeddine, 2018)

1.4- Microbiote respiratoire

Le microbiote désigne l'ensemble des populations de microorganismes définis par leur espèce et leur genre. Le microbiome est le microbiote défini par son génome, appelé métagénome et étudié par des méthodes de métagénomique quantitative. Le rôle du microbiote peut s'entendre d'une part de façon restreinte comme la somme des fonctions de chaque groupe de micro-organismes et d'autre part en tant qu'il exerce par son dynamisme global un effet sur son hôte (**Lamoureux, 2016**). Des études ont depuis lors démontré que la région respiratoire inférieure est remplie de diverses communautés de bactéries dans la santé et dans les états de maladie (**Dickson *et al.*, 2013**). Ainsi, la région respiratoire n'est pas un site stérile et la composition du microbiote indigène évolue par rapport aux facteurs tels que l'environnement hormonal, les perturbations écologiques, et l'utilisation d'antimicrobien (**Dickson et Huffnagle, 2015**). La plupart des analyses du microbiome du poumon ont été exécutées sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) (**Dickson *et al.*, 2013**).

2- Infections respiratoires basses ou inférieures

2.1- Généralités

Les infections respiratoires aiguës des voies inférieures y compris les infections des poumons et des alvéoles (pneumonie) et des voies respiratoires (bronchite et bronchiolite), sont l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les enfants et les adultes dans le monde (**Horne *et al.*, 2018**). Elles sont des affections bactériennes, virales, parasitaires ou mycosiques qui touchent l'appareil respiratoire en dessous de la glotte et occupent le 4^{ème} rang parmi les principales causes de mortalité dans le monde (**OMS, 2018**).

2.2- Pneumonie

2.2.1- Définition

La pneumonie est une infection aiguë du parenchyme pulmonaire par des agents pathogènes, à l'exclusion de l'affection bien définie de la bronchiolite, dont la principale cause est presque toujours un agent viral (**Mackenzie, 2016**). Les poumons renferment des milliers de conduits (les bronches), subdivisés en ramifications plus petites (les bronchioles) qui se terminent par de petits sacs (alvéoles) ces derniers sont irrigués par des capillaires qui permettent au sang de se charger en oxygène et d'éliminer le dioxyde de carbone. En cas de pneumonie, les alvéoles de l'un ou des deux poumons se remplissent de pus et de liquide (**Figure 4**) ce qui diminue l'absorption d'oxygène et gêne la respiration (**OMS, 2014**).

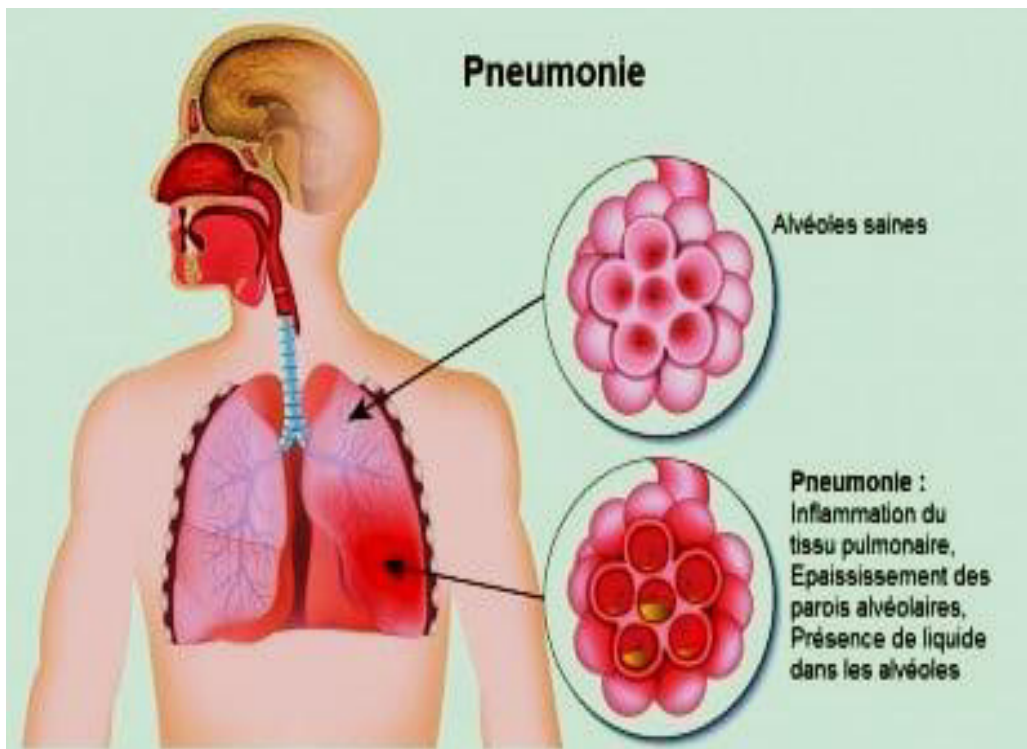


Figure 4: Etat des sacs alvéolaires en cas de pneumonie (Halima, 2015)

2.2.2- Type de pneumonie

On distingue essentiellement deux types de pneumopathies : les pneumopathies nosocomiales, c'est à dire acquises à l'hôpital et les pneumopathies communautaires ou extrahospitalières.

2.2.2.1- Pneumonie nosocomiale

Une pneumonie nosocomiale est une infection pulmonaire survenant chez un patient hospitalisé, indemne d'infection patente ou en cours d'incubation au moment de l'admission. Un délai d'apparition de 48 à 72 h est généralement admis pour affirmer le caractère nosocomial de l'infection (**Madi et Djema, 2019**). Elle est généralement provoquée par des bactéries, les plus fréquentes sont les pneumocoques, les streptocoques, les staphylocoques, les légionnelles et l'*Haemophilus influenzae* (**Khallouf, 2017**). Le diagnostic des pneumopathies nosocomiales est posé devant l'apparition des signes cliniques et biologiques, d'une image radiologique nouvelle ou aggravée. Il est confirmé par l'examen bactériologique des sécrétions bronchiques, par le brossage endobronchique et le lavage broncho-alvéolaire. Il permet aussi de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de l'agent pathogène en cause, et ainsi d'adopter l'antibiothérapie appropriée (**Jaton et al., 2014**).

2.2.2.2- Pneumonie communautaire

La pneumopathie aiguë communautaire (PAC), définie comme une infection respiratoire basse avec atteinte du parenchyme pulmonaire d'évolution aiguë, est dite communautaire si elle est acquise en milieu extra-hospitalier ou si, à l'hôpital, elle survient avant la 48^{ème} heure suivant l'admission (**Berdyev et al., 2011**). Elles représentent la sixième cause de mortalité et la première d'origine infectieuse dans les pays industrialisés (**Bekka et Bekka, 2019**). Les agents pathogènes responsables de ces infections sont nombreux et la preuve bactériologique n'est pas toujours faite (**Bekka et Bekka, 2019**).

3- Etiologies des pneumonies

La pneumonie est causée par un certain nombre d'agents infectieux, bactéries, virus ou champignons.

3.1- Bactéries impliquées dans les pneumonies

3.1.1- *Streptococcus pneumoniae*

3.1.1.1- Généralités

S. pneumoniae couramment appelé pneumocoque, fut isolé pour la première fois par Pasteur en 1881 dans la salive d'un enfant mort de la rage. En 1883, Talamon reconnaît en ce germe l'agent responsable de pneumonie. En effet c'est l'agent infectieux le plus retrouvé dans les pneumonies bactériennes (**Decastro et Molina, 2011**). Il s'agit d'un commensal des voies aériennes supérieures et sa transmission se fait par contact direct avec les sécrétions respiratoires (**Cherkaoui, 2018**).

3.1.1.2- Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, le streptocoque est une bactérie aéro-anaérobie facultatif, un cocci Gram positif, généralement capsulé (halo clair autour de la bactérie), d'allure lancéolée (en flamme de bougie), typiquement groupé par deux, immobiles et dépourvus de spores (**Cherkaoui, 2018**).

3.1.1.3- Caractères cultureux

Ce sont des germes très fragiles. La température idéale de croissance est de $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Les streptocoques peuvent pousser sur des milieux usuels mais néanmoins, ils ont des exigences nutritives très complexes. Les milieux les plus généralement utilisés sont les géloses enrichies au sang (sang de mouton ou de cheval). Ces milieux permettent de voir la capacité des streptocoques à lyser les hématies (**Belkorane et Toumi, 2016**). Les colonies apparaissent au bout de 24 à 48 heures (**Sampo, 2013**). Ce germe nécessite des conditions d'anaérobiose ou tout au moins une atmosphère enrichie en CO_2 à 5% (**Hecini- Hannachi, 2014**). Les pneumocoques se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, lisses, bombées, brillantes. Ils développent une hémolyse partielle de type alpha avec un verdissement du milieu, comme les streptocoques *viridans*. Les pneumocoques en culture sont sujets à une autolyse spontanée ; une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse (**Hecini- Hannachi, 2014**).

3.1.1.4- Caractères biochimiques

S. pneumoniae ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de l'eau oxygénée responsable en partie de son autolyse (**Sampo, 2013**).

Le pneumocoque est sensible à l'optochine (ethylhydrocupreine) et aux sels biliaires, contrairement aux autres streptocoques. Ce germe fermente le glucose, le lactose, le raffinose (**Sampo, 2013**), le maltose, le lévulose, pousse sur la gélatine sans la liquéfier (**Hecini- Hannachi, 2014**). Il ne fermente en revanche pas l'arabinose, la xylose, le dulcitol, l'inositol ou encore le sorbitol.

3.1.1.5- Epidémiologie

La niche écologique naturelle de *S. pneumoniae* est le nasopharynx de l'homme (**Saïdani, 2010**). Il s'agit d'un commensal des voies aériennes supérieures de l'homme et sa transmission se fait par contact direct avec les sécrétions respiratoires (**Decastro et Molina, 2011**). Bien que sa contagiosité soit considérée comme faible puisqu'il n'est pas recommandé d'isoler les patients, des petites épidémies dans un contexte de promiscuité ont été décrites (**Balicer et al., 2010**). Dans tous les pays, le sexe masculin, à tout âge est plus touché par les infections pneumococciques (**Saïdani, 2010**). L'incidence des infections streptococciques varie avec l'âge, la zone géographique, le niveau socioéconomique et la saison. Cette incidence est liée aussi directement aux propriétés biologiques du germe (**Belkorane et Toumi, 2016**).

3.1.2- *Haemophilus influenzae*

3.1.2.1- Généralités

Haemophilus influenzae type b a été isolé pour la première fois par Robert Koch en 1883 quand il décrivait de petits bacilles dans le pus des patients ayant une conjonctivite. Jusqu'en 1933 date de la découverte du virus de la grippe, l'*Haemophilus* était considéré comme l'agent étiologique de la grippe en raison de l'observation par Pfeiffer de bacilles dans les crachats de sujets atteints de la grippe lors des pandémies de 1889 à 1892 (**Tiecoura, 2011**). Cependant, la découverte du virus de la grippe humaine a permis de dire qu'*H.influenzae* type b était la principale cause de complications de la surinfection pulmonaire aggravant l'infection virale. Les *Haemophilus* font partie de la flore normale des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'homme. Ce sont des parasites obligatoires qui font parties de la flore des voies aériennes supérieures de l'homme (**Tiecoura, 2011**).

3.1.2.2- Caractère morphologique

H.influenzae est un petit bacille de 0,3 à 0,4 µm de diamètre et 1,5 µm de long, très polymorphe, souvent coccobacillaire, immobile non sporulé et parfois capsulé. *H.influenzae* est un bacille à gram négatif (**Larabi et Louadj, 2015**). Il se présente sous forme de bâtonnet le plus souvent groupés en petits amas, comparable à des bancs de poissons suivant le fil de l'eau.

3.1.2.3- Caractères cultureux

H. influenzae ne pousse que sur des milieux de culture enrichis au sang cuit qui leur apportent les deux facteurs de croissance indispensables (facteurs X et V). Après 24 h de culture à 37° C en présence de CO₂, *H. influenzae* donne des colonies lisses grisâtres, translucides à bords réguliers de 0,5 à 1 mm. Les souches capsulées donnent souvent des colonies plus grosses de 1 à 3 mm, parfois muqueuses (Larabi et Louadj, 2015).

3.1.2.4- Caractères biochimiques

H. influenzae possède une catalase, une oxydase, une nitrate réductase et ne produit jamais d'hydrogène sulfureux (H₂S). Le métabolisme de ce germe est fermentaire. La fermentation des sucres après 48 h à 37° C est accompagnée d'acidification. Les sucres fermentés sont : le glucose, le xylose et le désoxyribose mais pas le lactose ni le saccharose. Huit (08) biotypes ont été décrits chez *H. influenzae* à partir des caractères biochimiques : la production d'indole et l'existence des activités uréasique et l'ornithine décarboxylase permettent de valider le diagnostic de l'espèce (Larabi et Louadj, 2015). Les caractères biochimiques différentiels sont représentés dans le **tableau I**.

Tableau I: Caractères biochimiques d'*Haemophilus* (Sampo, 2013).

Espèces	Besoin en facteur		Oxydase	Catalase	Uréase	Indole
	X	V				
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	v
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	v	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	-	-	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	-	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-	+	-	-
<i>H. haemoglobinophilus</i>	+	-	+	+	-	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-

+ : Bactérie possède

- : Bactérie dépourvue de

v : caractère variable

X : Facteur de croissance hémine

V : Facteur de croissance NAD (Nicotinamide)

3.1.3- *Staphylococcus aureus*

3.1.3.1- Généralités

Staphylococcus aureus, également nommé staphylocoque doré en référence à la couleur or des colonies qu'il forme, a été décrit pour la première fois en 1880 par Louis Pasteur (**Teguar, 2017**). Il s'agit de l'une des bactéries pathogènes les plus communes et les plus virulentes de la planète (**Teguar, 2017**).

3.1.3.2- Caractères morphologiques

D'un point de vue macroscopique, cette bactérie se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies, justifiant le nom vernaculaire de « staphylocoque doré ». *S. aureus* se présente sous forme de cocci en petits amas, de diplocoques ou de très courtes chaînettes, mesurant 0,5 à 1 µm. Sur les cultures en milieu solide, il se dispose en « grappes de raisin ». Il est immobile (**Chaalal, 2013**).

3.1.3.3- Caractères culturels

S. aureus est un germe aéro-anaérobie facultatif, mésophile. Il peut se développer de 6° C à 18° C. Cependant, la toxinogénèse n'est possible qu'entre 10° C et 45° C. Cette bactérie peut se multiplier pour des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3, avec un optimum de croissance de 7 à 7,5 (**Teguar, 2017**). Cette bactérie est halophile, avec une concentration en sel assez importante jusqu'à 15 %. La croissance des staphylocoques est absente pendant 10 et 16 h à respectivement 18° C et 12° C. En revanche, le développement devient significatif à 22° C et 32° C. Ces différences s'expliquent par le substrat utilisé lors des tests en laboratoires. Dans la plupart des études, il s'agit d'un bouillon de culture (**Teguar, 2017**).

3.1.3.4- Caractères biochimiques

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* ne sont pas indologènes, produisent l'acétone, dégradent urée, réduisent le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisent de l'ammoniaque à partir de l'arginine. *S. aureus* est capable de dégrader de nombreux substrats glucidiques, protéiques et lipidiques grâce à son équipement enzymatique. En effet, la plupart des sucres sont fermentés tels que le glucose, le saccharose, le lévulose, le lactose et le mannitol (**Aissou et Bousnana, 2018**).

L'utilisation du mannitol est une indication importante car ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis*.

Cependant, ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylo-coagulase. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Teguar, 2017).

3.1.3.5- Facteur de virulence et de pathogénicité

La virulence est la survie de *S. aureus* dans l'hôte. Elle est liée à sa capacité d'envahir les tissus de l'hôte et d'échapper aux systèmes de sa défense et à la production d'une diversité de réseau de protéines. En revanche, la capacité de produire une maladie par *S. aureus* ne dépend pas d'un seul facteur de virulence mais de multiples facteurs impliquant un processus (Teguar, 2017). Pratiquement toutes les souches de *S. aureus* expriment de nombreux facteurs de virulence potentiels. Il s'agit d'hémolysines, de nucléases, de protéases permettant une pénétration des tissus et une adhésion sélective, mais aussi des lipases, des hyaluronidases et des collagénases (Nehal *et al.*, 2010).

S. aureus est une bactérie pyogène, responsable des infections de la peau et des infections plus profondes. La pathogénie de *S. aureus* est un phénomène complexe, faisant intervenir une multitude de facteurs de virulence (Aissou et Bousnana, 2018).

3.1.4- *Klebsiella pneumoniae*

3.1.4.1- Généralités

Le nom *Klebsiella* provient du nom du bactériologiste Klebs (1877) et l'espèce type dénommée « pneumobacille » par Friedlander qui l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882- 1884 (Boughachiche, 2016). Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries en forme de bâtonnet et font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie commensale de l'homme et des animaux. Elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (Iliaquer, 2010).

3.1.4.2- Caractères morphologiques

Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *K. pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont lactoses positives, bombées, muqueuses, d'un diamètre de 3 à 4 mm en 18 à 24 heures à 37 °C (Boughachiche, 2016).

3.1.4.3- Caractères biochimiques

Les *K.pneumoniae* sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif. Ils fermentent de nombreux sucres dont l'inositol et le glucose avec production de gaz. Ils ne possèdent pas de cytochrome oxydase et produisent la catalase. Ils ne produisent pas d'hydrogène sulfureux et hydrolysent l'urée (**Boughachiche, 2016**).

3.1.4.4- Facteurs de pathogénicité et de virulence

K. pneumoniae est responsable d'infections spontanées dans 25% des cas, mais surtout d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter (**Arafa et al., 2009**). La transmission de ces bactéries d'un patient à un autre se fait facilement par les mains du personnel soignant ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical (cathéter, masque à oxygène...), ou moins souvent par la contamination de l'environnement. La transmission de *K. pneumoniae* est très facile et rapide mais ne se propage pas dans l'air (**Boughachiche, 2016**).

3.1.5- *Moraxella catarrhalis*

3.1.5.1- Généralités

Moraxella catarrhalis est un organisme commensal des voies respiratoires, qui se révèle un pathogène important dans diverses infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, y compris l'otite moyenne et les exacerbations aiguës de la bronchite chronique (**Bandet et al., 2014**). Ce sont des parasites normalement présents dans l'oropharynx, les muqueuses, la peau et les voies génitales. *M. catarrhalis* est l'espèce la plus souvent isolée et est à l'origine de cas graves d'otites moyennes, de cas de sinusites, d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures pouvant conduire à une pneumonie (**Sy et Robinson, 2010**).

3.1.5.2- Caractères bactériologiques

Le genre *Moraxella* fait partie de la famille des *Moraxellaceae*. Ces bactéries sont des bâtonnets bacillaires et coccoïdes, Gram négatif, aérobie, habituellement regroupés en courtes chaînes ou en paires (**Sy et Robinson, 2010**).

3.1.5.3- Epidémiologie et facteur de virulence

Un certain nombre de facteurs bactériens pouvant contribué à la virulence ont été identifiés. Certains sont présents dans tous les isolats (**Ren et Pichichero, 2016**).

On ignore si l'expression de facteurs de virulence spécifiques contribue au potentiel d'une souche de provoquer la maladie ou de rester commensal. Des facteurs environnementaux et hôtes jouent également un rôle important dans la progression de la maladie à *M. catarrhalis* (**Gisselsson-Solén et al., 2014**).

3.1.6- *Legionella pneumophila*

3.1.6.1- Généralités

La bactérie *L. pneumophila* a été identifiée suite à une épidémie lors du 58ème congrès de la Légion Américaine, à Philadelphie (États-Unis) en 1976. Cent quatre-vingt deux participants ont été touchés par une pneumopathie d'origine inconnue, nommée maladie du Légionnaire, et 32 d'entre eux en sont morts. Ce n'est qu'en 1979 que ce micro-organisme a été décrit et nommé *L. pneumophila* (**Brenner et al., 1979**). Plus tard, l'enquête a démontré que le système de climatisation de l'hôtel dans lequel résidaient les patients était à l'origine de l'épidémie (**Pecastaings, 2010**).

3.1.6.2- Caractères morphologiques

L. pneumophila est un bacille à Gram négatif, aérobic strict, produisant la catalase, non sporulé et non capsulé. *L. pneumophila* possède un à deux flagelles en position polaire ou subpolaire. Son caractère fortement pléiomorphe serait lié à l'âge des cultures. Des cultures jeunes sont majoritairement formées de coccobacilles de 2 à 6 µm, tandis que des cultures plus âgées présentent des formes filamenteuses de plus de 20 µm de long. Le défaut de coloration par le rouge neutre ou la safranine utilisée pour la coloration de Gram est lié aux caractéristiques de la paroi, riche en acides gras ramifiés (**Pecastaings, 2010**).

3.1.6.3- Caractéristiques culturelles

Les bactéries du genre *Legionella* sont des micro-organismes fastidieux qui ne poussent que sur un milieu à base d'extrait de levure appelé BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract). Même si, à l'origine, l'isolement de *Legionella* a été réalisé sur milieu Mueller-Hinton supplémenté en hémoglobine et IsoVitalax, les composants essentiels de ce milieu ont été identifiés comme étant le fer (contenu dans l'hémoglobine) et la L-cystéine (contenu dans l'IsoVitalax) (**Pecastaings, 2010**). L'aspect des colonies est très variable selon les espèces mais aussi selon les sérogroupes. La couleur varie du blanc au gris parfois rosé, avec un centre marqué. Observées à la loupe binoculaire, les colonies présentent un aspect de verre fritté (**Pecastaings, 2010**). *L. pneumophila* possèdent toutes de la catalase à l'exception de *L. worsleiensis* (**Fanjeaux, 2010**).

Les réactions d'oxydase, de réduction des nitrates et d'uréase sont négatives. Les sucres ne sont ni fermentés ni oxydés et la seule source de carbone provient des acides aminés (**Pecastaings, 2010**).

3.3.6.4- Epidémiologie

Les données épidémiologiques indiquent que *Legionella* est un micro-organisme opportuniste à l'origine de trois formes cliniques : la fièvre de Pontiac, la maladie du Légionnaire et des formes extra-pulmonaires. Une forme asymptomatique a aussi été décrite, dans laquelle la sérologie seule est positive. La maladie se déclare le plus souvent après inhalation d'aérosols contaminés même si l'infection par la flore oro-pharyngée a été parfois suspectée (**Pecastaings, 2010**).

3.1.7- *Mycoplasma pneumoniae*

3.1.7.1- Généralités

La première bactérie du genre *Mycoplasma* a été isolée, dans un cas de péripneumonie contagieuse bovine, en 1898, par Nocard et Roux. *Mycoplasma pneumoniae* a été isolé d'un prélèvement respiratoire et cultivé sur œuf embryonné, par Eaton, en 1944. Mais ce n'est qu'en 1961 que Chanock, Hayflick et Barile cultivent l'agent Eaton dans un milieu acellulaire prouvant ainsi le caractère bactérien de cet agent pathogène (**Passe-Coutrin, 2013**).

3.1.7.2- Caractères morphologique et structuraux

Les mycoplasmes sont des bactéries particulières, dépourvues de paroi d'où leur aspect polymorphe et leur insensibilité totale aux bêta-Lactamines. Il s'agirait de formes très évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible pourcentage en guanine + cytosine et ayant perdu la capacité de synthétiser une paroi (**Passe-Coutrin, 2013**). Leur cytoplasme contient un génome très court et des ribosomes. La membrane en trois feuillettes contient des lipides en grande quantité, des glucides, des glycolipides et des protéines. On note la présence d'une structure terminale « tip » chez certains mycoplasmes qui jouent un rôle dans l'adhérence et la mobilité. Ils présentent un grand pléomorphisme: formes allongées fusiformes, formes coccoïdes, ovoïdes ou filamenteuses ou en chapelet (**Taoussi, 2019**).

3.1.7.3- Caractères cultureux

Les exigences nutritionnelles et les conditions de culture des mycoplasmes sont très différentes des conditions standards recommandées pour les bactéries classiques.

De la petite taille du génome des mycoplasmes résultent une capacité de synthèse limitée et une croissance dépendante de la composition de leurs milieux. La plupart des espèces nécessitent par exemple des acides gras et des stérols pour synthétiser leurs membranes (**Taoussi, 2019**). Ces procaryotes sont dépourvus de la majorité des gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés et des cofacteurs d'enzyme, leurs milieux doivent donc aussi subvenir à leurs besoins en acides aminés et en vitamines. L'oxygène n'est ni toxique, ni indispensable pour leurs croissances. La majorité des mycoplasmes font partie des bactéries anaéro-aérobies facultatives. La croissance étant très sensible à toute modification, ces exigences culturelles élevées laissent à penser que de nombreuses autres espèces de mycoplasmes existent mais restent encore inconnues car il est extrêmement difficile de les mettre en évidence en laboratoire (**Taoussi, 2019**).

3.1.7.4- Caractères biochimiques

Les mycoplasmes fermentent le glucose, hydrolysent l'urée et l'arginine. Ces trois propriétés sont utilisées dans le diagnostic biologique et permettent de les différencier. Ils possèdent des enzymes nécessaires à leur propre synthèse et peuvent donc se multiplier en l'absence de cellules vivantes. Bien qu'ils soient capables de synthétiser les nucléotides, un apport en peptides préformés est indispensable à leur métabolisme. Leur système de transport d'électrons est relativement simple. Leurs exigences nutritives nécessitent plus souvent des milieux complexes et enrichis (**Taoussi, 2019**).

3.1.7.5- Epidémiologie

Les mycoplasmes colonisent chez l'homme les muqueuses respiratoires et génitales. Certains seraient présents au niveau du tractus intestinal. Dix-huit espèces ont été isolées et la plupart des mycoplasmes respiratoires n'ont pas de pouvoir pathogène connu.

Parmi les espèces respiratoires, seul *M. pneumoniae* colonise les voies respiratoires hautes et basses et a un pouvoir pathogène bien identifié. Il ne fait pas partie de la flore commensale et sa présence dans les voies aériennes est toujours pathologique (**Passe-Coutrin, 2013**).

Il provoque des infections respiratoires le plus souvent bénignes, dans le monde entier, à n'importe quelle saison, à tout âge, se manifestant à l'état endémique dans les villes avec des poussées épidémiques tous les quatre à sept ans (**Passe-Coutrin, 2013**).

3.1.8- *Chlamydomphila* ou *Chlamydia pneumoniae*

3.1.8.1- Généralités

La classe des chlamydiae est constituée pas un seul ordre. L'ordre des chlamydiales est composé des bactéries gram négative intracellulaire obligatoire, partageant un cycle de développement biphasique unique. L'ordre comprend des importants agents pathogènes chez l'humain et l'animal (**Bayramova et al., 2018**). Les 3 espèces *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* sont responsables d'infections pulmonaires, mais cette dernière est la plus fréquemment retrouvée (**Galmès, 2013**).

3.1.8.2- Caractères morphologiques et structuraux

C. pneumoniae est une bactérie parasite obligatoire à Gram négatif, de petite taille. Chlamydia existent sous deux formes caractéristiques : le corps élémentaire (CE) qui est la forme infectieuse, extracellulaire, incapable de multiplication et le corps réticulé (CR), intracellulaire, non infectieux (**Taoussi, 2019**).

Le CE de forme sphérique est de petite taille puisqu'il mesure environ 300 nm de diamètre. Il est dense aux électrons, possède un nucléotide excentré et une paroi rigide et épaisse. Le CE adapté au transit extracellulaire, est incapable de se multiplier et constitue la forme infectieuse de la bactérie. En effet, il assure la dissémination de l'infection aux cellules voisines ou à un nouvel hôte. Le CE est caractérisé par la présence d'une épaisse et rigide paroi cellulaire comportant une grande quantité de cystéine (**Choroszi-krol et al., 2012**). Tandis que le CR est plus gros que le CE car il mesure de 800 à 1000 nm. Il est limité par une membrane plus souple et contient un nucléotide fibrillaire (**Peuchant et al., 2012**). Le CR, adapté au milieu intracellulaire est non infectieux et constitue la forme métaboliquement active de la bactérie. Il s'agit de la forme de reproduction qui assure la pérennité de l'infection. Cette forme est caractérisée par la présence d'une mince membrane avec une forte perméabilité.

3.1.8.3- Caractère culturaux

Chlamydia spp. sont des bactéries parasites obligatoire chez l'homme. De par son caractère strictement intracellulaire, cette bactérie se développe in vitro uniquement en cultures cellulaires. Pour *C. trachomatis*, deux lignées sont habituellement utilisées : les cellules McCoy et les cellules HeLa 229. Ils sont cultivés à 37° C pendant 48 à 72 h avec 5% de CO₂ et un taux élevé de glucose. La bactérie ne peut être cultivée directement dans des bouillons nutritifs ou sur gélose, même au sang (**Taoussi, 2019**).

3.1.8.4- Caractères biochimiques

C. pneumoniae est un microorganisme chimio-organotrophe aérobie. Il s'agit donc d'un microorganisme dont la source énergétique est chimique, plus précisément organique. La dégradation de substrats organiques se fait à l'aide de l'oxygène d'où le terme aérobie. Le glutamate, le glucose et peut être aussi le 2-oxoglutamate sont des sources de carbone. Les études de cellules infectées montrent que l'infection provoque une augmentation de l'expression des transporteurs de glucose (GLUT -1) de la cellule hôte. Les Chlamydiae sont traditionnellement considérées comme des parasites énergétiques qui ne peuvent pas former d'ATP par elles-mêmes et doivent donc l'obtenir des cellules hôtes (Taoussi, 2019).

3.1.8.5- Epidémiologie

C. pneumoniae infecte uniquement l'homme et la contamination interhumaine se fait par voie aérienne avec survenue d'épidémies dans des communautés (Taoussi, 2019). Trois modes de transmission de *C. pneumoniae* sont théoriquement possibles: aérosol, inoculation directe par gouttelettes ou grosses particules et l'auto-inoculation après avoir touché des surfaces contaminées. L'organisme peut rester viable sur des surfaces du formica et des mouchoirs en papier pendant 12 h. Cependant le temps de survie sur les mains est limité à 10-15 min. Les infections à *C. pneumoniae* apparaissent tous les ans mais avec des variations cycliques de l'incidence. Il n'y a pas de périodicité saisonnière. *C. pneumoniae* représenterait jusqu'à 10 % de l'étiologie des pneumopathies communautaires (Taoussi, 2019).

3.2- Champignons impliqués dans les pneumonies: cas de *Pneumocystis jirovecii*

3.2.1- Généralités

L'agent pathogène aujourd'hui appelé *Pneumocystis jirovecii* a été découvert pour la première fois en 1909 au Brésil, dans les poumons de cochons d'Inde infectés par *Trypanosoma cruzi*. A cette époque, Carlos Chagas croyait avoir identifié une nouvelle forme de trypanosome (Chagas, 1909).

P. jirovecii est un pathogène cosmopolite, opportuniste, non cultivable, classé d'abord parmi les protozoaires puis, à la lumière de ses composants génétiques et cellulaires parmi les champignons (Ziraoui, 2016). Ce champignon atypique ressemblant à une levure est un agent pathogène humain important en particulier chez les hôtes immunodéprimés. Elle provoque principalement une pneumonie mais peut rarement infecter d'autres sites extra pulmonaires (Dhingra et al., 2017).

3.2.2- Epidémiologie

Aujourd'hui, la pneumocystose touche 40 % des sidéens, elle est l'infection opportuniste signant le passage au stade SIDA dans 25 % des cas et la mort survient dans 10 % des cas. La méconnaissance de l'épidémiologie de l'infection limite la possibilité de mise en place de mesures de prophylaxie sanitaire efficaces, même si de plus en plus d'arguments tendent à conforter l'hypothèse d'une transmission directe de malade à personne sensible (Ziraoui, 2016). Bien que l'association entre les facteurs climatiques (température et humidité) et l'incidence de la *P. jirovecii* ne soit pas clairement établie, l'incidence de la *P. jirovecii* serait globalement corrélée à la hausse des températures. Plus récemment, les travaux des équipes allemandes et anglaises vont dans ce sens et décrivent des pics saisonniers plutôt estivaux (Avenel, 2011). Dans les régions tropicales et équatoriales, l'incidence de la pneumocystose pulmonaire parmi les sidéens était généralement considérée comme plus faible que dans les régions tempérées. Cependant, si la tuberculose reste la première infection opportuniste frappant les sidéens d'Afrique sub-saharienne, il apparaît aujourd'hui que l'incidence de la pneumocystose était sous-estimée (Ziraoui, 2016).

3.2.3- Diagnostic biologique

P. jirovecii est un pathogène opportuniste non cultivable (Tapparel *et al.*, 2010). Par conséquent, pour tenter d'améliorer le diagnostic de la pneumonie à *P. jirovecii*, des techniques moléculaires plus sensibles telles que la PCR conventionnelle et quantitative ont été développées (Calderón *et al.*, 2011). Il faut cependant toujours garder à l'esprit lors du choix des techniques diagnostics et lors de l'interprétation des résultats que le nombre de *P. jirovecii* observé chez les patients non VIH est plus faible que chez les VIH (Roux *et al.*, 2010). Les principales cibles d'ADN à amplifier sont les régions ITS (internal transcribed spacer), 5S et 18S de l'ADN nucléaire, la large sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (mtLSU), la dihydroptéroate synthase (DHPS), la dihydrofolate reductase (DHFR), la thymidylate synthase (TS), la β -tubuline, le gène *cdc2* et la glycoprotéine de surface (MSG) (Ziraoui, 2016).

3.3- Virus impliqués dans les pneumonies

Les virus sont les causes majeures des IRAS surtout chez les jeunes enfants qui portent le plus lourd fardeau des maladies respiratoires virales (Pavia, 2011). Plusieurs centaines de virus peuvent infecter l'organisme humain par voie essentiellement respiratoire. Les virus respiratoires sont généralement transmis par inhalation ou contact direct avec les aérosols ou sécrétions respiratoires (Khor *et al.*, 2012).

Les 4 étiologies les plus fréquentes de pneumonie virale chez les enfants et les adultes immunocompétents sont les virus influenza, le virus respiratoire syncytial (RSV, *Respiratory Syncytial Virus*), l'adénovirus et le virus parainfluenza (PIV), qui produisent tous des manifestations cliniques et radiologiques courantes (**Carman et Mahony, 2007**). D'autres sont plus rarement impliqués comme les rhinovirus, les entérovirus, et les coronavirus OC43 ou 229E (**Ruuskanen et al., 2011**). Les virus respiratoires comprennent plusieurs virus : influenza virus, virus respiratoire syncytial (RSV), parainfluenza virus (PIV), rhinovirus, entérovirus, adénovirus. Avec l'émergence de nouvelles méthodes diagnostics moléculaires génériques, de nouveaux virus respiratoires ont été mis en évidence ces 10 dernières années : bocavirus, metapneumovirus humain (HMpV) et coronavirus. Ils ont en commun leur tropisme pour le tractus respiratoire supérieur et inférieur et se distinguent par leur diversité biologique (virus à ARN : influenza, RSV, parainfluenza, metapneumovirus, coronavirus, picornavirus, virus à ADN: adénovirus, bocavirus) (**Vu Cantero, 2012**). L'identification des pathogènes viraux est d'une grande importance pour la prise en charge des patients et la réduction de la transmission des infections nosocomiales ainsi que la maîtrise par certains cliniciens d'une prescription hasardeuse des antibiotiques (**Elisabeth et al., 2012**). La détection et l'identification des virus respiratoires ont cependant été révolutionnées ces dernières années grâce aux nouvelles techniques de détections moléculaires. La technologie moléculaire notamment par la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (rRT-PCR) a rehaussé le niveau de détection des agents étiologiques viraux (sensibilité et spécificité) ainsi que le développement des amplifications multiplex permet la détection simultanée d'un large panel des virus (**Pretorius et al., 2012**).

3.3.1- Virus influenza

Ce sont des virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae. La circulation des virus influenza est saisonnière selon les différentes parties du globe, mais coïncide le plus souvent avec les périodes de température basse ou humide (**Tarnagda et al., 2014**). Ils sont responsables d'importantes infections virales du système respiratoire de l'adulte et de l'enfant. Les symptômes sont la fièvre, la myalgie, maux de gorge et la toux. Le type influenza A qui est le plus important est classé en plusieurs sous-types en fonction des propriétés antigéniques de leur hémagglutinine (HA ou H) et neuraminidase (NA ou N) (**figure 5**).

A l'intérieur de cette enveloppe se trouve le génome viral qui est composé de huit segments d'acide ribonucléique (ARN) pour les virus de type A et B et de sept segments pour les virus influenza de type C (**Jeannoël, 2019**).

Le génome viral code 11 protéines: l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA), la nucléoprotéine (NP), les deux protéines de la matrice (M1, M2), les deux protéines non structurales (NS1, NEP), les trois protéines du complexe réplicase/transcriptase (PB1, PB2, PA) et la protéine PB1-F2 produite à du gène PB1. L'association des différents segments d'ARN viraux avec les nucléoprotéines et les protéines du complexe réplicase/transcriptase forme les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) (**Jeannoël, 2019**). Chez l'homme, les sous-types H1, H2, H3, N1 et N2 sont majoritaires, ainsi que ponctuellement les sous-types H5 et H9 (**Vabret *et al.*, 2010**). Le génome viral est constitué de 8 segments d'ARN monobrin codant les 11 protéines virales (**figure 6**). Les méthodes diagnostiques recommandées comprennent la culture virale, la détection d'antigène et la détection de l'acide nucléique (**Sanou, 2018**).

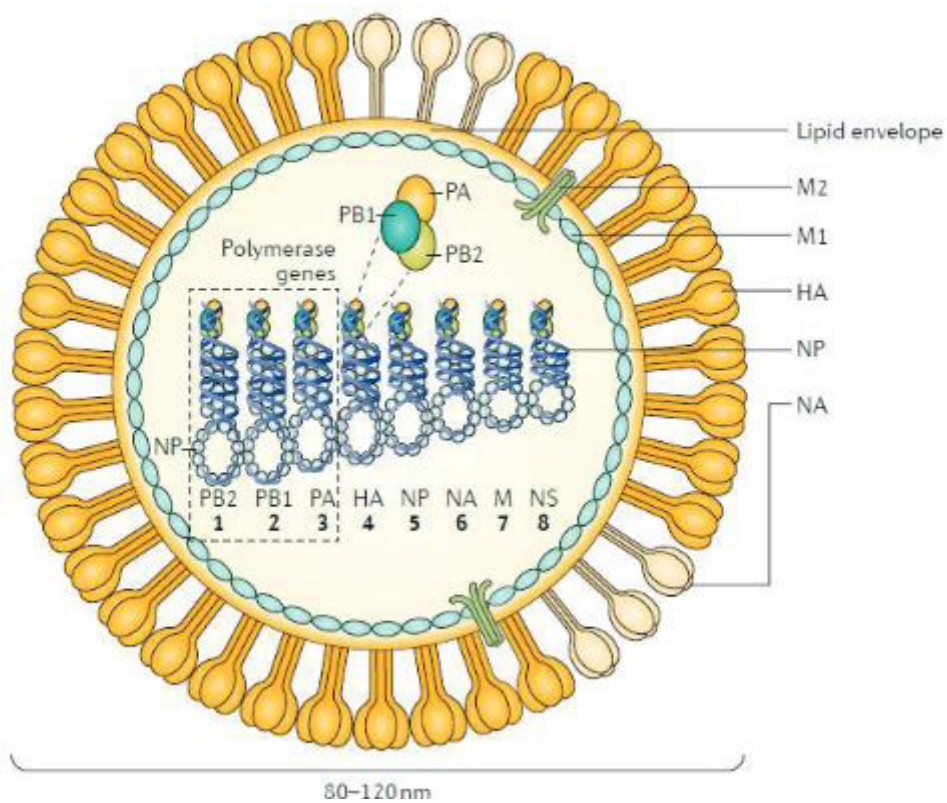


Figure 5: Représentation schématique du virus influenza A ou B (**Krammer *et al.*, 2018**)

Le virus influenza A possède 8 segments d'ARN de polarité négative. 11 protéines sont codées par ces ARN : les trois sous-unités de l'ARN-polymérase ARN dépendante (PB1, PB2 et PA), les deux glycoprotéines d'enveloppe (HA et NA), la nucléoprotéine NP, les protéines de matrice (M1 et M2), la protéine non structurale NS1 et la protéine d'export nucléaire NEP. Le virus peut aussi coder des protéines additionnelles : PB1-F2 et PA-X qui sont présentes dans les cellules infectées mais pas dans les particules virales ou à très faible concentration.

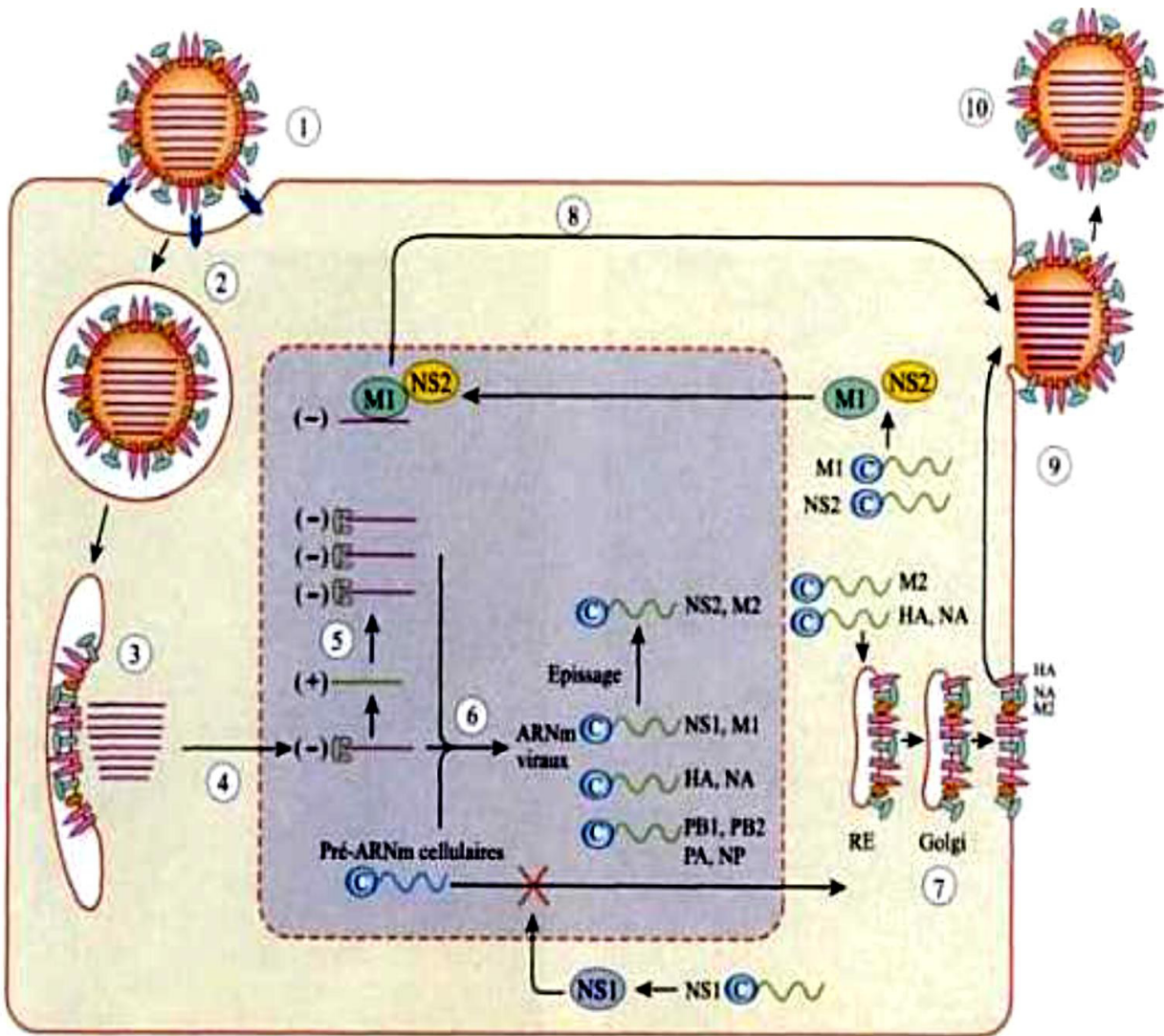


Figure 6 : Cycle de réplication du virus influenza (Medina et García-sastre, 2011)

1- La HA du virus Influenza se lie à son récepteur cellulaire, l'acide sialique α -2,6 ou α -2,3. 2- puis le virus pénètre dans la cellule par endocytose. 3- Le clivage de la HA par des protéases cellulaires expose le peptide fusion qui permet la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale. 4- L'acidification de la vesicule d'endocytose provoque l'ouverture du canal à proton M2 ce qui acidifie le virion et permet la libération dans le cytoplasme des complexes ribonucléoprotéiques contenant le génome viral. Les complexes ribonucléoprotéiques migrent alors dans le noyau. 5- l'ARN polymérase ARN-dépendante transcrit et réplique l'ARN viral de polarité négative en trois types d'ARN : l'ARN complémentaire qui permet la réplication de l'ARN viral, des ARN de petite taille de polarité négative qui régulent la transcription et la réplication et 6- des ARN messagers qui sont exportés dans le cytoplasme et 7- traduit en protéines virales. Les protéines virales nécessaires à la réplication et la transcription sont réimportées dans le noyau où elles forment les complexes ribonucléoprotéiques après association à l'ARN viral nouvellement synthétisé. 8- puis ces complexes sont exportés dans le cytoplasme pour l'étape de packaging avec l'aide des protéines M1 et NP. 9- La HA, la NA et la protéine M2 subissent des modifications post-traductionnelles dans le trans-golgi, les protéines matures arrivent à la membrane puis sont assemblées pour former les nouveaux virions. 10- Le bourgeonnement permet le relargage des nouveaux virions après que le NA ait coupé la liaison entre les acides sialiques cellulaires et les glycoprotéines virales.

3.3.2- Virus respiratoire syncytial

C'est en 1956 que l'équipe de Morris JA découvrit un agent responsable d'un sévère coryza chez le chimpanzé appelé Agent du Coryza du Chimpanzé ou CCA21. L'année suivante, ce même agent fut retrouvé chez un enfant présentant le même type de symptômes par Chanock Robert et ses collaborateurs en 1957 qui proposeront son nom chez l'homme, le virus respiratoire syncytial (VRS), dû à sa capacité à former des syncytia, cellules polynucléées géantes (**Le Doussal, 2016**). C'est un virus à ARN, non segmenté de l'ordre des *Mononegavirales*, de la famille des *Pneumoviridae* et au genre *Orthopneumovirus* (**Sanou, 2018**). Ils sont classés en VRS A et B définis selon la variabilité de la glycoprotéine de surface G (**Le Doussal, 2016**). Les symptômes cliniques associés au VRS A tendent à être plus sévères que ceux causés par le VRS B. Les VRS sont en tête de tous les pathogènes viraux dans la transmission des infections respiratoires sévères dans tous les groupes d'âge (**Lagare, 2014**). Dans les régions tropicales ou subtropicales, l'infection peut être endémique ou plus souvent, l'épidémie coïncide avec la saison des pluies (**Griffiths et al., 2017**).

Les méthodes diagnostiques du VRS comprennent la culture cellulaire, l'immunofluorescence (IF), l'immunochromatographie (IC), l'ELISA et la RT-PCR. La sensibilité et la spécificité de ces méthodes sont influencées par plusieurs facteurs tels que la qualité du prélèvement, les conditions de transports, l'expérience du technicien, la population, la période de l'année (**Griffiths et al., 2017**).

3.3.3- Métapneumovirus humain

Le Métapneumovirus humain (MPVh) a été décrit pour la 1ère fois par l'équipe hollandaise du Professeur Albert Osterhaus à la suite de l'isolement du virus chez 28 enfants qui présentaient des symptômes similaires à ceux observés lors d'infections par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS). Ces symptômes allaient d'une infection bénigne des voies respiratoires supérieures, à de sévères bronchiolites et pneumonies (**Le Parc, 2018**). Les analyses morphologiques, biochimiques et génétiques ont permis de classer le MPVh dans l'ordre des *Mononegavirales* (virus à ARN simple brin négatif non segmenté). Ce sont des virus à ARN, enveloppés et non segmentés, découverts en 2001. Ils sont classés en deux groupes A et B en fonction de leur propriété antigénique. Les MPV sont responsables du spectre d'infections respiratoires qui va de l'infection respiratoire haute moyenne à la bronchiolite et pneumonie sévères. La circulation du virus est beaucoup plus intense en hiver et le mode de transmission est essentiellement par contact ou par les aérosols (**Kroll et Weinberg, 2011**).

Le diagnostic d'une infection à MPVh repose actuellement en routine sur la détection génomique à partir d'un prélèvement d'origine respiratoire (**Panda *et al.*, 2014**).

3.3.4- Virus Para-influenza

Ce sont des virus, à ARN non segmenté et classé en quatre types 1, 2, 3 et 4 de la famille des Paramyxoviridae. Ils sont responsables des infections respiratoires basses et hautes chez les enfants. L'incidence à VPI varie selon les différents types. Cependant le VPI3 est cité dans toutes les littératures comme étant le plus infectieux (**Palmer *et al.*, 2014**). Les données sur la saisonnalité des infections aux VPI sont disponibles pour l'hémisphère nord mais absentes dans les régions tropicales et subtropicales (**Sanou, 2018**). Les VPI peuvent être détectés par différentes techniques que sont la culture cellulaire, l'immunofluorescence, la technique ELISA et la RT-PCR. La culture virale a longtemps été considérée comme le gold standard pour le diagnostic des VPI. Cependant son coût élevé, la nécessité d'un personnel qualifié et aussi sa durée de réalisation (5 à 14 jours) limitent son utilisation en diagnostic clinique (**Branche et Falsey, 2016**). La RT-PCR est l'outil diagnostique de choix pour la détection des VPI à cause de la rapidité de réalisation et des bonnes performances analytiques qu'il présente (**Hirsch *et al.*, 2013**).

3.3.5- Coronavirus

Ce sont des virus à ARN enveloppés qui appartiennent à la famille des Coronaviridae. Cinq types sont identifiés comme coronavirus humain: 229E, OC 43, NL 63, HKU1 et les SARS (**Owusu *et al.*, 2014**). Les types Cov HKU1 et NL63 sont responsables d'infections respiratoires graves comme les pneumonies et les bronchiolites chez les enfants. Cependant le SARS est de loin le type le plus dangereux en termes de mortalité chez les adultes. De façon générale, les coronavirus humains sont responsables de rhumes, des pneumonies chez l'adulte et de dépression chez l'enfant. Ils sont aussi impliqués dans les infections hautes et basses du système respiratoire (**Lagare, 2014**). Le diagnostic des infections à CoV est réalisé par des techniques de RT-PCR sur des prélèvements respiratoires. Les premières techniques de détection des CoV par RT-PCR remontent aux années 1990. Elles étaient cependant peu utilisées du fait de leur coût élevé. De plus, les CoV n'étaient pas recherchés en routine car leur impact était considéré comme négligeable (**Sanou, 2018**).

3.3.6- Adénovirus

Ce sont des virus à ADN de la famille des Adenoviridae. Cette famille comprend environ 51 sérotypes dont seulement le tiers est associé aux infections inter humaines; les autres étant exclusivement asymptomatiques. Les infections à adénovirus sont associées aux infections

respiratoires, gastro-intestinales et ophtalmologiques. Les infections à adénovirus affectent beaucoup plus les enfants et les adolescents que les adultes. Les voies d'infection comprennent la bouche, le nasopharynx et les orifices oculaires (**Lagare, 2014**).

Les AdV sont responsables d'IRA fébriles, de conjonctivites, de gastroentérites ou maladies diarrhéiques (**Lynch et Kajon, 2016**). Ils causent également des infections sévères chez les personnes immunodéprimées. Les épidémies surviennent le plus souvent en hiver mais les infections se produisent tout au long de l'année sans une saisonnalité bien définie (**Lynch et al., 2011**). La période d'incubation varie de 2 à 14 jours. De plus, les AdV peuvent rester sous forme latente pendant plusieurs années dans le tissu lymphoïde, dans le parenchyme rénal ou dans d'autres tissus. La réactivation survient généralement chez les personnes sévèrement immunodéprimées. Les épidémies peuvent se propager rapidement parmi les populations fermées tels les hôpitaux, les centres de formation professionnelle, les écoles, etc. (**Lynch et Kajon, 2016**). Les AdV virus peuvent être détectés dans des spécimens cliniques provenant des sites infectés par les techniques suivantes : l'immunofluorescence, la culture virale et la PCR (**Lee et al., 2010**). La culture virale constitue la technique de référence. Cependant elle est longue (environ 28 jours) et peu sensible surtout pour la détection des AdV dans le sang. Quant à la PCR, elle est très sensible et peut détecter les AdV dans presque tous les spécimens cliniques (**Lee et al., 2010**).

3.3.7- Bocavirus humain

Le BoV a été découvert en 2005 par Tobias Allander et ses collaborateurs dans les sécrétions respiratoires de sujets présentant une atteinte respiratoire aiguë grâce à l'utilisation de techniques moléculaires (**Allander et al., 2005**). Ce sont des virus à ADN, non enveloppés de la famille de parvovirus découvert en 2005 (**Brieu et al., 2008**). Ils sont responsables des infections respiratoires et gastro-entérites chez l'enfant. Le BoV est un virus cosmopolite comme en témoigne sa détection dans de nombreux pays depuis sa découverte (**Foulongne et Segondy, 2009**). C'est un virus fréquemment détecté en coïnfection et cela dans des proportions souvent importantes (**Jartti et al., 2012**).

Le diagnostic d'une infection à BoV repose sur la détection de l'ADN viral dans les prélèvements par les techniques de diagnostic moléculaire. La plupart des laboratoires utilisent la PCR conventionnelle ou la PCR à temps réel ciblant les gènes NP1, NS1 ou VP1/2 (**Catalano-Pons et al., 2009**).

3.3.8- Entérovirus

La première classification des entérovirus a été établie en utilisant les manifestations cliniques et le pouvoir pathogène observé chez des animaux de laboratoire. Ces caractéristiques ont permis de reconnaître les quatre groupes suivants : poliovirus, coxsackievirus A, coxsackievirus B et echovirus (Hassel, 2015). Le genre entérovirus de la famille des *Picornaviridae* est constitué de petits virus non enveloppés à ARN simple brin de la famille des *Picornaviridae* (Racaniello, 2007). Ils sont responsables des infections respiratoires, encéphalites, méningites, myocardites et d'autres infections néonatales (Verboon-Maciolek *et al.*, 2008). La transmission se fait principalement par la voie orale, cependant certains sérotypes peuvent passer par la voie respiratoire.

Les cas de maladie surviennent sur un mode épidémique saisonnier avec un premier pic à la fin du printemps ou au début de l'été et un second pic d'intensité moindre au début de l'automne (Solomon *et al.*, 2010). La diminution de l'activité épidémique durant l'été pourrait être une conséquence de la fermeture des écoles liée aux vacances scolaires, limitant localement la transmission interindividuelle des souches d'EV-A (Wang *et al.*, 2011). La température et d'autres facteurs environnementaux (hygrométrie) pourraient aussi influencer la survie dans l'environnement et la transmission des souches d'EV-A (Wang *et al.*, 2011).

L'identification de la souche par des techniques moléculaires permet d'apporter des informations épidémiologiques sur le sérotype en cause et elle est effectuée en utilisant le prélèvement clinique utilisé pour le diagnostic virologique. L'avantage principal est la rapidité d'obtention du résultat (Hassel, 2015).

3.3.9- Rhinovirus

Ce sont des virus à ARN, non enveloppé de la famille des *Picornaviridae* et au genre *Enterovirus* (Sanou, 2018). Ils sont responsables de la moitié des cas de rhume. Ils sont aussi associés aux crises d'asthme, sinusite, otite, et mieux, provoquent des exacerbations pulmonaires chez les enfants (Esposito *et al.*, 2014). On retrouve plus de 100 types de rhinovirus qui sont responsables d'infections respiratoires chez l'homme. L'infection à rhinovirus est caractérisée par une période d'incubation courte (1-2 jours) et intervient tout au long de l'année avec des pics en saison froide.

La plupart des patients infectés sont asymptomatiques ou présentent des symptômes bénins mais ces virus sont également fréquemment détectés chez les personnes atteintes d'otite, de bronchiolite, de pneumonie (To *et al.*, 2017). Les patients avec une infection sévère à RVH sont le plus souvent immunodéprimés ou sont atteints d'une maladie chronique. Aussi, les patients atteints d'asthme sont

susceptibles de faire des infections sévères à RVH (**Greenberg, 2011**). Cependant, d'autres études n'ont relevé aucun lien entre le type d'espèce et la sévérité clinique (**Xiao et al., 2015**). Dans les régions tempérées, le pic des infections à RVH est atteint en début d'automne et au printemps. Cette saisonnalité est similaire à celle des régions subtropicales (**Greenberg, 2011**).

La culture virale est utile pour la détection du RVH mais est peu utilisée à cause de sa faible sensibilité. Avec le développement de techniques de biologie moléculaire, la capacité à détecter les virus respiratoires a considérablement augmenté. Ainsi, la détection des RVH dans les échantillons respiratoires a été améliorée par la RT-PCR. Plusieurs études ont révélé une sensibilité accrue de la RT-PCR par rapport à la culture virale (**To et al., 2017**).

4- Les méthodes moléculaires

Ces techniques permettent de caractériser les micro-organismes d'un échantillon, qu'ils soient cultivables ou non, dans leur environnement naturel. Les méthodes moléculaires peuvent s'affranchir de la mise en culture (**Payet, 2017**). Ainsi, l'utilisation de la PCR s'est largement développée pour le diagnostic des infections virales ou bactériennes à partir des sécrétions nasopharyngées ou de liquide de lavage alvéolaire (**Galmès, 2013**). Certaines applications de biologie moléculaire, dans un souci de spécificité, nécessitent une étape préliminaire d'extraction d'ADN (**Payet, 2017**). L'analyse d'échantillons par la biologie moléculaire passe par trois étapes que sont d'abord l'extraction de l'ADN et / ou l'ARN de l'échantillon d'origine; ensuite l'amplification par PCR de la séquence ADN / ARN cible du pathogène enfin la détection des produits de l'amplification. Au fil des années, les méthodes couvrant ces trois étapes se sont améliorées. L'une des principales innovations est le développement de la PCR en temps réel, qui permet de combiner les étapes 2 et 3, réduisant ainsi considérablement le temps d'analyse. Par conséquent, les résultats sont actuellement disponibles dans les 24 heures, au lieu de quelques jours (**Castro et Molina, 2011**)

4.1- Extraction

Avant toute réaction de PCR, une étape d'extraction préliminaire est nécessaire. L'extraction peut être manuelle ou automatisée. Une lyse préalable des cellules est effectuée. Elle est couramment faite par des produits chimiques ou par variation thermique.

Les produits les plus fréquemment utilisés en lyse chimique sont : le sulfate de guanidine et le chloroforme. Le reste du principe d'extraction consiste à capter les acides nucléiques et éliminer les éléments non nécessaires par purification. Les acides nucléiques sont le plus souvent captés par la

silice magnétique, le fer et les résines échangeuses d'ions. La lyse thermique, effectuée par choc thermique ou variation thermique consiste à passer brusquement de -20° C à 100° C provoquant aussi une lyse de la paroi bactérienne et la libération de l'ADN (**Diarra, 2014**).

4.2- PCR classique

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température.

Les composantes sont :

- La matrice qui est constituée de l'ADN obtenu par extraction.
- Les amorces jouent un rôle en s'hybridant à l'ADN matrice. Elles délimitent également la région de l'ADN à amplifier avec leur extrémité 3'OH libre servant d'amorce pour l'ADN polymérase.
- Le dNTP (désoxynucléotidetriphosphate) est un mélange de quatre nucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Il est utilisé au cours d'une PCR comme élément de synthèse des brins d'ADN.
- Le cofacteur est une substance dont la présence est nécessaire en plus d'une enzyme pour qu'une réaction se déroule. Le magnésium (Mg) est le cofacteur le plus couramment utilisé.
- Le tampon sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase. Il contient souvent des cations bivalents Mg^{2+} servant de cofacteur (**Diarra, 2014**).

4.2.1- Dénaturation initiale

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage généralement 10 à 15 mn à 95° C est réalisée. Cette étape permet de dénaturer les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (**Diarra, 2014**).

4.2.2- Phase de dénaturation

Cette étape généralement de 0 à 1 minute à 95°C permet de dénaturer l'ADN, de décrocher les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel. L'ADN initial adopte une conformation linéaire, sans structure secondaire et simple brin.

Les amorces, les dNTPs et les polymérases sont en large excès et répartis de façon homogène dans la solution (**Diarra, 2014**).

4.2.3- Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces

Cette étape généralement de 2 à 60 s à 56- 64 °C permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Certaines des amorces dites « sens » s'hybrident avec leur séquence complémentaire sur le brin anti-sens ; d'autres amorces dites « anti-sens » se lient aux brins sens. Deux polymérase peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante (**Diarra, 2014**).

4.2.4- Phase d'élongation

Cette étape généralement de 4 à 120 s à 72° C permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. Les polymérase parcourent leur brin matrice de son extrémité 3' vers son extrémité 5' tout en synthétisant le brin complémentaire. Elles s'arrêteront au bout de leur ADN matrice, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant. Les ADN néo-synthétisés sont donc précisément définis à leur extrémité 5' mais pas à leur extrémité 3'. Les ADN sont alors bicaténaire sur une longueur plus ou moins importante. Nous obtenons alors deux brins d'ADN matrice deux brins : un sens et un anti-sens d'ADN précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (**Diarra, 2014**).

4.2.5- Détection

La détection est faite à la fin des réactions de PCR soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Dans la migration électrophorétique, un agent intercalant comme le bromure d'éthidium (BET) ou le Syber® Green est associé pour la visibilité des bandes. Un marqueur de poids moléculaire est utilisé comme échelle aidant dans l'identification de nos bandes d'intérêt. Une bande contrôle de la taille de notre bande d'intérêt doit être utilisée (**Diarra, 2014**).

4.3- PCR quantitative ou RT-PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une révolution dans l'utilisation de la PCR. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers.

Il ne faut surtout pas la confondre avec la RT-PCR (Reverse Transcription PCR), on préférera donc les appellations PCR quantitative ou qPCR (**Diarra, 2014**) (**figure 7**).

Les différences entre les 3 techniques de PCR sont explicitées dans le **tableau II**.

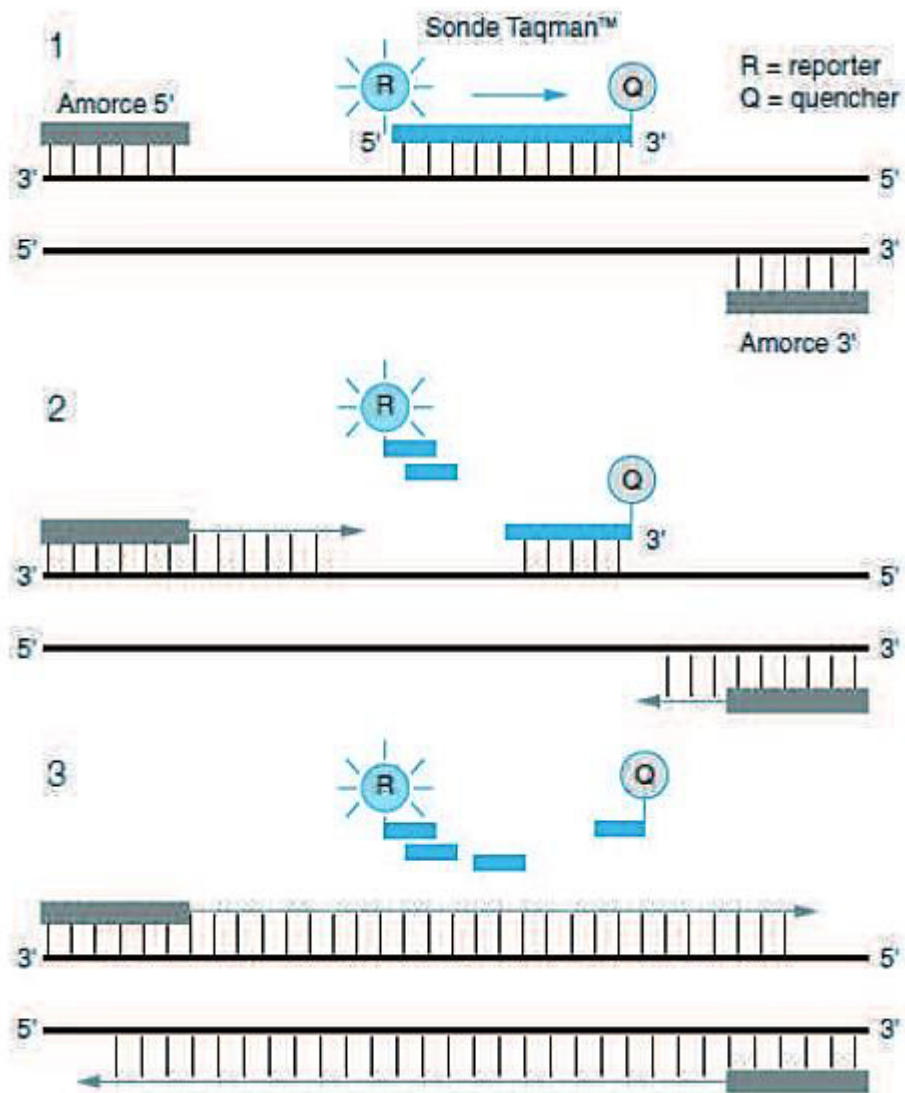


Figure 7: Principe de la sonde d'hydrolyse ou TaqMan (Dubosson, 2011)

- (1) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.
- (2) A température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
- (3) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Tableau II: Méthodes moléculaires utilisées pour les diagnostics (Olofsson *et al.*, 2011)

Méthode	Description	Commentaires
PCR conventionnelle	Détection par électrophorèse sur gel avec agent intercalant Southern blot suivi par une hybridation de sondes marquées (enzymes, radio-isotopes)	Absence de quantification, Contaminations fréquentes Technique obsolète
PCR ou RT-PCR en temps réel	Produits de PCR évalués à chaque cycle. Amorces spécifiques, fluorescentes : hydrolyse, FRET	Multiplexage limité Quantitatif ou sémi-quantitatif Hautement spécifique Faible risque de contamination Possibilité de PCR « maison »
PCR ou RT-PCR multiplex	PCR conventionnelle afin de fixer plusieurs amorces aux cibles. Plusieurs amorces et cibles dans la même réaction d'amplification	Excellent multiplexage Quelques tests commercialisés Absence de quantification Risque de contamination

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel

1.1- Cadre d'étude

L'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire a constitué notre cadre d'étude. Les laboratoires de l'Unité de Bactériologie Clinique (UBC), l'unité de Mycobactéries Tuberculeuse Atypiques, l'unité de Biochimie Clinique et fondamentale site Cocody et le département des Virus Respiratoires, la Plateforme de Biologie Moléculaire de l'IPCI site d'Adiopo-doumé, ont été les lieux de réalisation des analyses.

1.2- Type d'étude

Ce travail est une étude expérimentale prospective portant sur les échantillons des patients adultes, hospitalisés, atteints de pneumopathie alvéolaire au CHU de Cocody. La collecte des échantillons s'est effectuée durant la période de février 2016 à octobre 2017.

1.3- Période d'étude

Notre étude a été réalisée de février 2016 à octobre 2017 couvrant toutes les saisons y compris la saison froide, sèche et pluvieuse.

1.4- Population d'étude

90 patients souffrant de pneumopathie aigüe sévère ont été ajoutés dans cette étude. Sur les échantillons de ces patients, des examens biologiques ont effectués à savoir la recherche de mycobactéries tuberculeuses, les tests biochimiques, les tests hématologiques. Lorsque l'état de santé des patients était satisfaisant, ils subissaient une fibroscopie bronchique pour l'obtention du LBA. Cette fibroscopie a consisté à laver les bronches et les alvéoles avec 50 mL de sérum physiologique à l'aide d'un endoscope. Le liquide est aspiré et recueilli dans un flacon stérile. Ce liquide obtenu est appelé liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) qui est envoyé au laboratoire dans un délai de moins de 2 heures à une température compris entre 15 et 25°C pour les analyses conventionnelles et moléculaires.

1.5- Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué d'échantillons de sang, de sérum, d'expectoration et du Liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA).

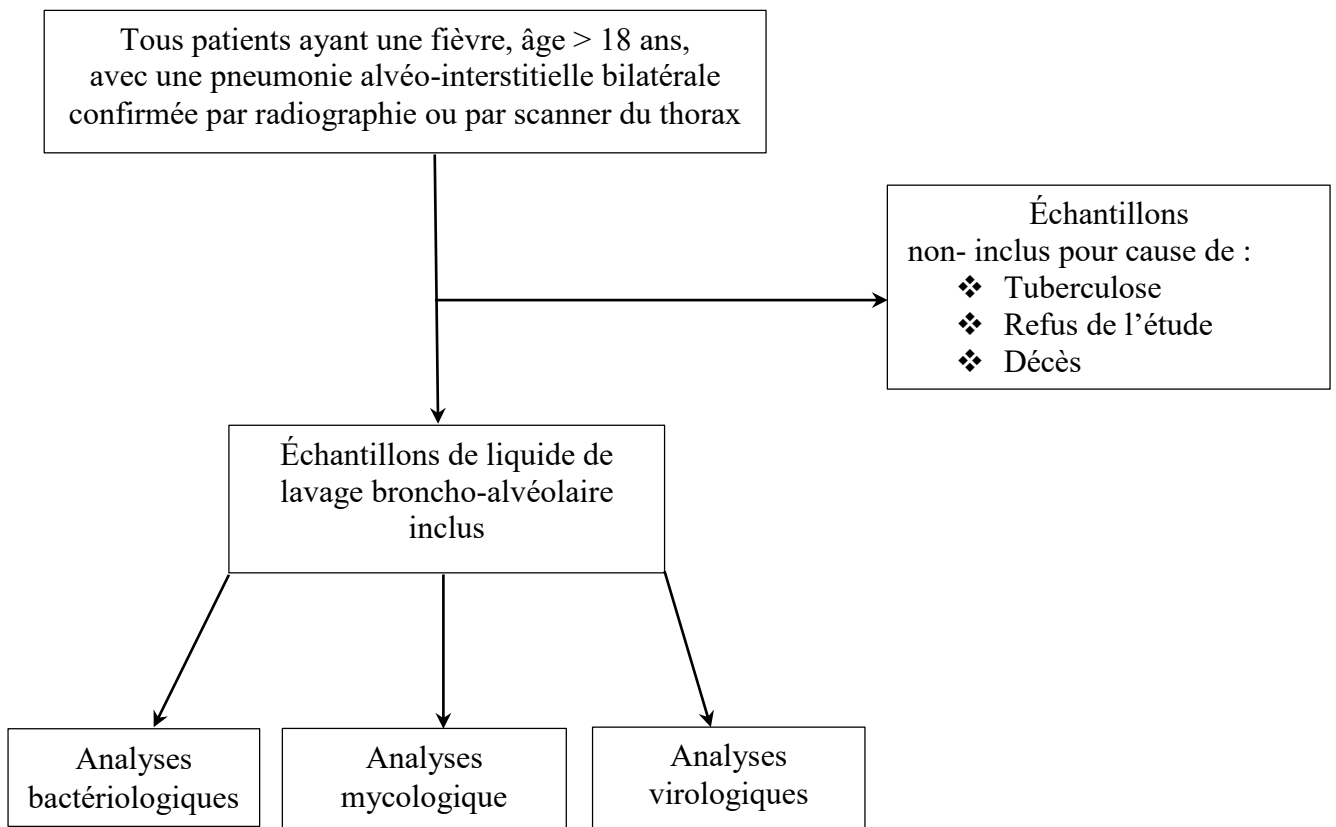


Figure 8 : Organigramme de recrutement des patients adultes atteints de pneumonie

1.6- Matériel technique

1.6.1- Matériel et réactifs pour la caractérisation phénotypique

1.6.1.1- Matériel pour l'ensemencement et l'isolement des souches bactériennes

Les appareils utilisés ont été principalement constitués d'une étuve à CO₂ réglée à 37° C ayant servi à incuber les boîtes de Pétri ensemencées, le microscope optique Magnus Analytics (New Dehl, India) a servi à observer les états frais, la forme des colonies et la mobilité des bactéries. Le petit matériel a été constitué d'anse de platine utilisé pour l'ensemencement du produit biologique et des colonies bactériennes. Le Bec bunsen a été utilisé pour créer la zone de stérilité du plan de travail ; les boîtes de Pétri ont servi à couler la gélose d'agarose ; les lames et lamelles ont été utilisées pour l'observation des bactéries au microscope optique ; le masque a servi pour se protéger des infections transmissibles par voies aériennes ; la micropipette a été utilisée pour prélever l'échantillon afin de le déposer sur la lame et/ ou sur les boîtes de Pétri. Les milieux de culture utilisés ont été principalement la gélose Columbia (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette, France) additionnée de 5% de sang frais de mouton utilisée pour l'isolement de *S. pneumoniae* ; la gélose Columbia (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette France) au sang cuit de mouton supplémentée de polyviteX (GSC+ PVX) ayant servi à l'isolement des germes *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* ; la gélose Chapman-Mannitol salée (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette, France) a servi à l'isolement de *S. aureus* ; la gélose Eosine au Bleu de Méthylène (EMB) (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette , France) a servi à l'isolement de *K. pneumoniae*.

1.6.1.2- Réactifs pour l'identification des bactéries

Les réactifs utilisés ont été l'urée-indole de Ferguson (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) qui a servi à savoir si les bactéries sont uréolytiques ; le disque d'oxydase (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette, France) a servi à mettre en évidence la production du cytochrome C oxydase de la bactérie ; le disque d'optochine (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette, France) est un disque imprégné d'antibiotique ayant permis de confirmer l'identification de la bactérie *S. pneumonie* par la mesure de la zone d'inhibition ; l'eau oxygénée a permis de mettre en évidence le métabolisme respiratoire de la bactérie ; le réactif de kovacs a servi à mettre en évidence le caractère indologène de la bactérie ; le kit de contrôle de Gram Nicolle (RAL Diagnostics, La Chapelle-sur-Erdre cedex, France) comprenant la solution de Fuschine, la solution de Cristal violet (violet de gentiane), le lugol et l'alcool éthylique 90° a servi dans la coloration de Gram afin de mettre en évidence la forme et la coloration des bactéries au microscope optique.

Le bouillon coeur cervelle (BCC) (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette, France) a servi à déterminer la mobilité des bactéries et le portoir réduit de Le Minor comprenant les milieux citrate de Simmons, Lysine-Fer, Kligler-Hajna et Mannitol mobilité ont servi à identifier les caractères biochimiques des bactéries.

1.6.1.3- Matériel et réactifs pour la réalisation de l'antibiogramme

Les milieux utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme ont été la gélose Mueller Hinton (MH) de (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) pour l'isolement des bactéries non exigeantes et la gélose MH au sang de cheval défibriné et additionnée de β -NAD (MH-F) pour l'isolement des bactéries exigeantes. La solution saline NaCl 0,85 % Medium 2 mL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) a servi à préparer un mélange homogène de la bactérie pour réaliser l'antibiogramme.

Le densitomètre (ATB 1550), l'étuve (Thermo Fisher Scientific, Wyman Street Waltham, États-Unis), un applicateur manuel de disques (Becton Dickinson), des écouvillons (Dutscher), un vortex (Velp Scientifica) ont servi à la réalisation de l'antibiogramme. La lecture des boîtes et l'interprétation des résultats ont été faites par la méthode automatisée à l'aide de l'automate ADAGIO (Biorad, France) par capture de l'image des boîtes avec une caméra de lecture selon les recommandations du CA-SFM (2016).

Un panel de 16 disques imprégnés antibiotiques (SirScan Discs, France) de différentes familles ont été également utilisés pour la détermination de la résistance des bactéries dans cette étude.

La liste des disques d'antibiotiques utilisés dans cette étude pour *K. pneumoniae* et *S. pneumoniae* et les diamètres critiques (break points) ont été consignés dans les **Tableaux III et IV**.

Tableau III: Liste des antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* CA-SFM, 2016

Familles	Antibiotiques	Sigle	Charge des disques (μg)	Diamètres critiques	
				S \geq	R<
Pénicillines	Ticarcilline	TIC	75	23	20
	Pipéracilline	PIP	30	20	17
	Ampicilline	AMP	10	14	14
	Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	20	19	19
	Mécillinam	MEC	10	15	15
	Ticarcilline + ac	TCC	75- 10	23	20
Céphalosporines	Céfixime	CFM	5	17	17
	Céfoxitine	FOX	30	19	15
	Ceftriaxone	CRO	30	25	22
	Céfotaxime	CTX	5	20	17
	Céfépime	FEP	30	27	21
	Céfuroxime	CXM	30	19	19
	Ceftazidime	CZD	10	22	19
Fluoroquinolones/ Quinolones	Ofloxacine	OFX	5	24	22
	Norfloxacine	NOR	10	22	19
	Ciprofloxacine	CIP	5	26	24
	Acide nalidixique	NAL	30	19	14
	Péfloxacine	PEF	5	24	24
Sulfamides	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole	SXT	1,25- 23,75	14	11
	Gentamicine	GMN	10	17	14
Aminosides	Tobramycine	TMN	10	17	14
Carbapénèmes	imipénème	IPM	10	22	16
	Méropénème	MEM	10	22	16
Phénicol	Chloramphénicol	CHL	30	17	17
Monobactames	Aztréonam	ATM	30	26	21
Nitrofurantoïne	Nitrofuranes	NFE	100	11	11
Fosfomycine	Fosfomycine	FSF	200	19	19

Tableau IV: Liste antibiotiques pour *Streptococcus pneumoniae* CA-SFM, 2016

Familles	Antibiotiques	Sigle	Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)	
				S ≥	R <
Pénicillines	Pénicilline	PEN	6		
Céphalosporines (C3G)	Ceftriaxone	CRO	1- 32		
	Céfotaxime	CTX	1- 32		
	Céfépime	FEP	1- 32		
Fluoroquinolones	Norfloxacin	NOR	10		
	Acide nalidixique	NAL	30	19	14
	Ciprofloxacine	CIP	5		
Sulfamides	Triméthoprimé/ sulfaméthoxazole	SXT	1,25- 23,75	18	15
Phénicol	Chloramphénicol	CHL	30	19	19
Glycopeptides	Vancomycine	VAN	5	13	13
	Gentamicine	GEN	500		
Aminosides	Erythromycine	ERY	15	22	19
Macrolides	Clindamycine	CMN	2	19	19
Lyncosamides	Pristinamycine	PTN	15	19	19
Synergistine					

1.6.2- Matériel et réactifs pour la caractérisation moléculaire

L'automate MagNA Pure Compact nucleic acids (Roche) a été utilisé pour l'extraction des acides nucléiques des bactéries selon les indications du fabricant (**annexe 1**) en utilisant le kit Pure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche Diagnostic1, Mannheim, Germany). Le thermocycleur ABI Fast[®] 7500 (**annexe 2**), les plaques ABI, le kit Fast-track diagnostic (FTD) bacterial pneumonia_CAP ont servi pour l'amplification de l'acide nucléique des bactéries (**tableau V**). Les amorces et séquences utilisées sont listées dans le **tableau VI**.

Ensuite, le kit QIAamp[®] DNA Mini (Qiagen, GmbH) comprenant du tampon AVE, du tampon AVL, du tampon AW1, du tampon AW2, du tampon d'élution (AE) et le kit Fast-track diagnostic FTD Pneumocystis PCR ont été le matériel utilisé pour l'extraction et l'amplification de *Pneumocystis jirovecii*.

Enfin, les analyses virologiques ont été précédées par l'extraction des ARN et ADN en utilisant le kit QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden) comprenant du tampon AVE, du transporteur d'ARN lyophilisé, du tampon AVL, du tampon AW1, du tampon AW2, de l'éthanol 95-100 %. Les Kit Invitrogen Real Time PCR Template - superScript III Platinum, One step qRT-PCR systeme ont été utilisés pour l'amplification de l'ADN et ARN des virus respiratoires (**tableau VII**).

Tableau V: Différents constituants du kit Fast Track Diagnostic bacterial pneumonia_CAP

	Contenant
CAP1PP	<u>Amorce/sonde</u> : <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> et <i>Moraxella catarrhalis</i>
CAP2PP	<u>Amorce/sonde</u> : <i>Legionella sp.</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> et <i>Chlamydia pneumoniae</i>
CAP1 PC	<u>Contrôle positif 1</u> : <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> et <i>Moraxella catarrhalis</i>
CAP2 PC	Contrôle positif 2: <i>Legionella sp.</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> et <i>Chlamydia pneumoniae</i>
NC	Contrôle négatif
IC	Contrôle interne
Enzyme	25x RT-PCR
Tampon	2x RT-PCR buffer (Fast-track mastermix)

CAP : Community-acquired pneumonia

CAP1PP : Mélange réactionnel 1 contenant les amorces et les sondes des bactéries *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*

CAP2PP : Mélange réactionnel 2 contenant les amorces et les sondes des bactéries *Legionella sp.*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*

CAP1PC : Mélange réactionnel 1 contenant les contrôles positifs des bactéries *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*

CAP2PC : Mélange réactionnel 2 contenant les contrôles positifs des bactéries *Legionella sp.*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*

NC : contrôle négatif

IC : contrôle interne

Tableau VI: Bactéries recherchées et gènes ciblés

Bactéries	Gène	Séquence (5'- 3')	Auteurs
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MP5	F : GAAGCTTATGGTACAGGTTGG R : ATTACCATCCTTGTTGTAAGG	Bernet <i>et al.</i>, 1989
<i>Legionella pneumophila</i>	MIP	F : GCAATGTCAACAGCAA R : CATAGCGTCTTGCATG	Wilson <i>et al.</i>, 2003
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	MOMP	F : CAGGACATCTTGTCTGGCTT R : CAAGGATCGCAAGGATCTCC	Yoshida <i>et al.</i>, 1998
<i>Moraxella catarrhalis</i>	copB	F : TGGCGGTGAGTGCCG R : AGCCGTGCTTTCGTCTTTTTTC	Greiner <i>et al.</i>, 2003
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	lytA	F : GGCTACTGGTACGTACATTC R : AATCAAGCCATCTGGCTCTA	Messmer <i>et al.</i>, 1995
<i>Haemophilus influenzae</i>	omp P6	F : CGGTTTTGATAAATATGACATTACT R : CTAAATAACCTTTAACTGCATCT	Vu <i>et al.</i>, 2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	nuc	F : GCGATTGATGGTGATACGGTT R : AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	Brakstad <i>et al.</i>, 1992

Tableau VII: Amorces et sondes utilisées pour la recherche des virus respiratoires

Virus	Gène (position)	Séquence (5' - 3')
PIV-1	Hemagglutinine	Fwd: GTTGTCAATGTCTTAATTCGTATCAATAATT
	Neuraminidase	Rev: GTAGCCTMCCTTCGGCACCTAA
	(1191-1299)	Pr:(FAM)-TAGGCCAAAGATTGTTGTGCGAGACTATTCCAA-(TAMRA)
PIV-2	Hemagglutinine	Fwd: GCATTTCCAATCTTCAGGACTATGA
	Neuraminidase	Rev: ACCTCCTGGTATAGCAGTGACTGAAC
	(767-856)	Pr: (CY5)-CCATTTACCTAAGTGATGGAATCAATCGCAAA-(BHQ-2)
PIV-3	Hemagglutinine	Fwd: TGATGAAAGATCAGATTATGCATATC
	Neuraminidase	Rev: CCGCGACACCCAGTTGTG
	(822-1070)	Pr: (ROX)-TGGACCAGGGATATACTACAAAGGCAAAAT-(BHQ-2)
COV OC43	Protéine de la	Fwd : CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT
	Nucléocapside	Rev : CCTTCCTGAGCCTTAATATAGTAACC
	(29607-29682)	Pr : (ROX)-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-(BHQ-2)
HRV	Région 5' Non	Fwd : AGTCCTCCGGCCCCTGAAT
	codante	Rev : ACACGGACACCCAAAGTAGT
	(441-558)	Pr : (CY5)-TGAGCAATTGTGGATGGGA-(BHQ-2)
FLUB	Hemagglutinine	Fwd : AAATACGGTGGATTAAATAAAAGCAA
	(937-1106)	Rev : CCAGCAATAGCTCCGAAGCAA
		Pr : (JOE)-CACCCATATTGGGCAATTTCTATGGC-(BHQ-1)
HMPV	Protéine de la	Fwd : ATGTCTCTTCAAGGGATTACCT
	Nucléocapside	Rev : AMAGYGTTATTTCTTGTGCAATGATGA
	(1-139)	Pr : (JOE)-CATGCTATATTAAGAGTCTCARTAC-(BHQ-1)
VRS	Protéine de la	Fwd : GCAAATATGCAAACATACGTGAACA
	Matrix	Rev : GCACCCATATTGTWAGTGATGCA
	(3255-3369)	Pr : (ROX)-CTTCACGAAGGCTCCACATACACAGCWG-(BHQ-2)
FLUA	Protéine de la	Fwd : CTTCTAACCGAGGTCGAAACG
	Matrix (7-251)	Rev : AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA
		Pr : (FAM)-CCTCAAAGCCGAGATCGCGCA-(BHQ-1)
COV- 229E	Protéine de la	Fwd : CAGTCAAATGGGCTGATGCA
	Nucléocapside	Rev : AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTCT
	(25712-25768)	Pr : (FAM)-CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA-(TAMRA)
	Proteine de la	Fwd : CCTTGCGAATGAATGTGCT
	Nucléocapside	Rev : TTGCATCACCACTGCTAGTACCAC

	COV- HKU1	(28409-28847)	Pr : (CY5)-TGTGTGGCGGTTGCTATTATGTTAAGCCTG-(BHQ-2)
4	COV- NL63	Protéine de la Nucleocapside (360-469)	Fwd : ACCTAATAAGCCTCTTTCTCAACCC Rev : GACCAAAGCACTGAATAACATTTTCC Pr : (JOE)-AACACGATTCCAACGAGGTTTCTTCAACTGAG-(BHQ-1)
	ADV	Protéine de l' Hexon (18858-18989)	Fwd : GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT Rev : GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC Pr : (FAM)-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-(TAMRA)
5	BOV	Protéine non Structurale (2391-2466)	Fwd : GCACAGCCACGTGACGAA Rev : TGGACTCCCTTTTCTTTTGTAGGA Pr : (JOE)-TGAGCTCAGGGAATATGAAAGACAAGCATCG-(BHQ-1)

Fwd=Forward (amorce sens); Rev=Reverse (amorce anti-sens); Pr=Probe (sonde spécifique); 6-FAM=6-Carboxyfluoresceine; TAMRA=Tétramethylrhodamine; JOE=6-carboxy-dichloro-diméthoxyfluoresceine; BHQ-1, -2=Black Hole Quencher™-1, -2; ROX=6-Carboxyl-X-Rhodamine; Cy5=Cyanin-5.

PIV-1 ; -2, -3 : Virus Parainfluenzae 1, 2 et 3

COV OC43 : Coronavirus OC43

HRV : Rhinovirus Humain

FLUB : Virus influenza B

HMPV : Métapneumovirus Humain

VRS : Virus Respiratoire Syncytial

FLUA : Virus influenza A

COV-229E : Coronavirus 229 E

COV-HKU1 : Coronavirus HKU1

COV-NL63: Coronavirus NL63

ADV : Adénovirus

BOV : Bocavirus

2- Méthodes

2.1- Test de la sérologie au VIH

Des prélèvements sanguins ont été réalisés chez les patients présélectionnés. Sur ceux-ci, le test du dépistage du VIH a été réalisé grâce au test rapide *Détermine* HIV-1/2.

Le sang prélevé dans un tube à bouchon rouge a été centrifugé à 1500 tours/minute. Ainsi, à l'aide d'une pipette de précision, 50 µl de sérum ont été prélevés et déposés sur le tampon absorbant qui est sur la bandelette. La lecture du résultat s'est faite après 15 minutes. Le test était positif s'il apparaissait 2 bandes quelle que soit leur intensité à la fois dans la zone de contrôle et celle du patient. Quant au résultat négatif, il se traduisait par l'apparition d'une bande dans la zone de contrôle et aucune dans la zone du patient.

2.2- Recherche du bacille tuberculeux

De même sur les patients, la recherche des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) a été faite à l'examen direct en microscopie sous coloration de frottis au Ziehl-Neelsen. Pour ce faire, un prélèvement de crachat a été étalé sur une lame posée sur son support et par la suite a été recouverte de fuschine phéniquée. La lame a été imbibée d'alcool puis flammée et chauffée par le dessous jusqu'à émission de vapeurs par le colorant mais sans aller jusqu'à l'ébullition. L'opération a été répétée deux fois le tout en une dizaine de minutes. La lame a été lavée à l'eau et recouverte d'acide sulfurique dilué au quart dans l'eau pendant 2 min, la coloration devient jaunâtre. La lame a été lavée une seconde fois à l'eau et recouverte d'alcool à 95 ° pendant 3 min, la coloration devient rose pâle. La lame a été de nouveau lavée à l'eau et recouverte de bleu de méthylène phéniqué pendant 30 secondes. Un dernier lavage a été effectué à l'eau, essuyé et séché.

La lecture a été faite au microscope à l'objectif x100 avec l'huile à immersion pendant au moins 10 min. Les BAAR apparaissent en rouge sur un fond bleu. Le nombre de BAAR a été compté systématiquement dans chaque champ.

2.3- Echantillonnage

Lorsque les patients ne présentaient pas de tuberculose et que leurs états de santé étaient satisfaisants, ils subissaient une fibroscopie bronchique pour l'obtention du liquide broncho-alvéolaire (LBA). Le LBA est un prélèvement invasif effectué sous un endoscope. Il a consisté à injecter puis à aspirer 4 à 6 fois un volume de 50 ml de sérum physiologique à travers un fibroscope placé dans une bronche sous segmentaire. Il a l'avantage d'explorer une vaste zone de poumons, des bronchioles distales et jusqu'à 100 millions d'alvéoles. Le LBA prélevé et recueilli dans un récipient stérile à usage unique a été acheminé immédiatement à l'unité de bactériologie clinique (UBC) de

l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, site de Cocody, pour réaliser des analyses microbiologiques et plus tard des analyses moléculaires à la Plateforme de Biologie Moléculaire et au département des virus respiratoires de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, site d'Adiopo-doumé.

2.3.1- Critères d'inclusion

Les patients de dix-huit (18) ans et plus, de tout sexe confondu, ayant des signes cliniques, des images radiologiques en faveur d'une pneumopathie alvéolo-interstitielle confirmée par la radiographie du thorax, la recherche des BAAR négative dans les expectorations, et hospitalisés pendant la période d'étude pour prise en charge ont été inclus.

2.3.2- Critères de non-inclusion

Les patients de moins de 18 ans, les patients détectés tuberculeux, ceux refusant de faire la fibroscopie ou ceux décédés de façon précoce en cours d'hospitalisation sans avoir fait la fibroscopie n'ont pas été inclus.

2.4- Collecte et analyses des données

Les données ont été collectées sur une fiche d'enquête pré établie. Elles ont été traitées avec Word Office 2010 Microsoft, la saisie et l'analyse des variables ont été faites avec le logiciel STATA version 15.0 et les graphiques ont été réalisés à partir d'Excel Office 2013 Microsoft. Les tests statistiques utilisés sont le test de Khi 2. Le seuil de significativité a été le test de l'écart type avec un seuil $\alpha = 0,05$.

2.5- Considérations éthiques

Un consentement éclairé écrit a été obtenu chez tous les patients avant leur inclusion dans l'étude (**Annexe 3**). Le respect de l'anonymat a été assuré par l'utilisation des numéros d'anonymats lors de l'analyse des données. Les données ont été collectées avec l'accord du service de Pneumophysiologie du CHU de Cocody. Ainsi, l'étude a eu l'approbation du Comité National d'Ethique et de Recherche sous la référence N° 31/MSLS/CNER-dkn du 23 juin 2015 (**Annexe 4**).

2.6- Identification des bactéries par les méthodes conventionnelles

L'isolement et l'identification des bactéries ont été réalisés par des méthodes culturales et biochimiques standards.

2.6.1- Examen microscopique et coloration de Gram direct des échantillons de LBA

Un examen microscopique a été réalisé sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Ainsi, sur une lame porte objet, une goutte du LBA a été déposée et recouverte d'une lamelle. Cette préparation a été déposée sur un microscope optique à l'objectif x 40 pour la visualisation.

L'état frais a permis d'observer la présence des cellules épithéliales, des leucocytes, des cellules bronchiques ou alvéolaires et des bactéries.

Après l'observation de l'état frais des échantillons de LBA, des étalements ont été faits sur des lames porte-objet à partir du culot obtenu après centrifugation suivi de coloration de Gram.

En effet, chaque culot a été déposé sur la lame porte-objet qui a été ensuite séchée à température ambiante puis flambée au feu après ajout de quelques gouttes d'alcool pour la fixation.

La coloration proprement dite a débuté par le recouvrement du frottis avec le violet de gentiane pendant une minute. Elle est ensuite rincée avec de l'eau de robinet et recouverte de lugol (mordant) pendant une minute. Un deuxième rinçage avec de l'eau de robinet a été effectué suivi d'une décoloration avec de l'alcool à 90° pendant 5 à 10 secondes. Enfin la lame a été recouverte avec de la fuschine pendant 30 secondes, rincée et séchée à la température ambiante. La lecture s'est effectuée au microscope optique à l'objectif ×100 avec de l'huile à immersion afin d'apprécier la morphologie des bactéries. La coloration de Gram a permis de déterminer la morphologie, le mode de regroupement et de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Ainsi, le choix des milieux de culture pour les ensemencements a été faite en fonction des résultats de la coloration de gram obtenu.

2.6.2- Ensemencement

Après la coloration de Gram, les échantillons de LBA ont été ensemencés sur quatre milieux dont deux sélectifs et deux d'enrichissement (**Halima, 2015**). Dans des conditions d'asepsie, les échantillons de LBA ont été prélevés à l'aide d'une pipette pasteur, et ont été ensemencés sur les boites contenant les différents milieux. Ce sont les géloses éosine au bleu de méthylène (EMB), les géloses chapman-mannitol au sel, les géloses Columbia avec 5% de sang frais de mouton additionné de 5 g/mL de gentamicine (GSF) et les géloses Columbia additionnée de 5% de sang cuit de mouton supplémenté de polyvitex (GSC). Ces géloses ont permis la détection respective de *K. pneumoniae*, de *S. aureus*, de *S. pneumoniae*, de *H. influenzae* et *M. catarrhalis*.

L'ensemencement a consisté à déposer à l'aide d'une pipette compte-goutte, une goutte de l'échantillon sur les différents milieux précités. Ensuite, avec une pipette Pasteur stérile, des stries d'ensemencement ont été faites selon la méthode des cadrans.

Les boîtes contenant les milieux GSF et GSC ont été incubés dans une étuve à 37° C pendant 24 heures dans une atmosphère enrichie en CO₂ en anaérobiose pour la recherche des bactéries exigeantes : *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ; tandis que les autres boîtes contenant les milieux ordinaires, EMB, Chapman, ADNase ont été incubés dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures en aérobie pour les bactéries non exigeantes telles que *K. pneumoniae* et *S. aureus*.

2.6.3- Etude bactériologique

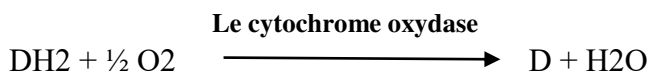
L'identification des bactéries a été effectuée en utilisant les caractères morphologiques (la forme, la couleur, la taille, l'odeur à partir des boîtes de pétrie) et biochimiques (activités enzymatiques simples, catalase et oxydase, activités enzymatiques métaboliques, métabolisme des sucres) (Zriyra, 2013).

2.6.3.1- Recherche des enzymes respiratoires

2.6.3.1.1- Test de recherche de l'oxydase

Principe :

Le cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation du type :



En présence d'oxygène ambiant, cette enzyme peut oxyder un substrat incolore en un produit (Le PDA, N-diméthyl paraphénylène diamine) facilement repérable car coloré d'une couleur violette :
Substrat réduit incolore \longrightarrow Produit oxydé coloré.

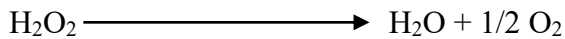
Protocole

Pour se faire, un disque d'oxydase imbibé d'eau physiologique stérile a été déposée sur une lame porte objet, ensuite une colonie suspecte a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et déposée sur le disque d'oxydase humidifiée.

2.6.3.1.2- Test de la recherche à la catalase

Principe :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries. Dans cette réaction, le peroxyde d'hydrogène agit comme donneur et accepteur d'électrons.



La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification bactérienne.

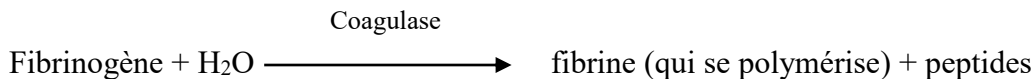
Protocole :

Sur une lame, une goutte de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) a été déposée. Ensuite, une colonie suspecte a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et a été déposée sur la goutte d'eau oxygénée.

2.6.3.1.3- Recherche de la coagulase

Principe :

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. La coagulase libre est une enzyme capable de coaguler le plasma de lapin, recueilli sur anticoagulant, *in vitro*.



Protocole

Une colonie bactérienne a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et a été plongée dans 1ml du plasma citraté humain puis ce mélange a été agité et incubé pendant 4 heures dans une étuve à 37°C.

2.6.3.3.4- Test de recherche de désoxyribonucléase (ADNase)

Principe :

Certaines bactéries élaborent une exo-enzyme capable d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique (ADN). La mise en évidence de l'ADNase consiste à cultiver la souche en présence d'ADN et à détecter l'hydrolyse éventuelle de l'ADN grâce à : l'acide chlorhydrique (HCl), qui a la propriété de précipiter l'ADN.

Protocole :

La recherche de l'ADNase (Désoxyribonucléase) a été obtenue en ensemencant sur la gélose ADN, une colonie bactérienne prise de la gélose Chapman noté positive. Une strie de surface sur le milieu de la gélose ADN a été effectuée puis la gélose a été incubée à 37°C pendant 24 heures dans une

étuve. Il y'aura un développement. La surface de la gélose a été inondée avec quelques millilitres d'acide chlorhydrique (HCl).

Puis, la gélose a été laissée à l'air libre pendant 10 minutes au repos et l'excès d'HCl a été réaspiré avec une pipette compte- goutte afin d'observer la réaction qui s'est produite.

2.6.3.3.5- Test d'optochine

Principe

Le test d'optochine est utilisé pour distinguer le pneumocoque des autres Streptocoques α -hémolytiques.

Protocole :

Une souche présumée de *Streptococcus pneumoniae* a été ensemencé sur le milieu gélose au sang frais. Ensuite, à l'aide d'une pince flambée et refroidie, un disque imprégné d'optochine a été déposé dans la première partie, à 1,5 cm du bord de la boîte de Pétri et enfin la boîte a été incubée pendant 18 heures à 35 °C sous 10% de CO₂.

2.6.3.2- Tests d'identification biochimiques

La galerie classique (portoir réduit de Le Minor) nous a permis de faire l'identification bactérienne, en s'appuyant sur ces caractères biochimiques.

2.6.3.2.1- Utilisation du citrate de simmons

Le milieu citrate de simmons du portoir réduit de Leminor a été coulé en tube et n'a pas comporté de culot. Ce milieu a été ensemencé par stries longitudinales sur la pente. La présence de colonies sur la pente et/ou le virage du milieu du vert au bleu indique que la bactérie est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone pour sa croissance.

2.6.3.2.2- Détermination de la production d'uréase et d'indole

Le milieu urée-tryptophane appelé improprement milieu urée- indole fait partie du portoir réduit de Le Minor.

Il est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles pour la différenciation des entérobactéries. Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase très active. En effet, en présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu et fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du

jaune au rouge-rose en milieu basique. L'ensemencement du milieu urée-indole a été réalisé en émulsionnant une colonie dans le milieu et en incubant à 37°C dans une étuve pendant 24 heures. Après, 3 gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutés à l'aide d'une pipette compte-goutte. Le diméthylamino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs est capable de réagir avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase pour former un anneau coloré en rouge à l'interface du tube, traduisant une réaction positive. La lecture a été faite après 24 heures d'incubation à 37°C.

2.6.3.4.3- Milieu Lysine- fer

Le milieu du portoir réduit de Leminor de couleur violette a été coulé en tube et comporte une pente et un culot. Ce milieu a permis de mettre en évidence deux caractères biochimiques : la lysine désaminase (LDA) qui est lu sur la pente et la lysine décarboxylase (LDC) sur le culot. A partir d'une suspension bactérienne, un ensemencement a été fait par piqure centrale dans le culot à l'aide d'une pipette Pasteur fermée stérile et un ensemencement par stries longitudinales serrées sur la pente a été fait. Le milieu a été incubé à 37°C pendant 24 heures et la présence de colonies sur la pente et/ou le virage du milieu du violet au rouge vin indique que la bactérie possède la lysine désaminase. De même, la coloration inchangée violette du milieu dans le culot a mis en évidence la lysine décarboxylase de la bactérie.

2.6.3.4.4- Milieu kligler- hajna

Le milieu du portoir réduit de Leminor de couleur orange a été coulé en pente et en culot. Ce milieu d'identification a permis de mettre en évidence la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz, la dégradation du lactose, la production de l'hydrogène sulfuré (H₂S). A partir d'une suspension bactérienne, un ensemencement a été fait par piqure centrale dans le culot à l'aide d'une pipette Pasteur fermée stérile et un ensemencement par stries longitudinales serrées sur la pente a été fait. Le milieu a été incubé à 37°C pendant 24 heures. L'acidification du culot, en anaérobiose traduit que le glucose a été dégradé en produits acides et a été révélé par le virage de l'indicateur coloré le rouge de phénol à sa teinte acide jaune. De même, l'acidification de la pente en aérobiose indique que le lactose a été dégradé en produits acides entraînant l'indicateur de pH à rester à sa teinte acide jaune. La présence de thiosulfate de sodium dans le milieu et de fer III a permis d'apprécier la capacité des bactéries à produire de l'H₂S à partir du thiosulfate. L'H₂S a formé un précipité noir avec le fer III par la réduction du thiosulfate de sodium.

2.6.3.3- Test complémentaire : Test de mobilité

Le test de mobilité des bactéries a été réalisé à l'état frais. Pour ce faire, une colonie de la bactérie à étudier a été ensemencée dans un tube à hémolyse contenant 3 mL de bouillon cœur cerveau (BCC) puis incubée pendant 3 heures à 37°C dans une étuve.

Ensuite, une goutte de ce bouillon a été déposée entre lame et lamelle afin de déterminer la mobilité des bactéries au microscope optique à l'objectif × 40.

2.6.3.4- Traitement avec les antimicrobiens

2.6.3.4.1- L'antibiogramme

Principe :

L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne. Il permet de déterminer l'efficacité d'un antibiotique vis-à-vis une infection bactérienne.

Protocole

Dans des conditions stériles, une suspension bactérienne a été préparée à partir des souches obtenues sur les différents milieux. A l'aide d'une anse, une colonie a été prélevée et plongée dans une suspension d'eau physiologique. Afin d'avoir de bons résultats, on a été obligé de passer par la standardisation pour déterminer l'absorbance à une densité optique (DO) qui se situe de 0,08 jusqu'à 0,1 à 680 nm. Après avoir mesuré la D.O, un écouvillon a été plongé dans le tube qui contient la suspension, et a été étalé sur la gélose Muller Hinton dans toutes les directions.

A l'aide d'une pince métallique, on a déposé les disques d'antibiotiques dans la zone stérile. Ces boîtes ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

2.6.3.4.2- Préparation de l'inoculum bactérien

A partir de culture de souche pure de 24 heures obtenue sur une gélose nutritive, une à deux colonies ont été émulsionnées dans un tube contenant 2 mL d'eau physiologique NaCl 0,85%. Ensuite, la suspension obtenue a été homogénéisée à l'aide d'un vortex. La densité du mélange a été ajustée à l'aide d'un densimat à 0,5 MacFarland (10^8 UFC/mL).

2.6.3.4.3- Ensemencement de la gélose Mueller Hinton MH et Mueller Hinton F

Les géloses MH et MH-F ont été ensemencées par écouvillonnage en utilisant l'inoculum bactérien.

Selon l'EUCAST CA- SFM 2016, un écouvillon en coton stérile a été plongé dans la suspension bactérienne et l'excès de liquide a été éliminé en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. La totalité de la surface des géloses MH et MH-F a été écouvillonnée par la suspension bactérienne. Ainsi, les boîtes ensemencées ont été séchées pendant environ 15 min à température ambiante sur les paillasse du laboratoire.

2.6.3.4.4- Pose des disques et pré diffusion des antibiotiques

La technique des disques a consisté à utiliser des disques de papier imprégnés de différents antibiotiques à tester. Après séchage des géloses MH et MH-F, les disques d'antibiotiques ont été disposés à la surface des géloses uniformément ensemencées avec une suspension de la bactérie à étudier à l'aide d'un applicateur de disques. Autour des disques, une zone circulaire indemne de colonies, zone d'inhibition est observée. Au bout de 24 h d'incubation à l'étuve, les différents diamètres d'inhibition ont été lus. Les conclusions ont été faites en comparant les résultats obtenus aux abaques de lecture de la CA-SFM.

2.6.3.4.5- Lecture et interpretation d'antibiogramme

La lecture des boîtes et l'interprétation des résultats ont été faites par la méthode automatisée à l'aide d'un automate nommé ADAGIO (Biorad, France) par capture de l'image des boîtes avec une caméra de lecture.

Les résultats ont été transcrits en catégories :

- Sensibles (S),
- Intermédiaires (I),
- Résistants (R)

Selon les recommandations du CA-SFM 2016, les différents phénotypes des souches ont été déterminés également selon les familles d'antibiotiques testées.

2.6.3.4.6- Détection de la production des β -lactamase à spectre élargi (BLSE)

Le test de double synergie a été utilisé pour la détection des souches productrices de BLSE (Jarlier *et al.*, 1988). Les disques de cefotaxime, de ceftazidime, de céfépime, de céftriaxone, céfixime et d'aztréonam ont été disposés autour d'un disque d'amoxicilline/acide clavulanique sur la gélose Mueller Hinton (BioMérieux, France). La présence d'une BLSE s'est traduite par l'apparition d'une synergie entre les disques d'oxymino- β -lactamine et le disque contenant l'acide clavulanique.

Celle-ci s'est matérialisée par une image en forme de bouchon de champagne (effet potentialisateur de l'acide clavulanique).

2.7- Extraction et amplification du matériel génétique des agents pathogènes

2.7.1- Extraction et amplification d'ADN des bactéries

L'extraction a été effectuée de manière automatisée à l'aide de l'automate MagNa[®] Pure (Roche Diagnostics) (**Annexe 1**).

Pour extraire l'ADN total bactérien, un volume de 600 µL de LBA a été introduit dans un tube échantillon. Ce tube a été d'abord incubé dans le thermomixer à 95°C à 500 rpm pendant 2 minutes afin de lyser les cellules par choc thermique et ainsi libérer l'ADN. Puis, au bout de 28 minutes d'incubation, 100 µL d'ADN ont été recueillis et conservés pour les réactions d'amplification.

Après l'extraction, une PCR multiplex en temps réel a été utilisée pour la détection de l'ADN des bactéries. Le principe de la PCR temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR en utilisant des sondes fluorescentes. La mesure de la fluorescence permet de déterminer en temps réel si le fragment recherché (amplicon) a été effectivement présent et donc amplifié sans avoir besoin de faire une électrophorèse. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN (**Bustin et al., 2010**).

Pour détecter les agents pathogènes respiratoires, un kit FTD Respiratory Pathogens 32 (Fast Track Diagnostics, Luxembourg) a été utilisé. Ce kit utilise une technique d'amplification multiplex à 2 tubes pour la détection et l'identification simultanée des bactéries respiratoires suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella sp*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumophila*, et *Streptococcus equi* utilisé comme contrôle interne.

La réaction a nécessité l'ajout successif de 1,5 µL d'un mix prêt à l'emploi Master Mix CAP-PP, 1 µL de la Taq ADN polymérase (25 X RT-PCR), 12,5 µL de tampon (2XRT-PCR) et 10 µL d'ADN dans un volume réactionnel total de 25 µL. Ces mélanges mis dans les tubes adéquats pour le thermocycler ont été fermés avec du film adhésif ABI et homogénéisés pendant 30 secondes. Puis ces tubes ont été disposés dans les capillaires du Thermocycler Applied Biosystems ABI[®] 7500 Real-Time Fast (Roche Diagnostics, Life Technologies, Californie, États-Unis) pour la réaction d'amplification.

L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 15 minutes à une température de 94°C. Cette étape a été suivie de 40 cycles d'amplification composée d'une phase de dénaturation pendant 3 minutes à 94°C, une phase d'hybridation à 42°C pendant 8 secondes et une étape d'élongation finale de 34 secondes à 60°C. L'acquisition du signal de fluorescence a été faite à chaque cycle pendant l'étape d'hybridation. Pour la détection du signal fluorescent, un réarrangement a été fait avec les fluorochromes de l'automate ABI® 7500 FAST et ceux du Kit FTD bacterial (**tableau VIII**).

Tableau VIII: Amorces, sondes et colorants des sondes du kit Fast Track Diagnostic et du thermocycler

Sondes/ amorces	Pathogènes détectés	Colorant du kit FTD	Colorant du 7500 Fast ABI	Longueur d'onde de détection (nm) sur ABI [®] 7500
CAP1	<i>S. aureus</i>	Vert	FAM	520
	<i>H. influenzae</i>	Jaune	JOE	550
	<i>M. catarrhalis</i>	Orange	ROX	610
	<i>S. pneumoniae</i>	Rouge	CY5	670
	<i>Legionella sp</i>	Vert	FAM	520
CAP2	<i>C. pneumoniae</i>	Jaune	JOE	550
	<i>S. equi</i> *	Orange	ROX	610
	<i>M. pneumoniae</i>	Rouge	CY5	670

CAP : Community acquired pneumonia (pneumonie communautaire)

FAM=6-Carboxyfluoresceine

JOE=6-carboxy-dichloro-diméthoxyfluoresceine

ROX=6-Carboxyl-X-Rhodamine

Cy5=Cyanin-5

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

H. influenzae : *Haemophilus influenzae*

M. catarrhalis : *Moraxella catarrhalis*

S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

C. pneumoniae : *Chlamydia pneumoniae*

M. pneumoniae : *Mycoplasma pneumoniae*

S. equi : *Streptococcus equi* * est le contrôle interne

2.7.2- Extraction et amplification de l'ADN de *Pneumocystis jirovecii*

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit Qiagen (Hilden, Allemagne) selon les conditions spécifiées par les fournisseurs.

Un volume de 20 µL de protéase ou protéinase K a été prélevé et mis dans un tube Eppendorf de 1,5 mL auxquels ont été ajoutés 200 µL d'échantillon de LBA et 200 µL de tampon de lyse AL. Le mélange a été homogénéisé au vortex pendant 15 secondes, puis incubé dans un thermomixer à 56°C à 500 rpm pendant 10 minutes. Après une centrifugation à 8000 rpm pendant 30 secondes, 200 µL d'éthanol (96-100%) ont été ajoutés. Après avoir mélangé à nouveau en homogénéisant au vortex pendant 15 secondes, le mélange a été centrifugé de nouveau à 8000 rpm pendant 30 secondes et transvasé soigneusement du tube eppendorf au tube de la micro-colonne QIAamp Mini. La micro-colonne est composée d'un tube à filtre placé dans un tube collecteur de 2 mL. Le filtre permet de fixer l'ADN, tandis que les protéines et autres impuretés sont éliminées grâce à deux lavages. La colonne a été centrifugée à 8000 rpm pendant 30 secondes. Après avoir éliminé le contenu du tube, 500 µL de solution du tampon de lavage AW1 ont été ajoutés et le mélange a été centrifugé à 8000 rpm pendant 30 secondes, le contenu du tube contenant le filtrat a été jeté de nouveau et 500 µL du tampon de lavage AW2 ont été ajoutés dans la colonne QIAamp Mini et le mélange a été centrifugé à 8000 rpm pendant 30 secondes. Après rejet du filtrat issu de ce 2^{ème} lavage, la micro-colonne a été remplacée par un nouveau miro-tube eppendorf de 1,5 mL, puis 100 µL de tampon d'élution AE (pH basique et de faible concentration ionique) ont été ajoutés au contenu du tube ayant fixé l'ADN. Le mélange a été incubé à température ambiante (25°C) pendant 1 minute et une centrifugation à 10000 rpm pendant 2 minutes a permis d'éluer l'ADN qui a été récupéré dans le tube eppendorf de 1,5 mL. Il a été conservé à -20°C jusqu'à la réalisation des amplifications. La réalisation de la PCR en temps réel a nécessité un mélange réactionnel de 25 µL. Il a été obtenu en déposant dans chaque puits de la plaque PCR ABI® 7500 Fast, un mélange de 1,5 µL d'un mix prêt à l'emploi Master Mix PCP PP, 1 µL de la taq ADN polymérase (25 X RT-PCR), 12,5 µL de tampon (2XRT-PCR) et 10 µL de l'extrait d'ADN fongique. Pour valider la réaction, 10 µL du contrôle négatif (eau biomol), 10 µL du contrôle positif PC (ADN purifié de *P. jirovecii*) ont été ajoutés chacun dans des puits marqués par des initiales (CN = contrôle négatif ; CP= Contrôle positif). La plaque a été recouverte avec du film adhésif ABI, homogénéisé brièvement et mise dans le thermocycler ABI® 7500 Fast. Ainsi, le programme d'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 15 minutes à une température de 94°C. Cette étape a été suivie de 40 cycles d'amplification composée d'une phase de dénaturation pendant 3 minutes à 94°C, ensuite une phase d'hybridation à 42°C pendant 8 secondes et une étape d'élongation finale de 34 secondes à 60°C.

La programmation des fluorochromes pour la détection de *P. jirovecii* correspond à FAM et à la coloration verte.

2.7.3- Extraction et amplification de l'ARN et l'ADN viral

Le principe de l'extraction est basé sur l'utilisation d'un tampon de lyse contenant un détergent qui sert à décomposer les membranes cellulaires et une protéase pour la digestion des composants cellulaires protéiques. Ces analyses virologiques ont été précédées par l'extraction des ARN et ADN en utilisant QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN), Hilden et Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostic1, Mannheim, Germany) sur MagNA Pure Compact instrument (Roche Diagnostic1).

Pour extraire l'acide nucléique viral, 140 µL d'échantillon de LBA ont été introduites dans un tube contenant 560 µL de tampon de lyse AVL du kit d'extraction Qiagen viral DNA mini, puis le mélange a été homogénéisé au vortex pendant 15 secondes. Ce mélange a été incubé à la température ambiante (15- 25°C) pendant 10 minutes, puis 560 µL d'éthanol (95-100%) ont été ajoutés au mélange dans le tube et homogénéisé au vortex pendant 15 secondes et centrifugé brièvement. Un volume de 630 µL du mélange a été introduit dans les colonnes *spin mini* posé dans un tube collecteur de 2 mL et centrifugé à 8000 trs/ min pendant 1 minute. Les colonnes ont été lavées avec 500 µL du tampon de lavage « wash buffer 1 (AW1) » et centrifugés à 8000 rpm pendant 30 secondes. Un deuxième lavage a été réalisé dans les mêmes conditions à l'aide de 500 µL du tampon de lavage 2 « wash buffer 2 (AW2), puis les tubes ont été centrifugés de nouveau à 14000 trs/ min pendant 3 minutes. Les colonnes ont été placées dans de nouveaux tubes Eppendorf de 1,5 mL étiquetées et 60 µL du tampon d'élution AVE ont été ajoutés à chaque tube contenant l'acide nucléique. Le tube contenant la colonne a été centrifugé à 8000 trs/ min pendant 1 minute. Le filtrat récupéré contenant l'acide nucléique a été conservé à -20°C pour une utilisation future. Une réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycler ABI[®] 7500 FAST utilisant le kit Super script[®] III platinum[®] One-step qRT-PCR system (Van Allen Way Carlsbad CA 92008, USA) pour une détection simultanée des virus respiratoires (**tableau VIX**). Les volumes des mélanges réactionnels ont été obtenus selon qu'il s'agit d'un virus à ARN ou à ADN (**tableaux X et XI**).

Tableau IX: Virus respiratoires détectés par le kit Invitrogen Superscript® III

Virus	Type/ Sous type viral
Influenza A	H1
Influenza B	H3
Virus respiratoire syncytial (VRS)	A et B
Coronavirus	NL63
	HKUI
	229 E
	OC43
Para- influenza virus	Para- influenza virus 1
	Para- influenza virus 2
	Para- influenza virus 3
	Para- influenza virus 4
hMPV	
Adénovirus	
Bocavirus	

Tableau X: Préparation du mélange réactionnel pour les virus à ARN

Réactifs	Concentration initiale	Quantité (n = 1)	Concentration Finale
Eau RNase free	/	3,9 µL	/
Réaction mix 2X*	2 X	12,5 µL	1 X
MgSO4	50 mM	1µL	2 mM
Amorce F1	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Amorce R1	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Sonde P1	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Amorce F2	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Amorce R2	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Sonde P2	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Amorce F3	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Amorce R3	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
Sonde P3	10 µM	0,5 µL	0.2 µM
RT/Taq Platinum	/	0,6 µL	/
Total	/	22,5 µL	/

* Contient déjà 0,4 mM de chaque dNTP

Tableau XI: Préparation du mélange réactionnel pour les virus à ADN

Réactifs	Concentration initiale	Quantité (N=1)	Concentration finale
Eau RNase free	/	7 µL	/
Amorce F1	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
Amorce R1	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
Sonde P1	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
Amorce F2	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
Amorce R2	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
Sonde P2	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
TaqMan 2X PCR Master Mix	2 X	12,5 µL	1 X
Total	/	22,5 µL	/

Dans tube, un volume de 22,5 μL d'un mélange réactionnel constitué des réactifs listés dans les tableaux IX et X et 2,5 μL d'acide nucléique (ADN, ARN) sont ajoutés afin d'obtenir un volume réactionnel de 25 μL . Ces tubes ont été déposés dans le tiroir de la plaque du thermocycler ABI® 7500.

L'amplification des virus à ARN a consisté en une étape de transcription inverse de l'ARN en ADN pendant 30 minutes à une température de 50°C en un cycle.

Ensuite, la phase de dénaturation de l'ADN et d'activation de la Taq polymérase s'est faite en un cycle sous une température de 95°C pendant 2 minutes. Elle a été suivie de la phase d'amplification composée de 45 cycles. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C suivie d'une étape d'hybridation-élongation de 30 secondes à 55°C. L'acquisition du signal de fluorescence a été faite à chaque cycle pendant l'élongation et en fonction de la sonde. Pour les virus à ADN, l'amplification a consisté en une étape de pré-activation de l'enzyme pendant 2 minutes à une température de 50°C. Ensuite, suivie d'une étape de dénaturation et d'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 10 minutes en un cycle. Une phase d'amplification composée de 45 cycles comprenant une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C suivie d'une étape d'hybridation-élongation de 1 minute à 60°C a été effectuée pendant, une de 60°C pendant 1 minute.

RESULTATS

1- Caractéristiques de la population

1.1- Fréquence des infections respiratoires aiguës sévères

Cette étude a permis de travailler sur 90 patients souffrant de pneumopathie. Tenant compte des critères d'inclusion et de non inclusion, 57 patients ont été exclus de l'étude dont 40 cas étaient tuberculeux, 10 cas sont décédés et 7 cas ont refusé de participer à l'étude. Ce sont les LBA de ces 33 patients restant que notre étude s'est effectuée. Les renseignements sur les patients ont été inscrits dans le **tableau XII**.

1.2- Répartition des patients selon l'âge

L'âge moyen était de 36,6 ans avec un écart-type de 12,69, l'âge médian était de 41 ans avec des extrêmes de 19 ans et 68 ans. La répartition par tranche d'âge des patients adultes atteint de pneumonie est représentée comme suit : 27,3% de nos patients avaient un age compris entre 19-29 ans, 48,5% étaient âgés entre 30-39 ans 6,1% étaient compris entre 40-49 ans et 18,1% avaient plus de 50 ans

1.3- Répartition des patients selon le genre

Dans notre étude, on note une prédominance masculine avec un sexe ratio H/F de 1,1. Sur les 33 patients, on avait 17 (52%) hommes et 16 (48%) femmes **figure 9**.

1.4- Caractéristiques socio-économiques des patients

Les catégories socio-professionnelles les plus touchées ont été celles des commerçants et des petits ouvriers avec un taux similaire de 30,3% (10/33) ; suivi de 27,3% (9/33) des sans-emploi ; ensuite 9,1% (3/33) des fonctionnaires et enfin 3% patients de la classe des ménagères (1/33).

La répartition des patients selon leur profession et ou l'activité est résumée dans le **tableau XIII**.

1.5- Saisons de survenue

Les incidences des pneumonies ont été regroupées suivant les saisons climatiques. 33,4% des cas de pneumonie sont apparus entre les mois d'avril à juillet, suivi de 30,3% des cas de décembre à mars, ensuite 24,2% d'octobre à novembre et enfin 12,1% d'août à septembre. Un pic a été observé dans la saison d'avril à juillet (**Figure 10**).

Tableau XII: Informations sur les patients

		Nombres= 33	Pourcentage (%)
Sexe	Masculin	17	51,5
	Féminin	16	48,5
Tranche d'âge	19- 29	9	27,3
	30- 39	16	48,5
	40- 50	2	6,1
	> 50	6	18,1
	Non	31	93,9
Serologie VIH	Positif	23	69,7
	Négatif	10	30,3

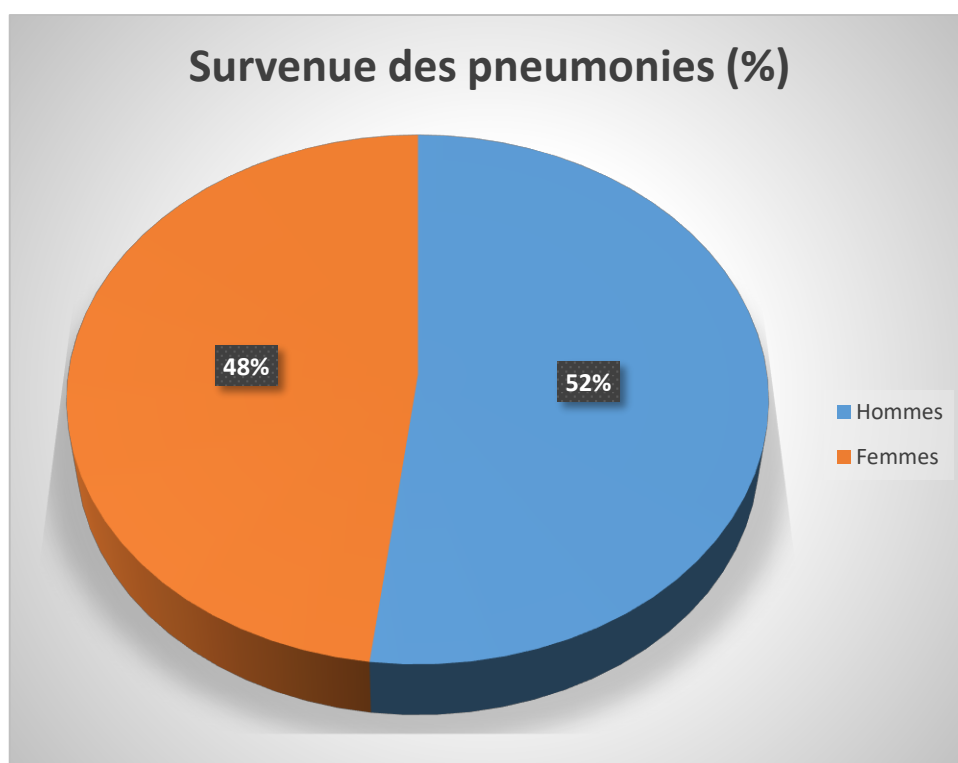


Figure 9: Répartition des cas des pneumopathies selon le sexe

Tableau XIII: Répartition des patients selon la profession

Profession	Effectifs n=33	Pourcentage (%)
Fonctionnaires	3	9,1
Commerçants	10	30,3
Ménagères	1	3,0
Ouvrier	10	30,3
Sans emploi	9	27,3
Total	33	100

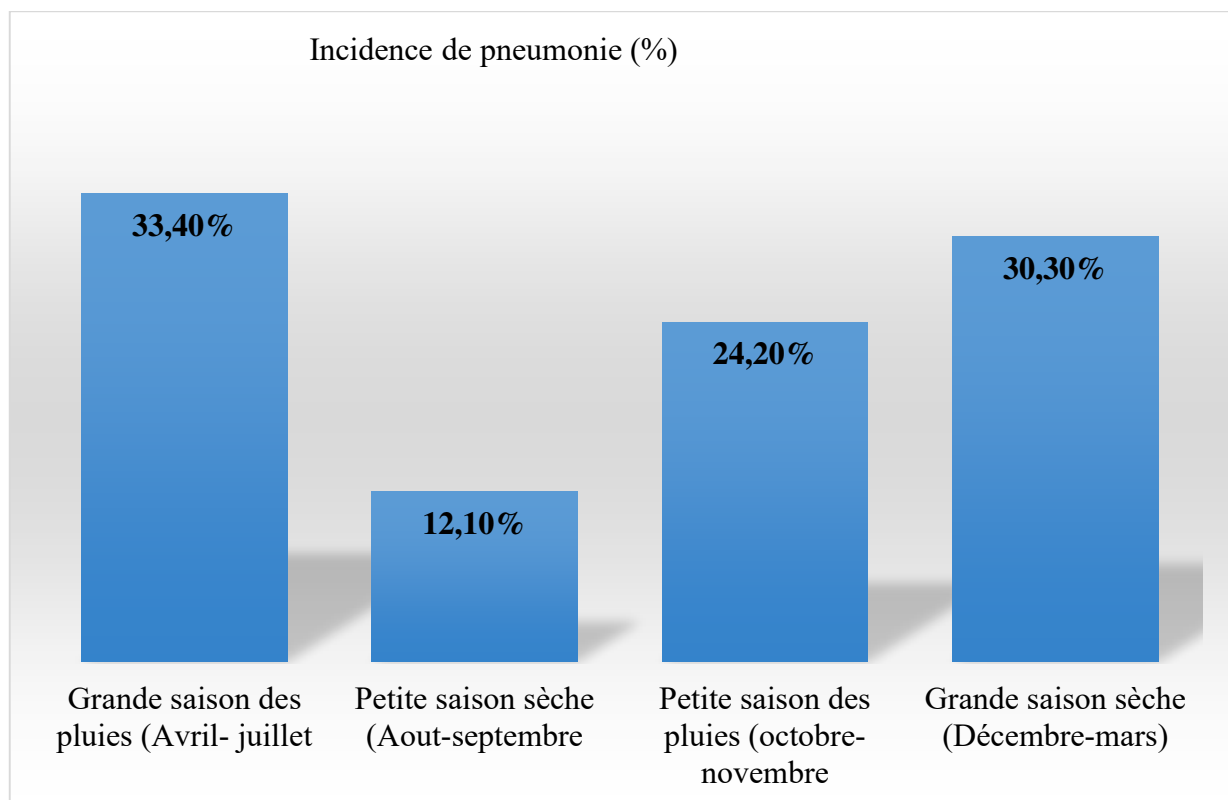


Figure 10: Incidence de survenue des cas de pneumonie selon les saisons climatiques

2- Sérologie VIH

Dans cette série sur les 33 patients atteints de pneumonie 23 (69,7%) étaient infectés par le VIH et 10 (30,3%) avaient une sérologie VIH négative.

2.1- Age et statut VIH

L'âge moyen des patients VIH positif a été de 41,8 ans et celui des patients VIH négatifs de 34,7 ans. Sur les 23 patients infectés du VIH, 17,4% cas ont été des jeunes adultes de 18-30 ans, 21,7% ont été des adultes de 30-40 ans, ceux de la tranche d'âge de 40-50 ans ont été majoritairement atteints avec 39,1% et enfin 21,7% sont âgés de plus de 50 ans.

Sur les 10 patients non infectés du VIH, 40% des patients ont été des jeunes adultes de 18-30 ans, 30% ont été des adultes de 30-40 ans, ceux dans la tranche d'âge de 40-50 ans ont été de 20% et enfin 10% ont été des patients âgés de plus de 50 ans.

La tranche d'âge de 30-40 ans a été fortement infectée par le VIH chez les femmes avec un taux de 33,33% et la tranche d'âge de 40-50 ans chez les hommes a été celle la plus touchée par le VIH avec un taux de 63,63% (**figure 11**).

2.2- Sexe et statut VIH

Parmi les 23 patients infectés du VIH, 47,8% étaient de sexe masculin contre 52,2% de sexe féminin. Le sex ratio H/F a été de 0,9. Dans le groupe de ceux non infectés par le VIH, 60% étaient de sexe masculin et 40% de sexe féminin. Le sex-ratio H/F étaient égale à 1,5. La différence de sex-ratio constatée dans les deux groupes n'a pas été statistiquement significative car $p=0,7939$ (**tableau XIV**).

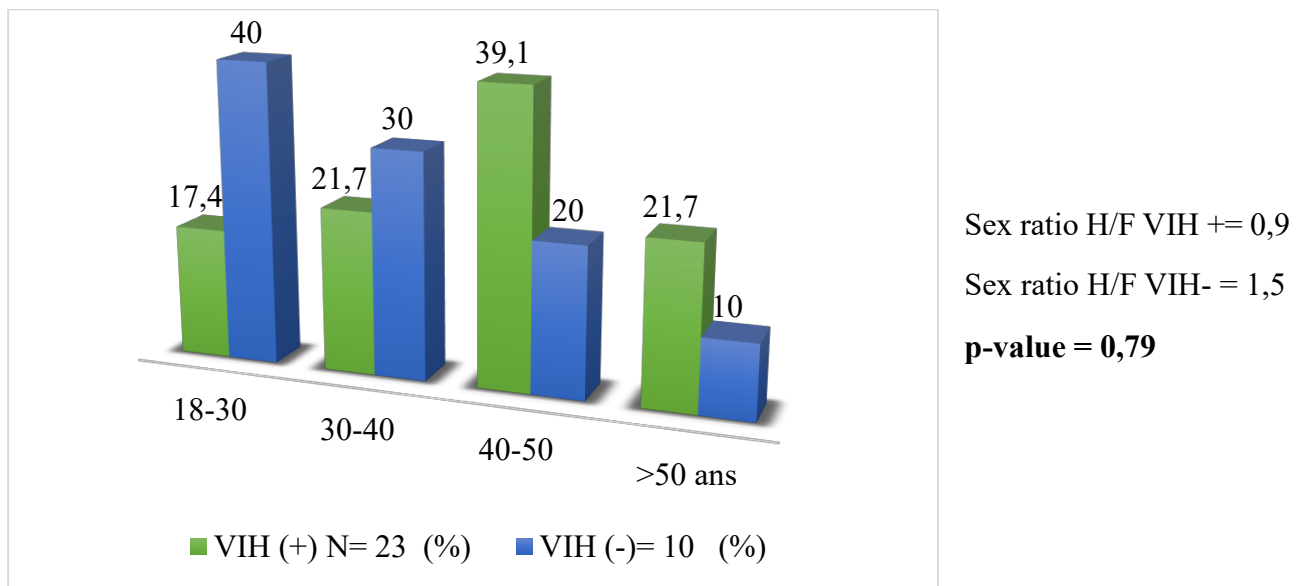


Figure 11: Classification des patients selon les tranches d'âge et le statut sérologique

Tableau XIV: Répartition des patients en fonction du statut sérologique VIH et du genre

Sexe	Statut VIH		Total
	VIH positif	VIH négatif	
Masculin	11	6	17
Féminin	12	4	16
Total	23	10	33

P-value= 0,79

3- Identification des bactéries dans le LBA

3.1- Identification phénotypique des bactéries par la méthode de culture

L'examen cytot bactériologique des liquides de lavage broncho-alvéolaire avait été effectué chez 33 patients, 4 (12,1%) avaient isolées de germes et reste 29 étaient négatifs à la culture avec 87,9%. Le germe le plus fréquemment retrouvé était *Klebsiella pneumoniae* avec 75%, (3/4). Ces bactéries identifiées étaient : *K. pneumoniae* et *S. pneumoniae* (25%, 1/33). Parmi les 3 souches de *K. pneumoniae* isolées, 66,67% proviennent de femmes (2) et 33,33% d'homme (1). Le sexe ratio H/F était de 0,5. Ce critère physiologique du sexe ne semble pas influencer les infections car le test n'est pas statistiquement significatif avec une P-value de 0,25 supérieur au seuil de significativité α 0,05 (**Tableau XV**). Les patients dont la culture du LBA a été négative, ont des valeurs maximums d'âge de 68 ans, une médiane de 43 ans et une valeur minimum de 18 ans. Tandis que ceux dont la culture est positive ont une valeur maximum de 59 ans, une médiane de 29 ans et une valeur minimum de 24 ans. La boîte à moustache a permis de comparer les deux (2) variables que sont l'âge et la culture (**figure 12**).

3.2- Identification de *Klebsiella pneumoniae*

La souche à identifier s'est présentée sous formes de grosses colonies muqueuses, bombées, lactose positif, ayant un aspect d'œil de poisson (**Annexe 5**). Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, ont montré que les souches se sont présentées sous forme de bacilles ou diplobacilles colorées en rose, immobiles et courts. Ainsi, une galerie biochimique réduite de Le Minor a été ensemencé avec une colonie. 24 h après l'incubation, des colonies ont apparu sur le milieu citrate de Simmons avec une alcalinisation du milieu induisant le virage du bleu de bromothymol du vert au bleu. Concernant l'hydrolyse de l'urée, la souche a été urée positive car il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de couleur de l'orange vers le rouge-rose. La souche a été indole négatif, car il n'a pas été matérialisé un anneau rouge après addition du réactif de Kovacs dans le réactif d'urée après 24H d'incubation de la souche. *K. pneumoniae* a donné LDA négatif car il n'y a eu aucun changement de la couleur violette sur la pente et LDC négatif car il y'a eu virage de l'indicateur coloré de la couleur violette au jaune. *K. pneumoniae* a été glucose positif car il y'a eu une acidification se traduisant par le virage de l'indicateur coloré le rouge de phénol à sa teinte acide jaune et lactose positif. *K. pneumoniae* n'a pas produit ni de gaz ni d'hydrogène sulfureux (H₂S) (**Annexe 6**).

Tableau XV: Comparaison des résultats de la culture et du sexe des patients de l'étude

Culture			
Sexe des patients N=33	Négative	Positive	Total
Féminin	13 (39,4%)	3 (9,1 %)	16 (48,5%)
Masculin	16 (48,5%)	1 (3 %)	17 (51,5%)
Total	29 (87,9%)	4 (12,1%)	33 (100%)

p- value = 0,258 et Chi 2 = 1,281

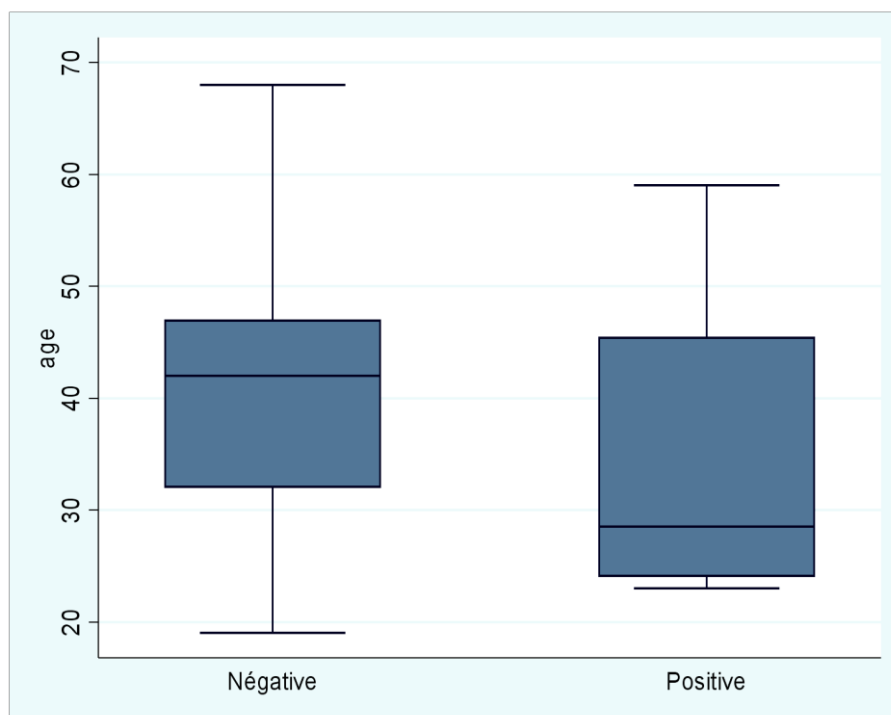


Figure 12: Répartition des résultats de la culture en fonction de l'âge

3.3- Distribution des souches de *Klebsiella pneumoniae* selon le sexe et l'âge

Les sujets de sexe féminin étaient plus touchés avec un taux de 66,7% par les infections à *K. pneumoniae* que ceux du sexe masculin 33,3%. Le sexe ratio est en faveur du sexe féminin soit 0,5.

3.4- Identification de *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae donne sur gélose au sang de petites colonies à dépression centrale, transparentes, rondes et développant une hémolyse de type alpha. Son observation au microscope optique après coloration de Gram, a montré des diplocoques Gram positif à forme lancéolée, en flamme de bougie, encapsulés, groupés par paire (diplocoque), parfois en courtes chaînettes (**Annexe 7**).

3.5- Profil de sensibilité des bactéries isolées aux antibiotiques

3.5.1- Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

Toutes les souches de *K. pneumoniae* ont été testées vis-à-vis des 14 molécules d'antibiotiques appartenant à des familles différentes dont les β -lactamines, les aminosides, les quinolones, les phénicoles et les autres antibiotiques **Tableau XVI**.

A partir des résultats obtenus, 66,7% les souches ont été résistantes à l'association d'amoxicilline/acide-clavulanique, au céfépime, au céfotaxime, à l'aztréonam et une faible résistance à céfoxitine (33,3%). L'analyse phénotypique des 3 souches de *K. pneumoniae* isolées a montré deux phénotypes de résistance aux β -lactamines (BLSE) et un phénotype sauvage (pénicillinase de bas niveau) dans notre étude. La production phénotypique de β -lactamases chez *K. pneumoniae* a été mise en évidence par la synergie (bouchon de champagne) entre les disques d'amoxicilline/acide-clavulanique, d'aztréonam (ATM), de céftriaxone (CRO), de céfépime (FEP) et de céfotaxime (CTX) (**Annexe 8**).

3.5.1.1- β -lactamines

66,7% des souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC), de même que 66,7% résistent à la pipéracilline et aux céphalosporines respectivement céftriaxone, céfépime, céfotaxime, céfuroxime, céfixime. Les niveaux de résistance les plus faibles ont été observés contre la mécilinam, la cefoxitine et l'imipénème (33,3%).

L'imipénème et la cefoxitine présentent une bonne activité sur les souches de *K. pneumoniae*. (**Tableau XVII**).

Tableau XVI: Niveau de résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Familles	Sigles de l'antibiotique	Nom de l'antibiotique	Sensible n (%)	Résistante (%)	Total N=3
β- lactamines	TIC	Ticarcilline	-	100	3
	PIP	Pipéracilline	1 (33,3)	66,7	3
	AMP	Ampicilline	-	100	3
	AMC	Amoxicilline/acide clavulanique	1 (33,3)	66,7	3
	MEC	Mécillinam	2 (66,7)	33,3	3
	TCC	Ticarcilline/acide clavulanique	1 (33,3)	66,7	3
	CFM	Céfixime	1 (33,3)	66,7	3
	FOX	Céfoxitine	2 (66,7)	33,3	3
	CRO	Céftriaxone	1 (33,3)	66,7	3
	CTX	Céfotaxime	1 (33,3)	66,7	3
	FEP	Céfépime	1 (33,3)	66,7	3
	CXM	Céfuroxime	1 (33,3)	66,7	3
	IPM	Imipénème	2 (66,7)	33,3	3
	ATM	Aztréonam	1 (33,3)	66,7	3
	Quinolones	NOR	Norfloxacin	1 (33,3)	66,7
NAL		Acide nalidixique	1 (33,3)	66,7	3
LVX		Lévofloxacin	1 (33,3)	66,7	3
Aminosides	TMN	Tobramycine	1 (33,3)	66,7	3
	GMN	Gentamicyne	1 (33,3)	66,7	3
	CHL	Choramphénicol	1 (33,3)	66,7	3
Autres antibiotiques	SXT	Triméthoprimé/ sulfaméthoxazole	-	100	3

Tableau XVII: Profil de sensibilité des souches de *K. pneumoniae* et *S. pneumoniae*

Familles	Sigles de l'antibiotique	<i>K. pneumoniae</i> 397C/17	<i>K. pneumoniae</i> 1522C/17	<i>K. pneumoniae</i> 2190C/16	<i>S. pneumoniae</i> 298C/17
β- lactamines	TIC	R	R	R	
	PIP	R		R	
	AMP	R	R	R	
	AMC	R	S	R	
	PEN	/	/	/	S
	MEC	R	S	S	
	TCC	R	R		
	CFM	R	R	/	
	FOX	S	S	R	
	CRO	R	R	S	S
	CTX	R	R	S	S
	FEP	R	R	S	S
CXM	R		R		
Quinolones	CZD		R		
	MEM		S		
	IPM	S	S		
	ATM	R	R		
	NOR	R	R		R
	CIP		R	S	R
Aminosides	NAL	R	R	S	R
	PEF	R			
	OFX		R		
	MXF			S	
	LVX	R	R		R
	TMN	R	R		
	GEN				S
Autres antibiotiques	GMN	R	R		
	NET		S		
	AKN		S	S	
	CHL	R	S		S
	NFE		S		
	FTN	S			
	FOS		S		
SXT	R	R	R	R	
Macrolides	ERY				R
Clindamycines	CMN				R
Synergistine	PTN				S
Glycopeptides	VAN				S

3.5.1.2- Résistance des souches aux aminosides

Concernant les aminosides, on assiste à une résistance assez marquée pour la gentamicine et la tobramicine de 66,7%. L'amikacine manifeste un faible taux de résistance de 33,3%.

3.5.1.3- Résistance des souches aux fluoroquinolones

Un taux de résistance important est noté pour l'acide nalidixique, l'aztréonam, la norfloxacin, et la lévofloxacin qui est de 66,7%, Cependant une faible résistance a été observée pour l'imipénème qui est de 33,3%.

3.5.1.4- Les autres antibiotiques

Pour les sulfamides et triméthoprime, 33,3% résistent au chloramphénicol et 100% des souches résistent à l'association triméthoprime + sulfaméthazole. A partir de l'antibiogramme de *K. pneumoniae*, un grand nombre de ces souches ont présenté un fort taux de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les β -lactamines, les aminosides et les quinolones. Par ailleurs l'imipénème et le cefoxitine restent les molécules les plus actives.

3.5.2- Résistance de la souche de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques

Le taux de résistance des pneumocoques aux macrolides a été de 66,7% (2/3) pour l'érythromycine (33,3%) et la clindamycine (33,4%). Il s'agit de souche de résistance de type MLSB qui touche l'ensemble des Macrolides, Lincosamides et Streptogramine B. La souche a été sensible non seulement à la pristamycine (33,3%) mais aussi à la pénicilline.

4- Détection des agents pathogènes respiratoires par PCR multiplex

4.1- Détection et identification des bactéries par PCR multiplex en temps réel

Sur les 33 échantillons de LBA analysés, la PCR a permis de détecter 21 cas positifs soit 63,6% contre 12 (36,4%) cas négatifs et a révélé la présence de quatre principales bactéries : *H. influenzae* (27,3%, 9/33), *S. pneumoniae* (9,1%, 3/33), *L. pneumophila* (3%, 1/33) et *M. catarrhalis* (3%, 1/33). Des co-infections bactériennes ont également été mises en évidence dans ces échantillons de LBA. Il s'est agi de *H. influenzae* associé à *S. pneumoniae* (9,1%, 3/33), suivi de *H. influenzae* associé à *M. catarrhalis* (6,1%, 2/33) et enfin de *S. pneumoniae* associée soit à *S aureus*, soit à *M. catarrhalis* respectivement (4,8%, 1/33) (**Tableau XVIII**).

Tableau XVIII: Résultat des bactéries détectées par la méthode de PCR multiplex en temps réel

Type d'infection	Noms des bactéries	Nombres (%) N= 21
Mono-infection bactérienne	<i>S. pneumoniae</i>	3 (14,3%)
	<i>H. influenzae</i>	9 (42,8%)
	<i>L. pneumophlia</i>	1 (4,8%)
	<i>M. catarrhalis</i>	1 (4,8%)
Co-infection bactérienne	<i>H. influenzae + S. pneumoniae</i>	3 (14,3%)
	<i>H. influenzae + M. catarrhalis</i>	2 (9,5%)
	<i>S. pneumoniae + S. aureus</i>	1 (4,8%)
	<i>S. pneumoniae + M. catarrhalis</i>	1 (4,8%)

De plus, les échantillons négatifs à la PCR temps réel ont un âge maximal de 69 ans, une médiane de 33 ans et un minimum de 21 ans. Tandis que les échantillons positifs à la PCR ont une valeur maximum de 62 ans, une médiane de 42 ans et une valeur minimale de 18 ans. La **figure 13** a permis de faire une analyse descriptive.

4.2- Comparaison de la culture et de la PCR

La tentative a été de comparer le rendement de détection des bactéries dans les 33 échantillons testés de la PCR et de la méthode de culture considérée à ce jour comme la méthode de référence. La technique de PCR a détecté plus de bactéries que la méthode de culture.

La méthode de culture a été capable de détecter uniquement 2 genres de bactéries dans 33 échantillons de LBA mis en culture, tandis que la PCR a mis en évidence plusieurs pathogènes dans 21 échantillons de LBA des patients atteints de pneumonie.

La sensibilité de la méthode PCR calculée a été de 15% (3/20), la spécificité a été de 92,3% (12/13), une valeur prédictive positive VPP de 75% (3/4) et une valeur prédictive négative de 41,4% (12/29). 3 (9,1%) échantillons des 33 ont été de vrais positifs à la culture et à la PCR contre 12 (36,4%) vrais négatifs à la culture et à la PCR **tableau XIX**.

Les germes retrouvés par ces deux méthodes de détection ont été consignés dans le **tableau XX**.

Un cas était positif pour la culture (*K. pneumoniae*) tandis que négatif pour la PCR. De même, deux cas ont donné des résultats différents pour la culture et la PCR. La culture a détecté *K. pneumoniae* et la PCR *S. pneumoniae*. Le croisement entre les résultats de la PCR en temps réel et ceux de la culture donne un p- value= 0,53. Il n'existe pas une corrélation statistiquement significative entre les résultats de la PCR et ceux de la culture car la valeur calculée est supérieure au seuil de significativité 0,05.

4.3- Détection et identification de *Pneumocystis jirovecii* par PCR en temps réel

4.3.1- Age et détection de *Pneumocystis jirovecii*

La PCR en temps réel réalisée sur 33 échantillons respiratoires a révélé la présence de 39,4% de cas *P. jirovecii* (13/33). *P. jirovecii* a été détecté majoritairement chez les patients ayant un âge supérieur à 40 ans avec un taux de 21,2%, suivi de ceux de 20- 30 ans, puis les patients de 30- 40 ans et enfin ceux ayant un âge inférieur à 20 ans. L'âge moyen des patients chez qui *P. jirovecii* a été détecté est de 41 ans (25- 62 ans) pour les patients VIH et de 21 ans (19-23 ans) pour les non VIH. La détection de *P. jirovecii* n'est pas liée à l'âge (p- value= 0,5894 > p= 0,05) (**tableau XXI**).

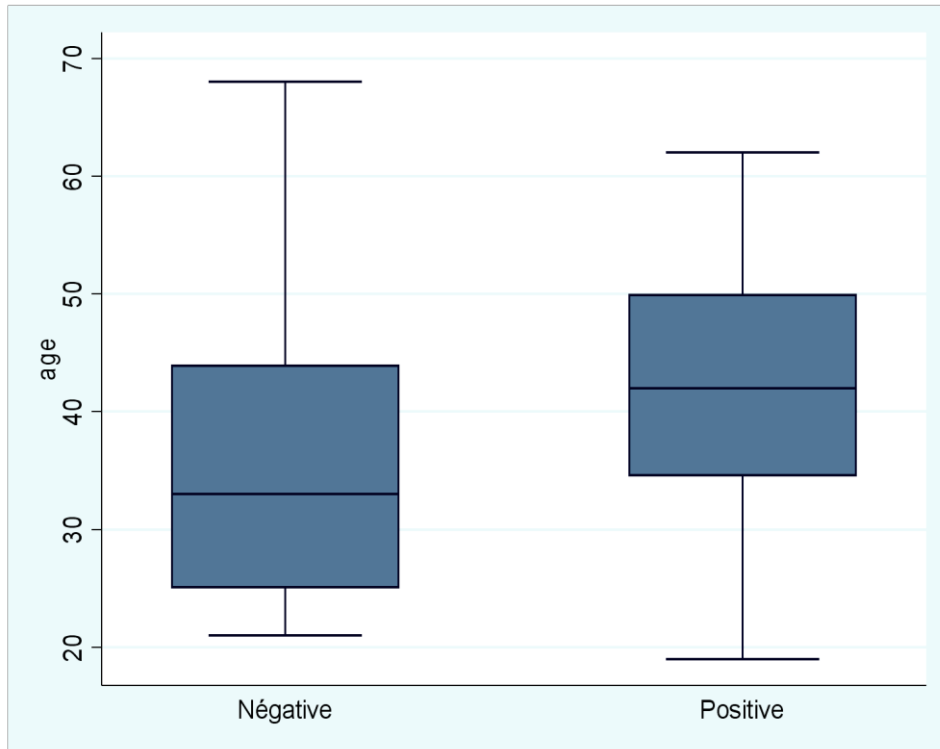


Figure 13: Comparaison des résultats de la PCR bactériologique en fonction de l'âge

Tableau XIX: Comparaison des résultats de la culture et de la PCR multiplex

PCR	Culture		Nombre total
	Positive	Négative	
Positive	3 (75%)	17 (58,6%)	20 (60,6%)
Négative	1 (25%)	12 (41,4%)	13 (39,4%)
Nombre total	4	29	33

Chi2 = 0,39

p- value = 0,53

Tableau XX: Résultat des méthodes PCR temps réel et de culture

Nom des bactéries	PCR positive n (%)	Culture positive n (%)
<i>K. pneumoniae</i>	0 (0)	3 (9,1%)
<i>S. pneumoniae</i>	9 (27,3%)	1 (3%)
<i>H. influenzae</i>	14 (42,4%)	0 (0%)
<i>M. catarrhalis</i>	4 (12,1%)	0 (0%)
<i>S. aureus</i>	1 (3%)	0 (0%)
<i>Legionella sp</i>	1 (3%)	0 (0%)

Tableau XXI: Répartition de *Pneumocystis jirovecii* en fonction des tranches d'âge des patients

Champignon	Age				Total
	< 20	20- 30	30-40	>40	
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1	3	2	7	13
Absence	0	4	5	11	20
Total	1	7	7	18	33

p- value= 0,58

4.3.2- Détection de *Pneumocystis jirovecii* selon le sexe et le statut VIH

L'étude comptabilise 33 patients dont 17 hommes et 16 femmes correspondant à un sex-ratio H/ F de 1,1. Sur les 16 femmes, 12 (75%) ont été positifs au VIH et 4 (25%) ont été négatifs au VIH. De même, 11 (64,7%) des 17 cas des hommes ont été positifs au VIH et 6 (35,3%) ont été négatifs. Ainsi, la classification des patients atteints de VIH et positif à *P. jirovecii* était de 11. Cette répartition en fonction du sexe s'effectue comme suit : 4 hommes et 7 femmes soit un sex-ratio H/ F de 0,6. L'âge moyen était de 41 ans avec les extrêmes d'âge allaient de 25 à 62 ans. Le test n'était pas statistiquement significatif car la P-value= 0,59 était supérieur à 0.05. La recherche du champignon *Pneumocystis jirovecii* par la PCR a permis de détecter sur les 33 LBA, 13 cas positifs soit un taux de 39,4%. Le statut VIH a été déterminé chez les 33 patients. En effet, sur ces 13 cas positifs à *P. jirovecii*, 11 cas ont été testés positifs au VIH avec un taux de 84,6% et 2 (25,4%) étaient négatifs au VIH (**Tableau XXII**).

4.3.3- Détection de *Pneumocystis jirovecii* en fonction des saisons climatiques

Durant les saisons d'avril à juillet, le taux de positivité de *P. jirovecii* était de 30,8% soit 4 patients sur 13 ; celle d'août à septembre était de 15,4% soit 2/13 ; de même la saison d'octobre-novembre a été de 30,8% soit 4/13 et enfin la saison de décembre- mars, le taux a été de 23,1% soit 3/13. *P. jirovecii* a été fortement détecté dans la période d'avril à juillet et d'octobre à novembre avec un taux identique de 30,8%. En effet, ces deux périodes représentent la grande et la petite saison des pluies en CI où nous sommes en période froide.

Tableau XXII: Répartition de *Pneumocystis jirovecii* en fonction du statut VIH des patients

Statut VIH	VIH (+)	VIH (-)	Total
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (+)	11	2	13
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (-)	12	8	20
Total	23	10	33

p-value =0.26

4.4- Virus respiratoires de la pneumonie

4.4.1- Répartition des virus respiratoires en fonction de l'âge et du sexe

Sur les 33 patients ayant une pneumonie, 16 (48,5%) ont été des femmes et 17 (51,5%) des hommes soit un ratio H/F de 1,1.

L'âge des patients variait de 19 à 68 ans avec une moyenne de 39,6 ans. L'incidence de la pneumonie selon l'âge des patients a été répartie comme suit : 9 patients avaient un âge compris entre 19-30 ans soit un taux de 27,3%, 16 patients de la tranche d'âge de 30-40 ans avaient été détectés soit 48,5%, Les patients de la tranche d'âge de 40-50 ans étaient de 2 soit un taux de 6,1% enfin ceux de la tranche d'âge de plus de 50 ans étaient de 6 soit un taux de 18,1%. Chez les patients ayant un âge compris entre 19-30 ans, un total de 3 virus dont 2 virus Parainfluenza -3 (VPI-3) soit 28,6% et 1 Coronavirus OC43 14,3% ont été détectés. De même, chez les patients ayant un âge compris entre 30-40 ans, 2 virus ont été détectés à savoir 1 virus Parainfluenza-3 VPI-3 à 14,3% et une co-infection du virus Parainfluenza-3 (VPI-3) associé avec Coronavirus HKU1. Chez ceux ayant 40-50 ans, 1 Rhinovirus humain a été retrouvé avec 14,3% et enfin il n'a été détecté aucun virus chez les adultes dont l'âge était supérieur à 50 ans (**figure 14**). Il n'y a pas de différence significative entre l'âge et la détection du virus car la probabilité calculée $p\text{-value} = 0,136$ est supérieure au seuil de significativité 0,05.

4.4.2- Répartition des virus respiratoires en fonction des saisons

Pendant la saison d'avril-juillet, Coronavirus OC43 a été détecté avec 16,7%. Dans la saison d'août- septembre, il n'ya eu aucune détection de virus (0%). Par ailleurs, dans la saison d'octobre-novembre, Rhinovirus humain a été détecté à 16,7% et enfin la saison de décembre-mars a permis de détecter un taux de 66,6% de virus Parainfluenza virus-3 (VPI-3) et de co-infection virale avec Parainfluenza virus-3 (VPI-3) associé avec Coronavirus HKU1 à 16,7% (**figure 15**).

4.4.3- Détection et identification des virus respiratoires par PCR multiplex en temps réel

La PCR multiplex a permis de détecter 7 virus (21,2%) et 26 cas négatifs (78,8%). Les virus mis en évidence ont été Coronavirus OC43 à 3%, le virus Parainfluenza-3 (VPI-3) à 9,1%, Rhinovirus humain à 3% et enfin une co-infection virus Parainfluenza -3 (VPI-3) associé avec Coronavirus HKU1 dans 3% des cas (**Tableau XXIII**).

4.5- Détection de l'étiologie de la pneumonie dans le LBA

La recherche de l'étiologie de la pneumonie a permis de détecter 27 échantillons positifs à la soit un taux de 81,8% Contre 6 échantillons négatifs pour tout microorganisme (18,2%).

Pour les 27 échantillons, le croisement des résultats a permis de révéler des coinfections bactéries-virus et bactéries- *P. jirovecii* à des taux respectifs de 12,1 % et 27,3 % (**Tableau XXIV**).

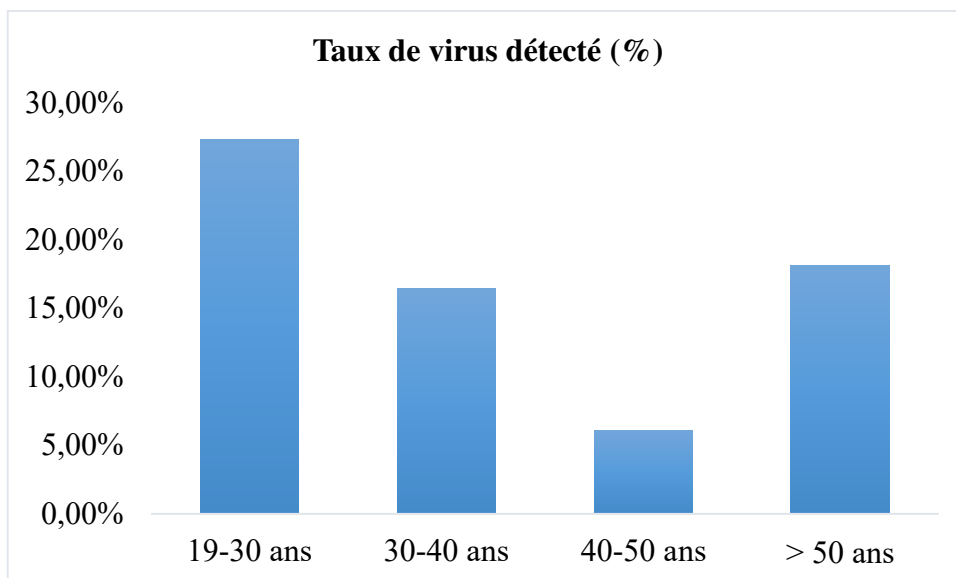


Figure 14 : Répartition des taux de détection des virus en fonction des tranches d'âge

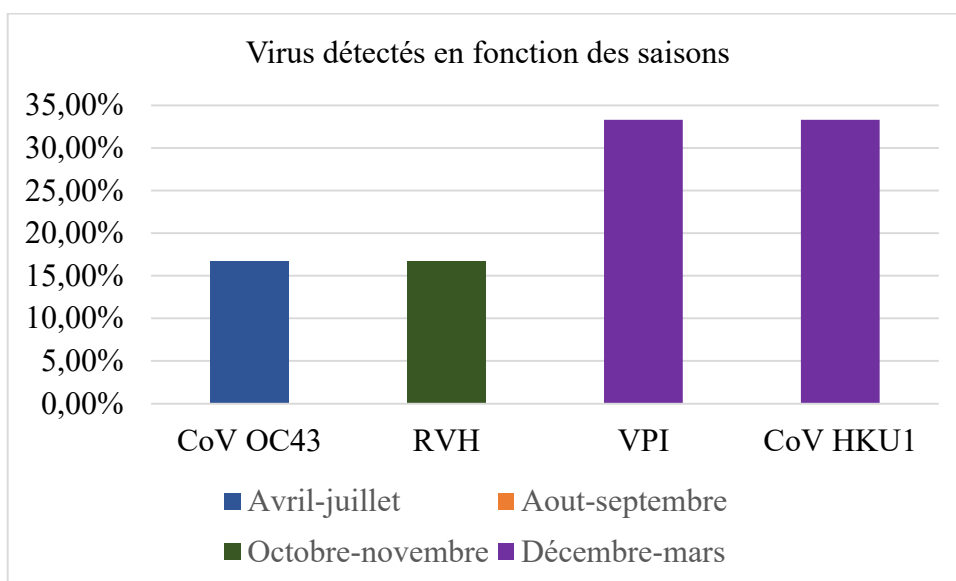


Figure 15: Répartition des virus détectés selon les saisons climatiques en Cote d'Ivoire

CoV OC43 : Coronavirus OC43

RVH : Rhinovirus Humain

VPI-3 : Virus Parainfluenzae-3

CoV HKU1 : Coronavirus HKU1

Tableau XXIII: Répartition des virus mis en évidence par la PCR

Virus	Effectifs N= 7	Pourcentage (%)
<i>Coronavirus OC43</i>	1	3,03
<i>Coronavirus HKUI</i>	1	3,03
<i>Virus Parainfluenza-3 (PV-3)</i>	4	12,12
<i>Rhinovirus humain</i>	1	3,03
Total	7	21,21

p- value = 0,136

Tableau XXIV: Flore du microbiote respiratoire de tous les patients inclus dans l'étude

Microorganismes	Effectifs
Bactéries	21
Virus	7
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	13
Coinfection bactérie- virus	4
Coinfection bactérie- <i>Pneumocystis jirovecii</i>	9
Coinfection virus- <i>Pneumocystis jirovecii</i>	1
Coinfection bactérie- virus- <i>Pneumocystis jirovecii</i>	1

Les infections étaient dues à des bactéries dans 52,5 %, à des virus dans 15% et au champignon *P. jirovecii* dans 32,5 % cas (**Figure 16**).

Ainsi, les bactéries, les virus et le champignon *Pneumocystis jirovecii* retrouvés étaient les suivants : *Streptococcus pneumoniae* (9,1%), *Haemophilus influenzae* (27,3%), *Legionella pneumophila* (3%), *Moraxella catarrhalis* (3%), co-infection *Haemophilus influenzae* + *Streptococcus pneumoniae* (9,1%), coinfection *Haemophilus influenzae* + *Moraxella catarrhalis* (6,1%), coinfection *Streptococcus pneumoniae* + *Staphylococcus aureus* (4,8%); Coronavirus OC43 (3,03%), Parainfluenza virus-3 PV-3 (12,12%), Rhinovirus humain (3,03%), Parainfluenza virus-3 (PV-3) + Coronavirus HKUI (3,03%) et *Pneumocystis jirovecii* (32,5%).

L'algorithme des étiologies des IRAS montre que la tuberculose est la première cause suivie de l'étiologie bactérienne puis de celle du champignon *Pneumocystis jirovecii* et enfin des virus en Côte d'Ivoire (**Figure 17**)

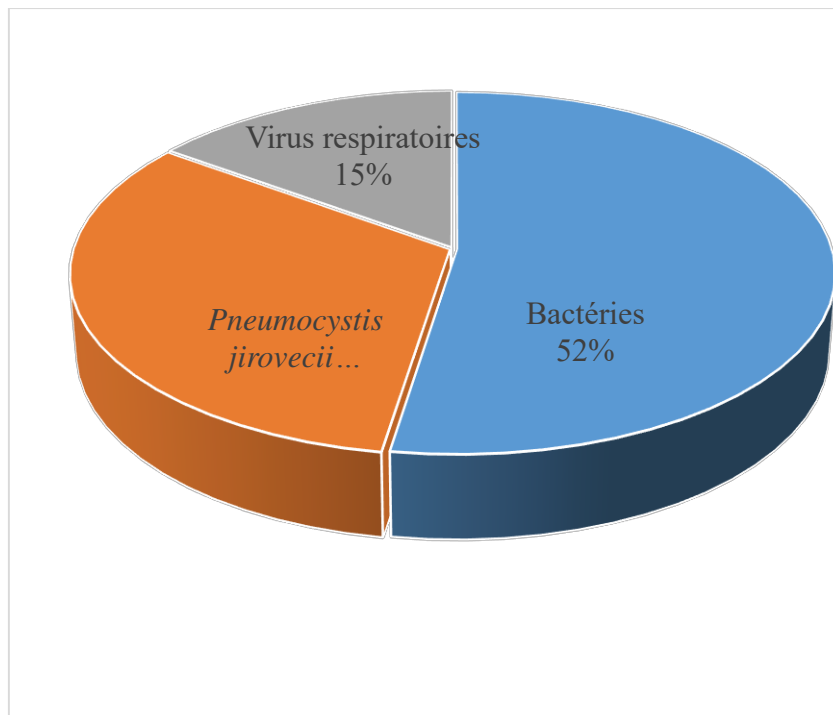


Figure 16: Proportion des microorganismes chez les patients de l'étude

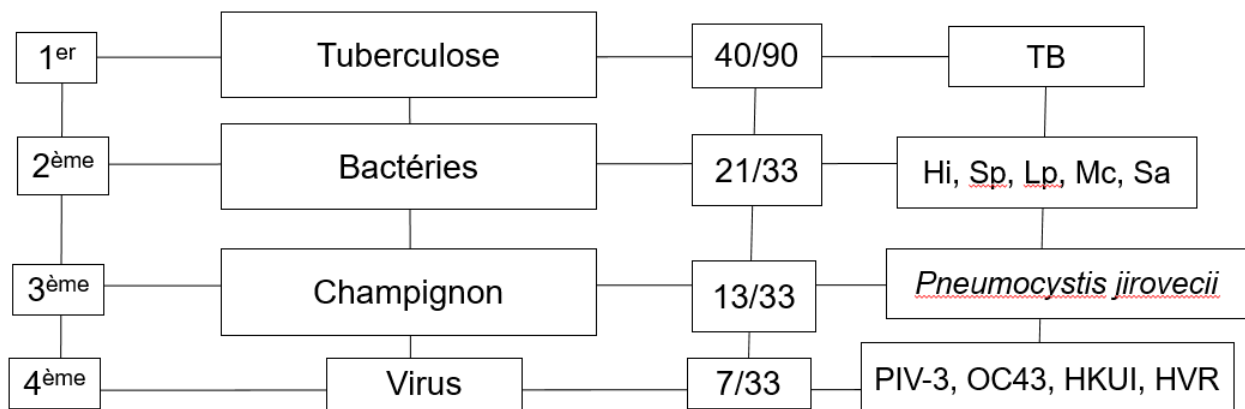


Figure 17: Algorithme du diagnostic microbiologique des IRAS selon l'étude

TB : Tuberculose

Hi : *Haemophilus influenzae*

Sp : *Streptococcus pneumoniae*

Lp : *Legionella pneumophila*

Mc : *Moraxella catarrhalis*

Sa : *Staphylococcus aureus*

PIV-3 : Virus Parainfluenzae-3

OC43 : Coronavirus OC43

HKU1 : Coronavirus HKU1

HVR : Virus respiratoire Humain

DISCUSSION

Les limites et les contraintes de notre étude se situent au niveau de l'un des cadres d'étude qui s'est déroulée au sein du service de pneumophtisiologie du CHU de Cocody. Les autres services de pneumologie du C.H.U de treichville ne possèdent pas de fibroscope pour l'obtention du liquide de lavage broncho-alvéolaire. Ce qui ne permet pas une généralisation des résultats à toute la population car ne viennent à l'hôpital que ceux qui ont une pathologie assez grave (pneumopathie sévère) d'où un faible taux d'échantillon. Egalement le kit d'amplification utilisé (FTD bacterial pneumonia-CAP) ne cible pas toutes les bactéries responsables d'infection respiratoire.

L'objectif de cette étude a été de déterminer la diversité des microorganismes responsables des IRAS chez les adultes en Côte d'Ivoire par des méthodes de microbiologie conventionnelles associées aux méthodes de microbiologie moléculaires.

Ainsi, selon la littérature, certains facteurs influenceraient la survenue des IRAS entre autres les facteurs liés à l'hôte tel que: l'âge, le sexe masculin, le tabagisme, un niveau socio-économique précaire, l'absence d'hygiène, l'état nutritionnel, état immunitaire, les facteurs environnementaux comme le climat, les saisons froides, de pluies ainsi que l'humidité et à l'infection.

Alors dans notre étude, certains de ces facteurs ont été explorés. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps fait le rapport entre l'âge des patients de l'étude et la survenue de la maladie. Ensuite, nous avons fait le rapprochement de l'influence du sexe sur la survenue de la pneumonie. Nous avons également étudié le statut socio-économique des patients inclus qui influencerait l'apparition de la maladie. Après, nous avons vu l'influence des facteurs environnementaux sur la survenue de la maladie, puis l'état immunitaire des patients à travers la serologie VIH a été étudié et enfin nous avons montré les infections dues aux différents pathogènes par les différentes méthodes conventionnelles et moléculaires qui seraient responsable des IRAS en Abidjan.

S'agissant de l'âge, la tranche d'âge la plus représentée dans notre étude était 30-39 ans soit 48,5% des cas. En effet, dans les pays en développement comme la Côte d'Ivoire, l'âge de prédilection de cette pathologie est compris entre 20 et 49 ans (**Horo et al., 2009**). Nos résultats concordent avec ceux de Horo et col menés en Côte d'Ivoire. La littérature s'accorde à dire que la pneumonie communautaire aiguë a une incidence plus élevée chez les plus de 65 ans. Les pneumopathies aiguës sont particulièrement fréquentes et graves chez le sujet âgé, par ailleurs souvent aggravées par d'autres maladies et aux défenses immunitaires amoindries (**Coulibaly, 2020**). Aussi, les personnes âgées de plus de 50 ans dans notre étude ont été atteintes avec un taux de 18,1%. L'âge est un facteur de risque et de gravité de la survenue d'une infection respiratoire basse (**Chidiac, 2011**).

Le vieillissement s'accompagne d'une réduction des réserves fonctionnelles, entraînant une diminution de la capacité d'adaptation à un événement aigu, avec un risque plus élevé de décompensation. On peut citer comme exemples : l'augmentation de la rigidité artérielle, la diminution de la relaxation diastolique, la diminution de la sensation de soif (**De Bataille, 2012**). Le vieillissement s'accompagne aussi de déficiences dans plusieurs mécanismes de défense anti-infectieuse, dont la diminution de la toux, de la clairance mucociliaire et de la réponse immunitaire cellulaire (**Belloughe, 2018**). Cette différence pourrait être due au fait que de manière générale, la Côte d'Ivoire connaît des changements démographiques rapides avec une population en majorité jeune dont 63,1% ont au plus 35 ans. Les personnes ayant un âge de 65 ans et plus ne représentent que 3,42% de la population ivoirienne. Et l'espérance de vie est estimée à 58,7 ans en Côte d'Ivoire (**Anonyme, 2019**). Les résultats sur l'âge moyen étaient de 39,63 ans de tous sexes confondus dans notre population d'étude. Ce résultat est comparable à celui de Kayantao et Collaborateur au Mali qui ont trouvé un âge moyen de 46 ans (**Savado, 2012**) et un peu similaire à celui d'Ezzouine et al menée au Maroc qui ont retrouvé 51,15 ans (**Ezzouine et al., 2014**).

Par ailleurs, le genre masculin semblait plus exposé avec un taux de 51,5% par rapport au genre féminin qui a été de 48,5%. Ce résultat est similaire à celui de l'étude d'**Attig, 2017** portant sur l'étude microbiologique des prélèvements respiratoires dans les unités de soins intensifs au CHU de Beni Messous. Sur les 67 patients hospitalisés dans son étude, 52% ont été de sexe masculin et 48% de sexe féminin (**Attig, 2017**). De même, une étude faite en 2010 dans 66 unités de réanimation du Sud de la France, affirme la prédominance du sexe masculin avec un taux de 63% par rapport au nombre totale des patients hospitalisés (**Constantin et al., 2010**). C'est aussi le cas d'une autre étude réalisée en 2016 au Maroc, dont le pourcentage des hommes atteints de pneumopathie était de 77% (**Zegmout et al., 2016**). En effet, cela pourrait s'expliquer par le fait que le sexe masculin est considéré par plusieurs études comme un facteur de risque de survenue de pneumopathie. Par conséquent les hommes sont plus souvent des fumeurs et cette intoxication au tabac souvent doublée à celle de l'alcool fait le lit des pneumopathies bactériennes (**Momine, 2018**).

En ce qui concerne l'influence du statut socio-économique sur la survenue des pneumopathies, notre étude a montré que les commerçants et les ouvriers étaient les plus représentés avec des taux similaires de 30,3%. En effet, plus d'un tiers de nos patients avaient un niveau socio-économique bas qui ne leur permet pas un revenu mensuel stable. Il est connu que l'infection est en général favorisée par plusieurs facteurs associés à la dénutrition (**Martinez et al., 2010**). Cette situation pourrait s'expliquer par les différents sites de travail fréquentés par les patients hospitalisés dans cette étude.

Ils pourraient être exposés aux métaux lourds, à la pollution de l'air qui sont clairement identifiés comme des facteurs favorisant la survenue des infections respiratoires comme la pneumopathie (**Momine, 2018**). Mais il faut aussi remarquer que juste après les commerçants et ouvriers, viennent une proportion de patients sans emploi de 27,3% qui posent le problème du chômage liés au manque d'emploi avec son corollaire de pauvreté et de pratique d'activités illicites (**Akindès, 2000**).

Concernant l'influence des facteurs environnementaux, un taux de 33,4% des patients hospitalisés a été répertorié dans la période d'avril à juillet. Le climat de la Côte d'Ivoire est de type équatorial à quatre saisons dont deux saisons de pluies qui alternent avec deux saisons sèches. La grande saison des pluies se déroule d'avril à juillet, la petite saison sèche d'août à septembre, la petite saison des pluies d'octobre à novembre et la grande saison sèche de décembre à mars (**Fadika et al., 2019**). La variation saisonnière décrite dans notre travail coïncide avec celle indiquée par d'autres auteurs dans différentes publications, où les mois d'hiver montrent davantage d'hospitalisations pour pneumonie (**López-Gobernado et al., 2017**). Ce taux élevé pourrait s'expliquer par le fait que cette saison offre toutes les conditions de prolifération des moustiques vecteurs du paludisme et autres viroses comme la dengue et la fièvre jaune. Mais aussi les maladies à transmission hydrique comme la fièvre typhoïde et les maladies liées au froid comme les pneumopathies virales ou bactériennes (**Tissot-Dupont, 2009**). De même, après la période d'avril-juillet, celle de décembre à mars a montré une incidence élevée de patients hospitalisés au C.H.U avec une proportion de 30,3%. Cette période correspond à la grande saison sèche. L'étude de Momine en 2018 menée en Côte d'Ivoire précisément à Zokougbeu sur 111 patients souffrant de pneumopathie, a montré une prévalence de la pneumopathie plus élevée en saison sèche (62,16%) qu'en saison pluvieuse (37,84%). La saison sèche se caractérise par la poussière et par la fréquence des feux de brousse qui augmente la pollution de l'air favorisant une incidence accrue des pneumopathies (**Youssef, 2014**). Pareillement, Ces résultats sont similaires à ceux de **Dembélé 2020** menés au Mali qui avait obtenu un grand effectif dans la saison pluvieuse (Avril-octobre), ceci pourra s'expliquer par l'humidité de l'environnement dans ces saisons. En effet, les infections respiratoires sont sensibles aux changements météorologiques (saison froide et saison des pluies dans les pays du Sud, influence directe du climat: température ambiante, teneur en eau de l'atmosphère, et influence indirecte: mode de vie, promiscuité) (**Dembélé, 2020**).

Quant à l'état immunitaire des patients sur la survenue des pneumonies, la séroprévalence au VIH des patients de notre étude était de 69,7%. Ce taux pourrait s'expliquer par le fait que les pneumopathies sont fréquentes au cours du VIH. À Abidjan, Côte d'Ivoire, le taux de prévalence est

de 20% chez les adultes fréquentant les centres de santé et de 50% dans certains services hospitaliers (**Desmorys, 2012**). En effet, depuis les années 1990, la pneumopathie aiguë récurrente est devenue une infection opportuniste du VIH. Parmi les affections opportunistes, les affections respiratoires sont plus fréquentes et graves car survenant chez plus de 80% des personnes vivant avec le VIH. De manière générale, les affections respiratoires liées au VIH surviennent à un stade précoce de la maladie (**Aziagbe et al., 2018**).

Egalement, la détection du statut sérologique VIH dans notre étude a été déterminée majoritairement chez des patients adultes dont l'âge a été compris entre 40-50 ans avec une incidence de 39,1%. Horo et collaborateurs en Côte d'Ivoire avaient retrouvé une tranche d'âge de 20-49 ans avec un taux de 78,36% (**Horo et al., 2012**). Nos résultats sont pratiquement différents de ceux des travaux de recherche réalisés en 2012 par Desmorys qui a montré que sur le continent africain, la prévalence maximale du VIH de 14,9 % était atteinte dans la tranche d'âge de 30- 34 ans chez les femmes et avec une prévalence de 7,0 % dans la tranche d'âge de 40- 44 ans chez les hommes (**Desmorys, 2012**). Des résultats différents de la nôtre ont montré que la tranche d'âge la plus représentée dans leur étude était de 31- 40 ans (38,43%). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que ce soit en Europe ou dans les autres pays africains, l'infection à VIH reste une pathologie du sujet jeune.

Concernant l'infection du VIH par rapport au sexe, l'étude a montré que les femmes ont eu un taux d'incidence de 52,2% qui est plus élevé que les hommes. Cette disparité du taux d'incidence entre les femmes et les hommes pourrait s'expliquer par des déterminants sociaux et économiques mais aussi par des facteurs biologiques et physiologiques qui ne permettent pas toujours aux femmes d'assurer leur prévention (**Ndawinz, 2015**). Cette prédominance féminine s'expliquerait aussi d'une part par une population africaine majoritairement féminine, et d'autre part par des conditions socio-économiques défavorables, et surtout au bas niveau d'instruction des femmes dans nos milieux ce qui pourrait conduire à la prostitution (**Aziagbe et al., 2018**).

En dehors des facteurs liés à l'hôte et ceux environnementaux ; viennent ceux liés à l'infection en tant que cause de survenue des infections respiratoires. La littérature permet de dire que les bactéries, les virus et le champignon *Pneumocystis jirovecii* seraient à l'origine d'infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) (**Aubry et Gauzère, 2021**). Dans cette partie de la discussion, nous parlerons de l'aspect étiologique microbiologique des IRAS.

Parlant des bactéries en cause dans les IRAS, la méthode de culture et la PCR en temps réel multiplex nous ont permis d'avoir les résultats de cette étude.

S'agissant de la méthode de culture, l'identification des microorganismes ensemencés sur les milieux de culture a donné un taux de positivité de 4 soit un taux de 12,1% et 29 étaient négatifs pour la culture sur 33 patients. Sur les quatre échantillons positifs, trois souches de *Klebsiella pneumoniae* qui sont des entérobactéries Bacilles Gram Négatifs (BGN) et une souche de *Streptococcus pneumoniae* Cocci Gram Positif (CGP) ont été déterminées. L'étude d'Attig menée en Algérie sur 113 prélèvements respiratoires a montré que le développement des microorganismes ensemencés sur les milieux de culture était au nombre de 62 soit un taux de 55% de positivité et 45% étaient négative à la culture. De même, sept cas des pneumopathies sont secondaires aux entérobactéries dont quatre (4) sont retrouvées associées à d'autres Bacilles Gram Négatifs. Parmi ces entérobactéries, *K. pneumoniae* occupe le premier rang avec un nombre de quatre suivis d'*Enterobacter cloacae* avec deux cas et un seul cas de *Serratia marsescens* (Attig, 2017). Le même résultat a été trouvé dans une étude faite dans le service de réanimation médicale polyvalente et toxicologie en Tunisie avec n=7 soit 22% des pneumopathies étaient causées par des entérobactéries. Parmi ces entérobactéries, *K. pneumoniae* occupait le premier rang avec une détection de n=3 (Attig, 2017). *K. pneumoniae* était le germe le plus fréquemment observé dans l'étude de Coulibaly en 2020. Contrairement dans l'étude de Kwas et collaborateurs, le *Pseudomonas aeruginosa* était le germe le plus incriminé dans les pneumonies aiguës basses du sujet âgé (Kwas et al, 2017). La négativité des résultats de la culture dans notre étude pourrait être expliquée par l'utilisation d'une antibiothérapie inadéquate des patients avant de se rendre à l'hôpital. Ou soit d'une origine virale de la pneumopathie. Aussi, la variabilité de la fréquence des bactéries uropathogènes pourrait être probablement liée aux facteurs environnementaux (climat) des régions et aux activités usuelles des populations locales (hygiène) dans les différentes études menées.

La répartition de *K. pneumoniae* selon le sexe et l'âge a montré dans cette étude que les sujets de sexe féminin étaient plus touchés (n=2) par les infections à *K. pneumoniae* que ceux du sexe opposé (n=1). Le sexe ratio H/F est en faveur du sexe féminin avec 0,5. Des similitudes ont été retrouvées dans l'étude de Nouri et Ziadi en 2015. Parmi les 30 souches isolées dans son étude, 23 étaient de sexe féminin et 7 de sexe masculin. Le sexe ratio était de 0,30. On peut remarquer une nette prédominance des souches isolées chez les femmes par rapport à celle des hommes (Nouri et Ziadi, 2015). Par contre les résultats de l'étude de Daffe en 2018 menée au Mali, a trouvé que les sujets de sexe masculin étaient plus touchés par les infections à *K. pneumoniae* que ceux du sexe opposé avec 1,76%. Le sexe ratio H/F était en faveur du sexe masculin avec 1,61 (Daffe, 2018). De même, l'étude de Sekhri en 2011 montre une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,17 (Sekhri, 2011). Pour les germes incriminés, les résultats varient d'une étude à l'autre (Simonetti et al., 2014).

La tranche d'âge de 18- 30 a été la plus représentée avec 66,7% suivi de celle de 30-40 ans avec un taux de 33,3%. Nos résultats sont contraires à ceux de l'étude de Daffe qui a montré que la tranche d'âge de 25 à 65 ans était la plus représentée à 45,57% suivie de la tranche de 0 à 25 ans à 27,93% et 26,46% pour les patients âgés de 65 ans à plus (**Daffe, 2018**).

D'après l'analyse des nos résultats de l'antibiogramme, 66,7% des souches ont été résistants à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC). Comparativement avec l'étude de Soufi et Hafayed en 2019 menée en Algérie sur 42 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 50% étaient résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC) (**Soufi et Hafayed, 2019**). Tandis que Souna a détecté une forte résistance à l'AMC d'un pourcentage de 90% (**Souna, 2011**). En effet, la résistance des souches de *K.pneumoniae* dans une espèce varie non seulement avec le temps, le lieu géographique, le service dans un même hôpital et le produit pathologique, mais également avec les antécédents des patients par exemple antibiothérapie, hospitalisation, récidivité ou pathologie chronique (**Fares, 2010**). Les tests de résistance aux antibiotiques effectués sur les trois souches de *K. pneumoniae* ont révélé la présence de deux souches productrices de β - lactamase à spectre élargi (BLSE) dans une proportion 66,7% de suivi de celui du type sauvage dans 33,3%. La présence de ces souches BLSE serait une conséquence de l'acquisition des facteurs de résistance aux antibiotiques qui est généralement secondaire à l'utilisation abusive et incontrôlée de ces antibiotiques (**Muylaert et Mainil, 2012**). Les niveaux des résistances bactériennes varient d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre. Aussi, la connaissance de la situation locale et de son évolution sont nécessaires pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (**El Bakkouri et al., 2009**). Ainsi 66,7% des souches étudiées sont productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Cette valeur se rapproche de celle retrouvée à Tlemcen qui est 67% (**Souna, 2010**).

Les β -lactamines sont les antibiotiques de première ligne dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Cependant, dès le début de leur utilisation de masse dans les années 1940, leur efficacité a été confrontée à la production des β - lactamases (enzymes inactivant les β -lactamines) (**Ruppé, 2010**).

Notre résultat de la résistance des souches de *K.pneumoniae* à la Céfoxitine a donné une faible résistance avec un taux de 33,3%. Pareillement, l'étude de **Soufi et Hafayed, 2019** sur les résultats de la résistance à la céfoxitine exprime un taux faible de 4,76%. De même, les résultats de Sekhri en 2011, se rapprochent des nôtres avec un taux de résistance de 43,35% pour l'association amoxicilline-acide clavulanique (**Sekhri, 2011**). Pour les aminosides, un taux de résistance de 66,7% a été observé pour la gentamycine, mais beaucoup faible pour l'amikacine qui est de 33,3%. Mais ce taux de

résistance à l'amikacine est d'autant plus inquiétant, que cet aminoside est de premier choix dans le traitement des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* et surtout à *K. pneumoniae* BLSE+.

Une seule souche de *S. pneumoniae* a été détectée avec un taux de 25%. Le taux faible de détection de *S. pneumoniae* pourrait s'expliquer par le fait que *S. pneumoniae* est une bactérie fragile et les méthodes de culture prennent du temps avec une relative faible sensibilité, particulièrement quand des antibiotiques ont été administrés au patient avant le prélèvement. Aussi, le diagnostic précoce et précis de la pneumonie pneumococcique dans les établissements de soins demeure difficile en raison des limites des méthodes de diagnostic conventionnelles (**Yang et al., 2015**). Dans cette étude, *S. pneumoniae* a été sensible à la pénicilline. En effet, *S. pneumoniae* est resté uniformément sensible à la pénicilline pendant plus de 25 ans d'utilisation de cet antibiotique. Depuis la découverte des souches de Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline aucun continent n'a été épargné. La résistance du pneumocoque aux antibiotiques varie dans le temps en fonction de plusieurs paramètres comme la région, l'âge, la distribution des sérotypes et la source de prélèvement. Toutefois, la diffusion des pneumocoques résistants est une situation préoccupante dans le monde, motivant la réalisation d'enquêtes épidémiologiques aussi bien au niveau régional, qu'au niveau national et international. L'augmentation des taux de résistance est le plus souvent engendrée par l'utilisation irrationnelle des antibiotiques (**Van de Sande-Bruinsma et al., 2008**). La fréquence de souche érythromycine résistante a été de 33,3% dans cette étude. Elle est similaire dans l'étude de **Tali-Maamar et coll 2012**.

La négativité de croissance bactérienne après culture a donné un taux de 87,9%. Ces résultats négatifs des cultures pourraient être dus soit au traitement antibiotique avant les prélèvements, soit à une infection par d'autres agents étiologiques tels que les bactéries *L. pneumophila*, *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae*, qui ne sont pas détectées en routine dans les laboratoires (**Akter, 2014**).

Concernant la technique d'amplification PCR pour la détection des bactéries, cela nous a permis de mettre en évidence des micro-organismes à un taux de 63,6%. Les bactéries identifiées dans les LBA étaient *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* et *S. aureus* et des co-infections bactériennes. La PCR multiplex a permis d'identifier *H. influenzae* à un taux de 36%, suivi de *S. pneumoniae* à 15%. Pendant cette dernière décennie, plusieurs pays africains ont introduit les vaccins contre *H. influenzae* b et *S. pneumoniae* dans leur programme national de vaccination (**Zar et al., 2015**). De plus, **Abdeldaim et al** ont travaillé sur des échantillons de LBA de 156 patients souffrant d'infection respiratoire aiguë basse, et ont rapporté que le taux de détection de pathogènes augmentait de 13% à 35% chez *S. pneumoniae* et de 20% à 46% chez *H. influenzae*. En effet, ces

germes retrouvés sont des agents responsables de la méningite bactérienne et représentent une préoccupation majeure en matière de santé publique dans les pays en voie de développement où la couverture vaccinale demeure encore faible (**Abdeldaim et al., 2010**).

Aussi, 1 cas de *Legionella spp* a été détecté à 4,8%. Cette bactérie a été retrouvée du fait qu'elle est aussi impliquée dans la maladie du légionnaire et la pneumopathie sévère.

Sa présence dans les prélèvements pourrait s'expliquer par sa transmission par le biais de l'inhalation d'aérosols contaminés. Les souches de *L. pneumophila* ont surtout colonisé les milieux anthropiques tels que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, les tours aéro-réfrigérantes (**Walser et al., 2014**). Les souches de légionelles à l'origine d'infections sont rarement issues de l'environnement naturel mais proviennent majoritairement des installations humaines. En effet, les écosystèmes cités précédemment regroupent souvent plusieurs facteurs favorisant le développement de la bactérie. La température comprise entre 25 et 45°C, le pH entre 5,5 et 8,5, la présence de matières organiques et inorganiques, les microorganismes, l'eau stagnante, le matériau des canalisations sont autant d'éléments aidant à la prolifération des légionelles. Tous ces paramètres favorisent le développement de biofilms dans lesquels elles peuvent éventuellement persister (**Abdel-Nour et al., 2013**).

Le taux de détection des bactéries par la PCR temps réel qui est 63,6% est supérieur à celui de la culture de 12,1%. Les PCR se sont révélées particulièrement utiles pour détecter l'ADN de micro-organismes difficiles à cultiver, poussant lentement, ne supportant que très mal la dessiccation ou présents en faible quantité dans l'échantillon clinique. De plus, contrairement à la culture, la détection de l'agent infectieux par PCR n'est que peu influencée par quelques doses d'antibiotiques (**Sbouï, 2016**). De telles différences entre les techniques de bactériologies classiques et la PCR en temps réel ont été rapportées au Niger en 2006 par Chanteau et al. Ils ont obtenu un taux global de confirmation de 40,8% par la PCR et de 16% par la culture (**Chanteau et al., 2006**). En effet, la sensibilité de la PCR calculée était de 15% et la spécificité de 92%. La valeur prédictive positive était de 75% et la valeur prédictive négative de 41%. Cela pourrait s'expliquer par l'exigence des différents milieux de culture pour les différentes bactéries et en raison de nombreuses variétés de micro-organismes et aussi par l'inhibition de la croissance de multiples espèces de bactéries due à la sélectivité des conditions de culture (**Aydemir et al., 2014**). Toutefois, il n'y a eu deux échantillons où la culture et la PCR ont détecté des pathogènes différents. Ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation du Kit bacterial pneumonia- CAP qui détecte sept bactéries que sont *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*.

K. pneumoniae n'a pas été inclus dans le kit multiplex pour la détection des pathogènes respiratoires par les fournisseurs. Cela pourrait s'expliquer par le fait que *K.pneumoniae* n'est pas une bactérie fréquemment retrouvé en Europe dans les infections respiratoires.

Après la détection des bactéries, nous parlerons du champignon *Pneumocystis jirovecii*. La recherche de *P. jirovecii* selon l'âge a montré un taux élevé chez les patients ayant un âge > 49 ans.

Selon l'étude de Saleh, la pneumonie à *P. jirovecii* survient chez les sujets ayant généralement plus de 26 ans. Dans son étude, il a retrouvé des âges correspondants à ceux d'adulte compris entre 26-35 ans (Saleh, 2014).

Concernant l'état immunitaire sur la survenue des infections, la méthode de PCR a permis de détecter 13 cas positifs à *P. jirovecii*. Sur ces 13 cas positifs, 11 cas soit un taux de 84,6% de *P. jirovecii* ont été détectés dans les échantillons biologiques chez les patients ayant été détectés positifs au VIH. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le VIH affaiblirait le système immunitaire des personnes affectées en les rendant vulnérables à toutes sortes de maladies. En effet, *P. jirovecii* un champignon atypique de type levure, est un agent pathogène humain important, en particulier chez les hôtes immunodéprimés. Il cause principalement une pneumonie (Dhingra *et al.*, 2018). Nos résultats sont en corcondance avec ceux de Khalife ayant trouvé que la pneumocystose est une infection opportuniste très fréquente chez les patients infectés par le VIH avec une prévalence de 60 à 80 % dans les pays industrialisés et de 13 à 55 % dans les pays en voie de développement (Khalife, 2014). Cela pourrait s'expliquer aussi car chez les patients VIH positifs, le risque de contracter une pneumonie à *P. Jirovecii* est directement liée au degré d'immunodépression induit par l'infection virale (Khalife, 2014). Son incidence a explosé avec l'épidémie de l'infection VIH (Tapparel *et al.*, 2010).

En ce qui concerne l'influence des saisons sur la survenue de la maladie, l'étude a montré des pics de détection de *P. jirovecii* durant les périodes d'avril à juillet et octobre à novembre. Ces différents mois correspondent aux grandes et petites saisons de pluies qui sont des périodes froides. Bien que les résultats diffèrent en fonction des auteurs, il existerait une variation saisonnière de l'incidence de la pneumocystose à *P. jirovecii* (Saleh, 2014). En effet, la température et l'humidité extérieure auraient une influence sur la dissémination environnementale des spores du champignon (Khalife, 2014). D'autres équipes, espagnoles et anglaises, ont observé une incidence maximale de *P. jirovecii* en hiver comme pour les autres infections respiratoires (Khalife, 2014). En revanche, bien que l'association entre les facteurs climatiques (température et humidité) et l'incidence de *P. jirovecii* ne

soit pas clairement établie, l'incidence de *P. jirovecii* serait globalement corrélée à la hausse des températures. Plus récemment, les travaux des équipes allemandes et anglaises vont dans ce sens et décrivent des pics saisonniers plutôt estivaux (**Saleh, 2014**).

Enfin, après avoir parlé des bactéries et du champignon *P. jirovecii*, nous aborderons les virus respiratoires détectés. Un panel de 9 virus respiratoires a été recherché par la PCR multiplex avec le kit In vitrogen PCR template.

Sur les 33 échantillons testés, 4 types de virus ont été détectés à un taux de 21,2%. Ce taux est semblable à celui d'études antérieures ayant rapporté des taux entre 23% et 56% dans les infections virales chez les patients atteints de pneumonie (**Gadsby et al., 2016**). Les virus détectés étaient Coronavirus OC43 à 3,03%, Coronavirus HKU1 à 3,03%, Rhinovirus humain RHV 3,03% et virus Para-influenza -3 PIV-3 à 12,12%). Cependant, des résultats de plusieurs autres études sont en désaccords et ont rapporté des prévalences et des virus différents de notre étude (**Wansaula et al., 2016**). Cette différence serait probablement due aux différentes méthodes choisies, différentes régions et populations. Aussi cette différence pourrait-elle s'expliquer par la différence de climat et saison dans les pays où les études seraient menées. En milieu tropical, l'incidence est maximale au cours de la saison des pluies. En effet, l'incidence des infections varie avec la saison (**Saïdani, 2010**). Le virus le plus incriminé chez les patients atteints de pneumonie était le virus Parainfluenza -3 avec 12,12%. De même, une étude réalisée au Brésil a mis en évidence le virus Parainfluenza en tant que virus le plus incriminé avec un taux de positivité de 57,7% avec une prédominance du sous-type PIV-3 (**Thomazelli et al., 2017**). En effet, ce sous-type est essentiellement responsable d'infections hautes (rhinites, trachéites, laryngites) chez les enfants de 2 ans et d'infections respiratoires basses (pneumonies, bronchiolites) chez les nourrissons (**Dorin, 2012**). Les PIV-3 ont montré des prévalences plus élevées pendant la saison sèche et chaude qui est la période de décembre à mars dans notre étude. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait qu'en Côte d'Ivoire, la période de décembre à mars correspond à la grande saison sèche et à la fin de la saison des pluies et surtout le début de l'harmattan. L'harmattan correspond à la saison sèche et froide avec un vent sec et chaud le jour et plus froid la nuit. Alors selon la littérature, les pneumonies peuvent être observées durant toute l'année avec un maximum de fréquence en hiver car les saisons froides sont propices aux infections respiratoires (**Taqarort, 2011**). Une coinfection entre PIV-3 et de Coronavirus HKUI a été détectée avec un taux de 14,3% dans cette étude. Des virus et des proportions différentes ont été rapportées dans d'autres études (**Kenmoe et al., 2016**). Le BoV, l'AdV, le PIV et le VRS étaient les virus fréquemment détectés en coinfection dans ces études. Les coinfections virales ne semblent pas

influencer la sévérité de l'infection selon **Huguenin et al., 2012**. Les virus recherchés sont dits classiques puisqu'ils ont un tropisme presque exclusif des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Ils partagent tous une courte période d'incubation et une transmission interhumaine par contact direct ou par émission de microgouttelettes sous forme d'aérosol (**Dorin, 2012**).

L'analyse des LBA a révélé une co-infection bactérie- virus dans 12,1% des cas et bactérie- *P. jirovecii* dans 27,3 %. Une étude réalisée au Sénégal montre que l'association entre bactéries et virus était la principale cause d'infection respiratoire aiguë (**Assane et al., 2018**) ; ce qui est en contradiction avec les résultats de cette étude qui montre que la co-détection bactérie- *P. jirovecii* serait la cause principale de pneumonie à Abidjan. Cela pourrait s'expliquer par le faible taux de virus détecté.

De même, l'étude a mis en évidence des bactéries dans 52,5 % des cas suivies de *P. jirovecii* dans 32,5 % et enfin des virus dans 15%. En effet, selon les études de **Díaz et al., 2011**, les virus respiratoires seraient responsables de 15 à 40 % des étiologies connues des pathologies respiratoires d'étiologie infectieuse. Nos résultats concernant la détection des virus sont similaires à ceux de Díaz et collaborateurs. Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées de par le monde pour tenter de préciser l'épidémiologie des germes responsables des pneumonies aiguës. Le fort taux de bactéries dans notre étude pourrait s'expliquer par des études ultérieures menées qui ont démontré que les voies respiratoires inférieures étaient remplies de diverses communautés de bactéries tant dans les états de santé que dans les états de maladie (**Dickson et al., 2013**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de cette étude dont l'objectif était de déterminer par des méthodes de microbiologie conventionnelles associées aux méthodes de microbiologie moléculaires les microorganismes responsables des IRAS chez les adultes en Côte d'Ivoire, des conclusions suivantes peuvent être tirées:

Concernant les facteurs de risque de survenue de la pneumonie, la tranche d'âge de 30-39 ans a été la plus touchée et la survenue de la pneumonie n'est pas liée à l'âge. Par contre les facteurs de risque associés à la pneumopathie dans cette étude étaient le sexe masculin, le statut socio-économique défavorable, la saison sèche et pluvieuse.

Les études microbiologiques ont montré une faible performance des techniques de bactériologie conventionnelles notamment de la culture avec l'isolement de deux bactéries responsables d'IRAS : *K. pneumoniae* et *S. pneumoniae*. Par contre, les techniques de biologie moléculaire ciblant les germes classiquement présents dans les IRAS a fourni de meilleurs résultats avec un taux de 63,6% beaucoup plus élevé que celui de 12,1 % de la culture. En effet, la PCR temps réel a permis la détection de *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* et *S. aureus* et des co-infections bactériennes avec une prédominance de *H. influenzae*. Concernant, la détection du champignon *P. jirovecii*, la PCR a permis de le mettre en évidence avec un taux de 39,4%. De même, *P. jirovecii* a été fortement détecté chez les patients VIH positif. S'agissant de la recherche des virus par la PCR multiplex en temps réel, nous avons eu un taux de détection de 18,2% avec la détection de Coronavirus OC43, du virus Parainfluenza -3 (VPI-3), de Rhinovirus Humain. Une coinfection virale entre le virus Parainfluenza-3 (VPI-3) et le Coronavirus HKU1 a été observé. L'étude a montré qu'en Côte d'Ivoire, le virus du Parainfluenza virus-3 (VPI-3) est celui qui a prédominé (12,12%) et circule dans les IRAS au cours de la période d'étude.

L'étude a permis de mettre en évidence des coinfections bactéries-virus, bactéries- *P. jirovecii* et bactérie-virus- *P. jirovecii*.

Les infections respiratoires aiguës sévères ont été dominées par les bactéries dans 52,5 % des cas, suivies de *P. jirovecii* dans 32,5 % des cas et des virus dans 15% des cas. L'étiologie bactérienne a donc été prépondérante dans les infections respiratoires aiguës sévères dans la présente étude menée au C.H.U de Cocody, Abidjan.

De par cette étude, 81,9% des étiologies microbiennes des IRAS ont été déterminées.

Perspectives

L'étude a montré la présence de bactéries, de virus et de *P. jirovecii* dans les prélèvements respiratoires. Cependant 18,1% des étiologies sont restées inconnues dans cette étude. En perspective, il conviendra de :

- Séquencer les pathogènes identifiés par la technique de métagénomique qui consiste à étudier collectivement les gènes sans les détailler individu par individu.

Recommandations

Au terme de notre étude, il paraît opportun dans le but d'améliorer le diagnostic microbiologique des infections respiratoires aiguës sévères de faire des suggestions à l'endroit :

Des autorités gouvernementales

- Améliorer la disponibilité des vaccins contre les pneumopathies dans les centres de soins
- Equiper tous les Centres Hospitaliers Universitaires où il y'a des services de pneumologie de fibroscopes pour les examens plus approfondis
- Baisser le coût des examens de diagnostic de la pneumonie par les techniques de PCR

Aux personnels de santé

- Eduquer la population en les sensibilisant sur les effets néfastes de certains facteurs environnementaux sur la santé : tels que la poussière, les fumées de brûlis...
- Utilisation des antibiotiques imipénème et ceftazidime dans le traitement des pneumonies

Des biologistes

- Favoriser l'utilisation des méthodes PCR pour le diagnostic de certains pathogènes respiratoires
- Orienter le diagnostic vers la recherche de champignon *P.jirovecii* et de virus dans les cas de pneumonie
- Poursuivre l'étude pour augmenter la taille de l'échantillon et si possible l'étendre aux autres Centre Hospitalier Universitaire.

De la population

- Se faire vacciner contre la pneumopathie et les autres maladies évitables par la vaccination
- Consulter tôt un médecin en cas de fièvre et toute toux et/ou difficulté respiratoire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdeldaim G.M., Stralin K., Korsgaard J., Blomberg J., Welinder-Olsson C. & Herrmann B. 2010.** Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *BMC Microbiology*, **10**: 310.
- Abdel-Nour M., Duncan C., Low D.E. & Guyard C. 2013.** Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Science*, **14**(11): 21660-21675.
- Aissou M. & Bousnana N.E.H. 2018.** Etude de la résistance aux antibiotiques des souches *Staphylococcus aureus* isolées du milieu hospitalier. Mémoire de Master en Biologie, Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, Algérie, 73p.
- Akers R.M. & Denbow D.M. 2013.** Anatomy and Physiology of Domestic Animals. Blackwell Publishing, 1^{ère} édition, 575p.
- Akindès F. 2000.** Inégalités sociales et régulation politique en Côte d’Ivoire. *Politique africaine*, **2**: 126-141.
- Allander T., Tammi M.T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A. & Andersson B. 2005.** Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of National Academy Science*, **102**: 12891-12896.
- Anonyme Ministère du plan et du développement. 2019.** Rapport volontaire d’examen national de la mise en œuvre des objectifs de développement durable en Côte d’Ivoire. Rapport national volontaire sur les ODD, Côte d’Ivoire, 153p.
- Arafa N., Smati F., Scheftel M.J. & Meunier O. 2009.** Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* isolées à l’hôpital universitaire. Thèse de Doctorat en médecine, Université des Sciences et Technologie, Algérie, 46p.
- Assane D., Makhtar C., Abdoulaye D., Amary F., Djibril B., Amadou D., Niokhor D.J.B., Amadou D., Cheikh L., Ndongo D., Mbayame N., Lamine F. & Bouh B.C.S. 2018.** Viral and Bacterial Etiologies of Acute Respiratory Infections Among Children Under 5 Years in Senegal. *Microbiology Insights*, **11**: 1-5.
- Attig R. 2017.** Etude microbiologique des prélèvements respiratoires dans les unités de soins intensifs au chu de Beni Messous. Mémoire de Master en Biologie des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Saad Dahlebblida, Algérie, 76p.

- Aubry P. & Gauzère A. 2021.** Infections respiratoires aiguës, actualités 2021. Centre René Labusquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, France, 13p.
- Avenel S. 2011.** Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* : d'une analyse épidémiologique locale à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnostic. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy I, 147p.
- Aydemir O., Aydemir Y. & Azdemir M. 2014.** The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Pakistan Journal of Medical Science*, **30**(5): 1011-1016.
- Aziagbe K.A., Gbadamassi G., Moussa O.A., Efalou P., Adambounoua T.S., Assarida., Kombated. & Adjoh K. 2018.** Aspects épidémiologiques cliniques et étiologiques des pathologies respiratoires chez les PVVIH au CHU Sylvanus Olympio de Lomé. *Journal of functional ventilation and pulmonology*, **20**(1): 311-323.
- Bandet T., Whitehead S. & Blondel-Hill E. 2014.** Susceptibility of clinical moraxella catarrhalis isolates in British columbia to six empirically prescribed antibiotic agents. *Canadian Journal Infectious Disease Medicine Microbiology*, **25**(3): 155-158.
- Barnes S.R., Wansaula Z., Herrick K., Oren E., Ernst K., Olsen S.J. & Casal M.G. 2018.** Mortality estimates among adult patients with severe acute respiratory infections from two sentinel hospitals in southern Arizona, United States, 2010–2014. *BMC Infectious Disease*, **18**:78.
- Bayramova F., Jacquier N. & Greub G. 2018.** Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria. *Microbes Infectious*, **20**(7-8): 432-440.
- Bekka C. & Bekka S. 2019.** Pneumopathies aiguës communautaires graves en réanimation. Mémoire de Master en Médecine, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, Algérie, 149p.
- Belkorane H.F.Z. & Toumi S. 2016.** Etude de l'antibiorésistance des souches de streptocoques isolées au niveau de l'établissement public hospitalier de Koléa. Mémoire de Master en sciences biologiques, Université de Blida 1, Algérie, 68p.
- Belloughe G. 2018.** Profil radio-clinique des infections respiratoires aiguës communautaires au sein de service de pneumologie de l'hôpital Militaire Avicenne. Thèse de Doctorat en médecine, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Algérie, 132p.

- Berdyev D., Scapin R., Labille C., Lambin L. & Fartoukh M. 2011.** Infections communautaires graves- les pneumonies aiguës communautaires bactériennes de l'adulte. *Réanimation*, **20**: S566-S575.
- Bernet C., Garret M., De Barbeyrac B., Bebear C. & Bonnet J. 1989.** Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by Using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of clinical microbiology*, **27**(11) : 2492-2496.
- Boughachiche R.S.S. 2016.** Caractérisation morphologique, biochimique et mutagénèse des *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine. Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 94p.
- Brakstad O.G., Aasbakk K. & Maeland J.A. 1992.** Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**(7): 1654-1660.
- Branche A.R. & Falsey A.R. 2016.** Parainfluenza Virus Infection. *Seminars Respiratory Critical Care Medicine*, **37**: 538-554.
- Brenner D.J., Steigerwalt A.G. & Mcdade J.E. 1979.** Classification of the Legionnaires disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of Internal Medicine*, **90**(4): 656-658.
- Brieu N., Guyon G., Rodiere M., Segondy M. & Foulongne V. 2008.** Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **27**(11): 969-973.
- Calderón E.J., Varela J.M., Durand-Joly I. & Dei-Cas E. 2011.** *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. In: *Pneumonia: Symptoms, Diagnosis and Treatment*, Nova science Publishers, Inc, 1-35.
- Carman W.F. & Mahony J.B. 2007.** The pathogens. *Journal of Clinical Virology*, **40**(1): 5-10.
- Castro N. & Molina J.-M. 2011.** Infections respiratoires basses de l'adulte. *EMC -Pneumologie*, **8** : 1-20.
- Catalano-Pons C., Vallet C., Lebon P. & Gendrel D. 2009.** Infections à Bocavirus humain. *Medecine et Maladies Infectieuses*, **39**: 353-355.
- Chagas C. 1909.** Nova tripanozomíaze humana: estudo sobre a morfologia e o evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*, **1**: 159-218.

- Chanteau S., Sidikou F., Djibo S., Moussa A., Mindadou H. & Boisier P. 2006.** Scaling up of PCR based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: indisputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine*, **100**(7): 677-680.
- Cherkaoui F.E. 2018.** Les infections respiratoires aiguës basses communautaires. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Maroc, 124p.
- Chidiac C. 2011.** Antibiothérapie par voie générale dans les infections respiratoires basses de l'adulte. Pneumonie aiguë communautaire. Exacerbations de bronchopneumopathie chronique obstructive. *Medecine et maladies infectieuses*, **41**(5): 221-228.
- Choroszi-krol I., Frej-Madrzak M., Jama-Kmiecik A., Bober T. & Sarowska J., 2012.-** Characteristics of the *Chlamydia trachomatis* species-Immunopathology and infections. *Advances in clinical experimental medicine*, **21**(6): 799-808.
- Colville T. & Bassert J.M. 2016.** Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians, *In* : Elsevier's veterinary assisting textbook, 3251 Riverport Lane St. Louis, Missouri 63043, 2nd edition, 76-80p.
- Constantin J.M., Leone M., Jaber S., Allaouchiche B., Orban C., Cannesson M., Fourcade O., Morel J., Martin C. & Lefrant J.Y. 2010.** Quelle activité et quels personnels soignants dans 66 unités de réanimation du sud de la France. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*, **29**: 512-517.
- Coulibaly. A. 2020.** Aspects épidémiocliniques diagnostiques et thérapeutiques des pneumopathies aiguës bactériennes du sujet âgé au service de pneumophtisiologie du CHU du Point G. Mémoire de thèse de médecine et d'odonto-stomatologie, Université des sciences, des techniques et des technologies, Bamako, Mali, 101p.
- Daffe F.M. 2018.** Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali, 114p.
- De Bataille L. 2012.** Prise en charge de l'infection respiratoire basse du patient âgé de 65 ans et plus: le maintien à domicile est-il une alternative à l'hospitalisation. Thèse de Doctorat en médecine, Université de Nantes, France, 101p.
- Decastro N. & Molina J. 2011.** Infections respiratoires basses de l'adulte. *Pneumologie*, 10p.

- Delmont J., Marseille J., Jauréguiberry S., Marchou B., Parola P., Pichard E. & Simon F. 2016.** Infections respiratoires basses. In, E. PILLY, Edition Alinéa Plus, Paris, 214-240 p.
- Dembélé A. 2020.** Aspects cliniques, biologiques et radiologiques des infections respiratoires aiguës basses (IRAS basses) au CSCOM de Yirimadio à Bamako, Mali financée par la fondation Merieux et l'academie chinoise des sciences medicales. Thèse de Doctorat en Médecine, Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali, 69p.
- Desmorys R.M. 2012.** Intérêt du traitement antirétroviral précoce chez l'adulte infecté par le VIH en Afrique sub-Saharienne. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux Segalen, France, 137p.
- Dhingra D., Mandal A. & Singh A. 2018.** *Pneumocystis Jirovecii* Pneumonia in Children. *Journal of Pediatric Infectious Disease*, **13**(1): 1-9.
- Diarra A.S. 2014.** Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites dues à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali, 114p.
- Díaz A., Zaragoza R., Granada R. & Salavert M. 2011.** Acute viral infections in immunocompetent patients. *Medical intensiva*, **35**(3): 179-185.
- Dickson R.P., Erb-Downward J.R. & Huffnagle G.B. 2013.** The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*, **7**(3): 7245-7257.
- Dickson R.P. & Huffnagle G.B. 2015.** The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathogens*, **11**: 1-5.
- Djebili M.Y.O. 2017.** Etude bactériologique des pneumopathies ovines dans la région centre. Thèse de Doctorat en Medecine vétérinaire, Université de Blida 1, Algérie, 75p.
- Dorin J. 2012.** Etude épidémiologique des infections respiratoires virales des hivers 2009 à 2012 en milieu hospitalier et apport des nouvelles technologies au diagnostic viral. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Lorraine, France, 100p.
- Egron A. 2014.** Impact du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte : exemple de l'autisme. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Nantes, France, 112p.
- El Bakkouri J., Belabbes H., Zerouali K., Belaiche A., Messaouidi D., Gros Claude J. D. P. & El Mdaghri N. 2009.** Résistance aux antibiotiques d'Escherichia coli Uropathogène communautaire et consommation d'Antibiotiques à Casablanca, Maroc. *European Journal of Scientific Research*, **36**(1): 49-55.

- Elisabeth G., Renée Biesmans C., Anton Buiting G., Charles Obihara C. & Rossen J. W. 2012.** Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR. *Virology Journal*, **9**: 276.
- Esposito S., Dacco V., Daleno C., Gambazza S., Montinaro V., Bisogno A. Principi N. & Colombo C. 2014.** Human rhinovirus infection in children with cystic fibrosis. *Japanese journal of infectious diseases*, **67**(5): 399-401.
- Ezzouine H., Harbouze N. & Benslam A. 2014.** Pneumopathies nosocomiales chez les patients séjournant au long cours en réanimation : caractéristiques cliniques et bactériologiques. Posters. *Revue des maladies respiratoires*, **34**: 36-40.
- Fadika V., Dao A., Noufé D.D., Élisée K. & Kamagaté B. 2019.** Variation de l'humidité mensuelle de l'air sur le littoral ivoirien en période de déficit pluviométrique. *African Science*, **15**(5): 12-24.
- Fanjeaux C. 2010.** *Legionella* et legionellose : Evolution des donnees epidemiologiques en France De 1987 à 2008. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy 1, France, 124p.
- Fares H. 2010.** Infections urinaires nosocomiales: Facteurs de risque et antibiorésistance des bactéries isolées. Etude prospective à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V de Rabat. Thèse de Doctorat d'état, Université Mohammed V, Rabat, 108p.
- Foulongne V. & Segondy M. 2009.** Human bocavirus (HBoV). *Pathologie biologique*, **57**(2): 197-202.
- Gadsby N.J., Russell C.D., McHugh M.P., Mark H., Morris A.C., Laurenson I.F., Hill A.T. & Templeton K.E. 2016.** Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Disease*, **62**: 817-823.
- Galmès J. 2013.** Isolement et caractérisation de nouvelles espèces de Torque Teno Mini Virus (TTMV) : implication potentielle dans la pathogenèse de la pneumonie. Thèse de Doctorat en médecine, Université de Lyon, France, 179p.
- Gisselsson-Solén M., Henriksson G., Hermansson A. & Melhus A. 2014.** Risk factors for carriage of AOM pathogens during the first 3 years of life in children with early onset of acute otitis media. *Acta Oto-laryngologica*, **134**: 684-690.
- Greenberg S.B. 2011.** Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Seminars Respiratory Critical Care Medicine*, **32**(4): 433-446.

- Greiner O., Day P.J.R., Altwegg M. & Nadal D. 2003.** Quantitative Detection of *Moraxella catarrhalis* in Nasopharyngeal Secretions by Real-Time PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*, **41**(4): 1386-1390.
- Griffiths C., Drews S.J. & Marchant D.J. 2017.** Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, **30**(1): 277-319.
- Halima R. 2015.** Etude rétrospective des PDP et LBA des patients hospitalisés au service de réanimation du centre hospitalier Hassan-II Fès au cours des années. Thèse de Doctorat des sciences et techniques, Université Sidi Mohamed ben Abdellah, Hassan-II Fès, Maroc, 51p.
- Hartenstein M. & Silva F. 2018.** Modélisation de l'arbre bronchique. 14ème Congrès Français d'Acoustique, Le Havre, France, 8p.
- Hassel C. 2015.** Epidémiologie moléculaire et évolution de l'entérovirus A71 et interactions génétiques avec les autres entérovirus de l'espèce A responsables de la maladie pied-main-bouche. Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 229p.
- Hatem A., Mohamed S., Elhassan U.E.A., Ismael E.A.M., Rizk M.S., El-kholy A. & El-Harras M. 2019.** Clinical characteristics and outcomes of patients with severe acute respiratory infections (SARI): results from the Egyptian surveillance study 2010-2014. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, **14**:11.
- Hecini- Hannachi A. 2014.** *Streptococcus pneumoniae* dans les infections invasives : identification, résistance aux antibiotiques et sérotypage. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Constantine I, Algérie, 211p.
- Hirsch H.H., Martino R., Ward K.N., Boeckh M., Einsele H. & Ljungman P. 2013.** Fourth European Conference on infection in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clinical Infectious Disease*, **56**(2): 258-266.
- Holter J.C., Müller F., Bjørang O., Samdal H.H., Marthinsen J.B., Jenum P.A., Ueland T., Frøland S.S., Aukrust P., Husebye E. & Heggelund L. 2015.** Etiology of community-acquired pneumonia and diagnostic yields of microbiological methods: a 3-year prospective study in Norway. *BMC Infectious Disease*, **15**: 64.
- Horne B.D., Joy E.A., Hofmann M.G., Gesteland P.H., Canno J.B., Lefler J.S., Blagev D.P., Korgenski E. K., Torosyan N., Hansen G.I., Kartchner D. & Pope III C.A. 2018.**

Short-Term Elevation of Fine Particulate Matter Air Pollution and Acute Lower Respiratory Infection. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **198**(6): 759-766.

Horo K., Brou-Godé V.C., Ahui J.M.B., Kouassi A.B., Djereke G.B., Cardenat M. & Aka-Danguy E. 2009. Pneumonies communautaires d'allure bactérienne chez le sujet infecté par le VIH: étude préliminaire prospective. *Revue de Pneumologie clinique*, **65**: 137-142.

Horo K., Brou-Godé V.C., Ahui J.M.B., Kouassi A.B., Diouf A.F., Konaté-Koné F., Motsebo F.S., Ouattara K., Bemba E.L., Foutoupouo K., Meless T., N'Gom S.A., Koffi B.N. & Aka-Danguy E. 2012. Dynamic of respiratory pathology in a service of pneumology in black Africa in the context of HIV infection from 1998 to 2007. *Revue de Pneumologie Clinique*, **8**(3): 180-184.

Huguenin A., Moutte L., Renois E., Leveque N., Talmud D., Abely M., Nguyen Y., Carrat F. & Andreoletti L. 2012. Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *Journal of Medical Virology*, **84**(6): 979-985.

Iliquer M. 2010. Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U de Nantes. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Nantes, France, 123p.

Jartti T., Hedman K., Jartti L., Ruuskanen O., Allander T. & Söderlund-Venermo M. 2012. Human bocavirus the first 5 years. *Reviews in medical virology*, **22**: 46-64.

Jaton K., Schrenzel J. & Greub G. 2014. Diagnostic microbiologique de la pneumonie. *Revue Medicale Suisse*, **10**: 2126-2129.

Jeannoël M. 2019. Pneumopathies bactériennes secondaires aux infections respiratoires virales : de l'étude expérimentale in vitro à l'analyse descriptive des données hospitalières en passant par l'étude prospective d'une cohorte de patients. Thèse de Doctorat des Micro-organismes, interactions, infections, Université Claude Bernard Lyon 1, France, 155p.

Jeuge-Maynard I., Caron A. & Trouvelot M.H. 2010. Le petit Larousse de la Médecine. Édition Larousse, 1149p.

- Kenmoe S., Tchendjou P., Vernet M.A., Moyo-Tetang S., Mossus T., Njankouo-Ripa M., Kenne A., Penlap Beng V., Vabret A. & Njouom R. 2016.** Viral etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011-2013. *Influenza other Respiratory Viruses*, **10**(5): 386-393.
- Khalife S. 2014.** Interactions hôte-pneumocystis : études fonctionnelle de la PcMnSOD et de la colonisation par pneumocystis spp par des approches expérimentales et clinico-épidémiologiques. Thèse de Doctorat en médecine, Université du Droit et de la Santé, Lille II et École Doctorale des Sciences et de Technologie, Université Libanaise, France, 259p.
- Khallouf S. 2017.** La contamination bactériologique des masques à oxygène dans les établissements publique de santé de proximité de la ville du Guelma. Mémoire de Master de Sciences de la nature et de la vie, Université de Guelma, Algérie, 42p.
- Khor C., Sam I., Hooi P., Quek K. & Chan Y. 2012.** Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC pediatrics*, **12**: 1-9.
- Kroll J.L. & Weinberg A. 2011.** Human metapneumovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, **32**(4): 447-453.
- Kwas H., Sonia H., Ines Z., Amel K. & Habib G. 2017.** Particularités de la pneumopathie aigue communautaire chez le sujet âgé. *La Tunisie Médicale*, **95** (2): 92-96.
- Lagare A. 2014.** Etiologies virales et bactériennes des infections respiratoires aiguës sévères chez les enfants de moins de cinq ans au Niger. Mémoire de Master II en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques, Université Polytechnique, Bobo Dioulasso, Burkina Faso, 83p.
- Lamoureux I. 2016.** Flore intestinale et pathologie: étude historique des concepts du microbiote. Thèse de Doctorat en médecine, Université Toulouse III– Paul Sabatier, France, 108p.
- Larabi I. & Louadj Z. 2015.** Les pneumopathies bactériennes chez l'enfant. Mémoire de fin d'étude, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Algérie, 95p.
- Lee J., Choi E.H. & Lee H.J. 2010.** Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991-2007). *Journal of medical virology*, **82**(4): 624-631.

- Le Doussal F. 2016.** Bronchiolite à virus respiratoire syncytial chez le nourrisson : prise en charge en ville et conseils à l'officine. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Rennes 1, France, 114p.
- Le Parc M. 2018.** Caractéristiques des infections respiratoires causées par le Méta-pneumovirus humain chez l'adulte : étude rétrospective menée sur des données recueillies au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse de janvier 2013 à mars 2017. Sciences pharmaceutiques. Thèse de Doctorat d'Etat en pharmacie, Université de Bordeaux, France, 115p.
- López-Gobernado M., Pérez-Rubio A., López-García E., Mayo-Iscar A. & Eiros J.M. 2017.** Carga de hospitalización por neumonía en un hospital terciario español. Período 2009-2014. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, **55**(2):170-175.
- Lynch J.P III., Fishbein M. & Echavarría M. 2011.** Adenovirus. *Seminars Respiratory Critical Care Medicine*, **32**(4): 494-511.
- Lynch J.P III. & Kajon A.E. 2016.** Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars Respiratory Critical Care Medicine*, **37**: 586-602.
- Mackenzie G. 2016.** The definition and classification of pneumonia. *Pneumonia* 8:14.
- Madi S. & Djema K. 2019.** Isolement et caractérisation des bactéries multirésistantes impliquées dans les infections nosocomiales et l'environnement hospitalier au niveau de l'hôpital de Lakhdaria. Mémoire de Master en Sciences Biologiques, Université Akli Mohand Oulhadj-Bouira, Algérie, 103p.
- Martinez J-S., Le Falher G., Corne P., Bourdin A., Lequellec A., Delabre J-P., Makinson A., Hansel S., Reynes J. & Le Moing V. 2010.** Audit des prescriptions d'antibiotiques dans les pneumonies aiguës communautaires de l'adulte dans un centre hospitalier universitaire. *Medecine interne et Maladies Infectieuses*, **40**(8): 468-475.
- Messmer T.O., Black C.M. & Facklam R.R. 1995.** Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from other upper respiratory tract streptococci by arbitrarily primed PCR. *Clinical biochemistry*, **28**:567-572.
- Micek S.T., Fuller B.M., Hampton N.B. & Kollef M.H. 2014.** Clinical implications for patients treated inappropriately for community-acquired pneumonia in the emergency department. *BMC Infectious Disease*, **14**: 61.

- Momine. P. 2018.** Prévalence de la pneumopathie dans les états fébriles aigus en milieu rural: cas de Zoukougbeu. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université Alassane Ouattara, Abidjan, Cote d'Ivoire, 101p.
- Muylaert A. & Mainil J.G. 2012.** Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur contagiosité. *Annales Médicales Vétérinaire*, **156**: 109-123.
- Ndawinz J.D.A. 2015.** Estimation de l'incidence de l'infection par le VIH et autres indicateurs de surveillance de l'épidémie du VIH : le cas de la France et du Cameroun. Thèse de Doctorat en biostatistique, Université Pierre et Marie Curie, France, 228p.
- Nehal M., Zuel-Fakkar M.D., Mona H. & El-Shokry M.D. 2010.** Study of Erythroderma and Psoriasis Exacerbation by Staphylococcal Superantigens. *Journal of the Egyptian Women Dermatologic Society*, **7**: 113-117.
- Ngombe L.K., Mbombo-Ditunga., Kameya N., Malingo A.A., Kayomb N.K., Ngolomba J.N., Nday K.D. & Numb L. 2014.-** Infection respiratoire aigüe et statut nutritionnel chez les enfants de 0-5 ans: cas des cliniques universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo. *The Pan African Medical Journal*, **19**: 393.
- Nouri M. & Ziadi C.F. 2015.** Etude bactériologique et résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*. Mémoire de Master des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, Maroc, 50p.
- OMS. 2014.** L'action mondiale de lutte contre la pneumonie. Aide mémoire, 331p.
- OMS. 2018.** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/> consulté le 28/03/19.
- Palmer S.G., Devito I., Jenkins S.G., Niewiesk S., Porotto M. & Moscona A. 2014.** Circulating clinical strains of human parainfluenza virus reveal the viral entry requirements for in vivo infection. *Journal of virology*, **88**(22): 13495-13502.
- Panda S., Mohakud N.K., Pena L. & Kumar S. 2014.** Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *International Journal of Infectious Disease*, **25**: 45-52.
- Passe-Coutrin P.M.P. 2013.** Pneumopathie aigüe à *Mycoplasma pneumoniae* : Caractéristiques cliniques et paracliniques permettant une prise en charge précoce en médecine de ville. Etude rétrospective de 24 cas hospitalisés en 2011 et 2012 au centre hospitalier de Saint Germain-en-Laye. Thèse de Doctorat en médecine, Université Paris Diderot, Paris 7, 56p.
- Pavia A.T. 2011.** Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the rôle of diagnosis. *Clinical Infectious Disease* **52** (4): 284-289.

- Payet S. 2017.** Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique. Thèse de Doctorat en chirurgie dentaire, Université de Bordeaux, France, 95p.
- Pecastaings S. 2010.** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de Doctorat en médecine, Université Toulouse III-Paul Sabatier, France, 264p.
- Peto L., Nadjma B., Horbya P., Nganc T.T., Doorna R., Van Kinh N., Heiman F.L. & Wertheima. 2014.** The bacterial aetiology of adult community-acquired pneumonia in Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **10**: 1093.
- Peuchant O., Cazanave C. & de Barbeyrac B. 2012.** Infections humaines à Chlamydiae. *EMC Maladies Infectieuses*, **9**: 1-19.
- Pretorius M.A., Madhi S.A., Cohen c., Naidoo D., Groome M., Moyes J., Buys A., Walaza S., Dawood H., Chhagan M., Haffjee S., Kahn K., Puren A. & Venter M. 2012.** Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex realtime reverse-transcription polymerase chain reaction assay in patients hospitalized with severe acute respiratory illness--South Africa, 2009-2010. *Journal of Infectious Disease*, **206**(1): 159-165.
- Racaniello V.R. 2007.** Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields virology, 5th ed. Philadelphia : Lippincott-Williams and Wilkins, 795-838.
- Razanajatovo N.H., Guillebaud J., Harimanana A., Rajatonirina S., Ratsima E.H., Andrianirina Z.Z., Rakotoariniaina H., Andriatahina T., Orelle A., Ratovoson R., Irinantenaina J., Rakotonanahary D.A., Ramparany L., Randrianirina F., Richard V. & Heraud J-M. 2018.** Epidemiology of severe acute respiratory infections from hospital based surveillance in Madagascar, November 2010 to July 2013. *PLoS One* **13**(11): 1-17.
- Ren D. & Pichichero M.E. 2016.** Vaccine targets against *Moraxella catarrhalis*. *Expert opinion on therapeutic Targets*, **20**: 19-33.
- Rogers G.B., Shaw D., Marsh R.L., Carroll M.P., Serisier D.J. & Bruce K.D. 2015.** Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice. *Postgraduate medical journal*, **91**: 463-470.
- Roux A., Lemiale V., Kouatchet A., Vincent F., Bollee G., Roux P. & Azoulay E. 2010.** Pneumocystose pulmonaire en dehors de l'infection à VIH. *Réanimation* **19**: 327-338.

- Ruppé E. 2010.** Épidémiologie des β -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M, **12**(1): 3-16.
- Ruuskanen O., Lahti E., Jennings L.C. & Murdoch D.R. 2011.** Viral pneumonia, *Lancet* **377**: 1264-1275.
- Saïdani M. 2010.** *Streptococcus pneumoniae*: Rappels bactériologiques et état actuel de la sensibilité aux antibiotiques. Laboratoire de Microbiologie-Hôpital Charles Nicolle de Tunis, 1-39.
- Saleh A.M. 2014.** La pneumocystose au cours du SIDA en Afrique : Revue de la littérature. Thèse de Doctorat en Médecine. Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako, Mali, 72p.
- Sampo E. 2013.** Impact de la PCR en temps réel dans le diagnostic précoce des méningites bactériennes aiguës au Burkina Faso. Mémoire de DEA de Biochimie - Biologie Moléculaire, UFR science de la vie et de la terre, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 65p.
- Sanogo B. 2010.** Etude des infections respiratoires aiguës en milieu communautaire chez les enfants de moins de 5 ans dans les régions de Kayes, Sikasso, Segou et Mopti. Thèse de Doctorat en médecine, Université de Bamako, Mali, 72p.
- Sanou A.M. 2018.** Epidémiologie et caractérisation moléculaire des virus et bactéries détectés dans les infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de cinq ans au Burkina Faso. Thèse de Doctorat en Bactériologie- Virologie, Université Nazi Boni de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 192p.
- Savadogo B. 2012.** Pneumopathies aiguës communautaires bactériennes aux urgences du CHU du point G : profil épidémiologique et clinique et pronostic. Thèse de Doctorat en médecine, Université des Sciences, des Techniques et de Technologie de Bamako, Mali, 88p.
- Sboui D. 2016.** Développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les échantillons environnementaux. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques, biotechnologie et santé, Université Jean Monnet (Saint Etienne), Lyon, France, 115p.
- Sekhri A.N. 2011.** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Mentouri de Constantine, Algérie, 186p.

- Simonetti A.F., Viasus D., Garcia-Vidal D. & Carratala J. 2014.** Management of community-acquired pneumonia in older adults. *Therapeutic Advice of Infectious Disease*, **2**(1): 3-16.
- Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., Cardoso M.J., McMinn P. & Ooi M.H. 2010.** Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infectious Disease*, **10**(11): 778-790.
- Sonké S.J. 2017.** Utilisation de la PCR multiplex comme outil diagnostique dans la pneumopathie aiguë communautaire au Centre Hospitalier Universitaire de Tours. Thèse de Doctorat en médecine, Université François Rabelais, France, 60p.
- Soufi F.Z. & Hafayed H. 2019.** Le profil phénotypique de la résistance aux bêta-lactamines de *Klebsiella pneumoniae* uropathogène isolée à l'hôpital El-Hakim Saâdan de Biskra. Mémoire de Master en Sciences de la nature et de la vie (Microbiologie appliquée), Université de Biskra, Algérie, 70p.
- Souna D. 2011.** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Mémoire de *Magister* en Biologie, Option Biochimie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Algérie, 148p.
- Sy M.G. & Robinson J.L. 2010.** Community-acquired *Moraxella catarrhalis* pneumonia in previously healthy children. *Pediatric Pulmonology*, **45**: 674-678.
- Tali-Maamar H., Laliem R., Bentchouala C., Touati D., Sababou K., Azrou S., Azzam M., Amhis W., Oussadou L., Belouni R., Smati F. & Rahal K. 2012.** Reprint of: Serotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Algeria from 2001 to 2010. *Vaccine*, **30**(6): 25- 31.
- Taoussi N. 2019.** Mycoplasmes et Chlamydiae : sensibilité et résistance aux antibiotiques. Thèse de Doctorat en médecine, Université Mohammed V de Rabat, Maroc, 179p.
- Tapparel L., Petignat P-A. & Praz G. 2010.** Diagnostic de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* chez le patient non VIH. *Revue Medicale de la Suisse*, **6**(266): 1922-1925.
- Tarnagda Z., Yougbare L, Ilboudo A.K., Kagone T., Sanou A.M., Cisse A., Médah I., Yelbéogo D. & Nzussouo N.T. 2014.** Sentinel surveillance of influenza in Burkina Faso: identification of circulating strains during 2010-2012. *Influenza and other respiratory viruses* **8**(5): 524-529.
- Teguar M. 2017.** Incidence des *Staphylococcus aureus* dans les denrées alimentaires. Confirmation des Facteurs de Virulence par PCR. Thèse de Doctorat en médecine vétérinaire, Université Saad Dahleb-Blida 1, Algérie, 59p.

- Thomazelli L.M., Vieira S., Leal A.L., Oliveira D.B., Souza T.S., Golono M.A., Gillio A.E., Stwien K.E., Erdman D.D. & Durigon E.L. 2007.** Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *Journal of Pediatric*, **83**: 422-428.
- Tiecoura B. 2011.** Etude de l'infection à *Haemophilus influenzae* type b en 2008 après l'introduction du vaccin anti *Haemophilus influenzae* type b chez les enfants de 0- 15 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel. Thèse de Doctorat en Médecine, Université de Bamako, Mali, 104p.
- Tissot-Dupont H. 2009.** Climat, environnement et infections respiratoires. *Médecine des Maladies Infectieuses*, **39**: 200-202.
- To K.K.W., Yip C.C.Y. & Yuen K.Y. 2017.-** Rhinovirus - From bench to bedside. *Journal of the Formosan Medical Association*, **116**(7): 496-504.
- Vabret A., Dina J., Cuvillon-Nimal D, Nguyen E., Gouarin S., Petitjean J., Brouard J. & Freymuth F. 2010.** In all cases of respiratory syndrome compatible with influenza virus infection in 2010. *Pathologie- Biologie*, **58**(2): e51-e57.
- Van de Sande-Bruinsma N., Grundmann H., Verloo D., Tiemersma E., Monen J., Goossens H., Ferech M., European Antimicrobial Resistance Surveillance System Group. & European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. 2008.** Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emergency Infectious Disease*, **14**: 1722-1730.
- Verani J.R., McCracken J., Arvelo W., Estevez A., Lopez MR., Reyes L., Moir J.C., Bernart C., Moscoso F., Gray J., Olsen S.J. & Lindblade K.A. 2013.** Surveillance for Hospitalized Acute Respiratory Infection in Guatemala. *PLoS One*, **8**(12): e83600.
- Verboon-Macialek M.A., Krediet T.G., Gerards L.J, De Vries L.S., Groenendaal F. & Van Loon A.M. 2008.** Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **27**(3): 241-245.
- Vu H.T.T., Yoshida L.M., Suzuki M., Nguyen H.A.T., Nguyen C.D.L., Nguyen A.T.T., Yamamoto K.O.T., Watanabe K. & Vu T.D. 2011.** Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *The Pediatric infectious disease journal*, **30**: 11-18.
- Vu Cantero D-L. 2012.** Infections respiratoires virales chez le patient transplanté pulmonaire: Revue et analyse critique des études cliniques, 40p.

- Walser S.M., Gerstner D.G., Brenner B., Holler C., Liebl B. & Herr C.E. 2014.** Assessing the environmental health relevance of cooling towers--a systematic review of legionellosis outbreaks. *International journal of hygiene and environmental health*, **217**(2-3): 145-154.
- Wang Y., Feng Z., Yang Y., Self S., Gao Y., Longini I.M., Wakefield J., Zhang J., Wang L., Chen X., Yao L., Stanaway J.D., Wang Z. & Yang W. 2011.** Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility. *Epidemiology*, **22**(6): 781-792.
- Wansaula Z, Olsen SJ, Casal MG, Golenko C, Erhart LM, Kammerer P. 2016.** Surveillance for severe acute respiratory infections in Southern Arizona, 2010–2014. *Influenza other Respiratory Viruses*, **10**(3): 161-169.
- Welte T. 2012.** Risk factors and severity scores in hospitalized patients with community-acquired pneumonia: prediction of severity and mortality. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, **31**: 33-47.
- Wilson D.A., Yen-Lieberman B., Reischl U., Gordon S.M. & Procop G.W. 2003.** Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the *mip* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(7): 3327-3330.
- Xiao Q., Zheng S., Zhou L., Ren L., Xie X., Deng Y., Tian D., Zhao Y., Fu Z., Li T., Huang A., Liu E. 2015.** Impact of human rhinovirus types and viral load on the severity of illness in hospitalized children with lower respiratory tract infections. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **34**(11): 1187-1192.
- Yang S., Lin S., Khalil A., Gaydos C., Nuemberger E., Juan G., Hardick J., Bartlett J.G., Auwaerter P.G. & Rothman R.E. 2015.** Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(7): 3221-3226.
- Yoshida H., Kishi Y., Shiga S. & Hagiwara T. 1998.** Differentiation of Chlamydia Species by Combined Use of Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonuclease Analysis. *Microbiology and Immunology*, **42**(5): 411-414.
- Youssef H. 2014.** Effets respiratoires de la pollution atmosphérique: prise en compte de plusieurs niveaux de pollution. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie-Paris et de l'école des Hautes Etudes en santé publique, Paris VI, 237p.
- Zar H.J. & Polack F.P. 2015.** Childhood pneumonia: the role of viruses. *Thorax*, **70**(9): 811-812.

Zegmout A., Balkhi H., Souhi H., El Ouazzani H., Rhorfi A. & Abid A. 2016. Pneumopathies nosocomiales en réanimation: caractéristiques cliniques, biologiques et bactériologiques. *Revue des Maladies Respiratoires*, **34**: 198.

Ziraoui O. 2016. Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* (ancien *Pneumocystis Carnii*). Thèse de Doctorat en pharmacie, Université Mohammed V-Rabat, Maroc, 136p.

ANNEXES

Annexe 1 : Les différentes composantes de l'automate MagNa Pure Compact

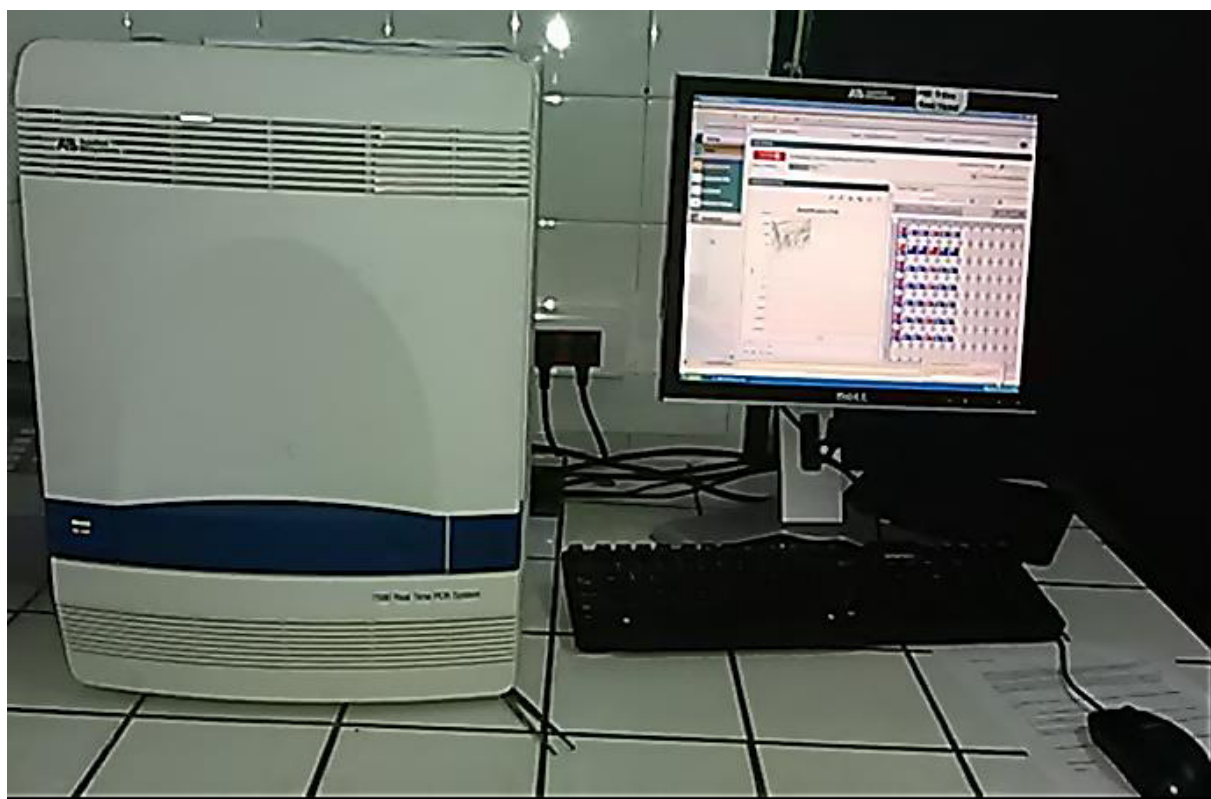


Automate d'extraction MagNa pure Compact (Roche)



Cartouche de réactif

Annexe 2 : Thermocycler ABI 7500 Fast PCR temps réel



Annexe 3 : Formulaire du consentement éclairé

Formulaire de Consentement Eclairé

Titre de l'étude: « De la microbiologie à la métagénomique: une approche intégrée pour l'identification de pathogènes connus ou émergents responsables d'infections respiratoires aiguës sévères »

Nom du participant: D. R. I **Numéro d'ordre du participant:** Recip 001

Sexe: M..... F..... Femelle

Date de naissance / Age: [] [] 33 ans [] [] 1 années.

Adresse du participant : _____

	Je confirme que : o J'ai lu la notice d'information de l'étude o La Notice d'informations de l'étude m'a été lue. o La notice d'informations de l'étude m'a été traduite dans une langue que je comprends. A la date du <u>09</u> / <u>03</u> / <u>16</u> pour l'étude ci-dessus et j'ai eu l'occasion de poser des questions et requêtes qui ont été répondues avec satisfaction.	X
	J'ai été informé du contenu (objectifs, procédures, risques, avantages) de l'étude	X
	Je suis au courant que ma participation est volontaire	X
	Je sais que les informations que je donnerai seront traitées confidentiellement.	X
	Je sais qu'à tout moment je peux décider de refuser de répondre à toutes ou une partie des questions ou de me retirer de l'étude, cela sera sans aucune conséquence néfaste pour moi ni ma famille	X
	Je suis informé que l'investigateur peut m'exclure de l'étude	X
	Je sais que je peux poser des questions à tout moment	X
	Je suis d'accord que mes données soient utilisées à but scientifique	X
	Je suis d'accord que mes échantillons soient conservés à la biobanque de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour une utilisation ultérieure dans un but purement scientifique avec le respect de la confidentialité et sous réserve de l'approbation préalable du Comité National d'Ethique de Côte d'Ivoire (CNER)	X
	Je comprends que les membres de l'équipe de recherche, le Comité d'éthique et les autorités régulatrices n'ont pas besoin de ma permission pour accéder à mon dossier médical et de toute	X

	autre recherche pouvant être conduite en rapport avec elle, même si je me retire de ce projet. J'accepte cet accès au dossier. Cependant, je comprends que mon identité ne sera pas révélée dans toutes les informations données à des tierces personnes ou publiées.	X
	J'accepte de ne pas restreindre l'usage des données ou résultats qui proviendront de cette étude pourvue qu'une telle utilisation soit seulement pour un (des) but(s) scientifique (s).	X
	J'accepte de participer à l'étude ci-dessus	X

Signature du Participant ou Parent ou Tuteur : *[Signature]*

Date: [09] [03] [16]

Déclaration de l'Investigateur: J'ai administré le processus de consentement éclairé en expliquant la nature, le but, les risques possibles de l'étude et les informations écrites au participant ou Parent ou Tuteur.

Signature de l'Investigateur:

Nichelt Sopi *JMP*

Date: [09] [03] [16]

Jour Mois Année

Nom de l'Investigateur:

Nichelt Sopi Anne Michèle

Formulaire de Consentement Eclairé

Titre de l'étude: « De la microbiologie à la métagénomique: une approche intégrée pour l'identification de pathogènes connus ou émergents responsables d'infections respiratoires aiguës sévères »

Nom du participant: S.E.F **Numéro d'ordre du participant:** Recip 011

Sexe: M..... F.....

Date de naissance / Age: [] [] [25] [10] [16] [] [] années.

Adresse du participant : _____

Je confirme que :		
o J'ai lu la notice d'information de l'étude		
o La Notice d'informations de l'étude m'a été lue.		
o La notice d'informations de l'étude m'a été traduite dans une langue que je comprends.		
A la date du <u>25</u> / <u>10</u> / <u>16</u> pour l'étude ci-dessus et j'ai eu l'occasion de poser des questions et requêtes qui ont été répondues avec satisfaction.		X
J'ai été informé du contenu (objectifs, procédures, risques, avantages) de l'étude		X
Je suis au courant que ma participation est volontaire		X
Je sais que les informations que je donnerai seront traitées confidentiellement.		X
Je sais qu'à tout moment je peux décider de refuser de répondre à toutes ou une partie des questions ou de me retirer de l'étude, cela sera sans aucune conséquence néfaste pour moi ni ma famille		X
Je suis informé que l'investigateur peut m'exclure de l'étude		X
Je sais que je peux poser des questions à tout moment		X
Je suis d'accord que mes données soient utilisées à but scientifique		X
Je suis d'accord que mes échantillons soient conservés à la biobanque de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire pour une utilisation ultérieure dans un but purement scientifique avec le respect de la confidentialité et sous réserve de l'approbation préalable du Comité National d'Ethique de Côte d'Ivoire (CNER)		X
Je comprends que les membres de l'équipe de recherche, le Comité d'éthique et les autorités régulatrices n'ont pas besoin de ma permission pour accéder à mon dossier médical et de toute		X

	autre recherche pouvant être conduite en rapport avec elle, même si je me retire de ce projet. J'accepte cet accès au dossier. Cependant, je comprends que mon identité ne sera pas révélée dans toutes les informations données à des tierces personnes ou publiées.	X
	J'accepte de ne pas restreindre l'usage des données ou résultats qui proviendront de cette étude pourvue qu'une telle utilisation soit seulement pour un (des) but(s) scientifique (s).	X
	J'accepte de participer à l'étude ci-dessus	X

Signature du Participant ou Parent ou Tuteur :

Date: [25] [10] [16]

Déclaration de l'Investigateur: J'ai administré le processus de consentement éclairé en expliquant la nature, le but, les risques possibles de l'étude et les informations écrites au participant ou Parent ou Tuteur.

Signature de l'Investigateur:

_____ _____

Date: [25] [10] [16]

Jour Mois Année

Nom de l'Investigateur:

N'chott Sopi Anne Michèle _____

Annexe 4 : Approbation du comité Ethique



MINISTÈRE DE LA SANTÉ
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA

COMITÉ NATIONAL D'ÉTHIQUE ET
DE LA RECHERCHE (CNER)

Le Président

N° 031/MSLS/CNER-dkn

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

24/6/15

Kette

Abidjan, le 23 juin 2015

Au
Professeur FAYE-KETTE Hortense

OBJET: Autorisation de mise en œuvre du projet de recherche intitulé « De la microbiologie à la métagénomique approche intégrée pour identification de pathogènes connus ou émergents responsables d'infections respiratoire aigues sévères ».

Professeur,

Au cours de la session du jeudi 04 juin 2015, le Comité National d'Éthique et de la Recherche (CNER) a examiné avec intérêt votre demande d'autorisation de mise en œuvre du projet cité en objet.

Sous cette perspective, il a été émis un avis favorable à l'utilisation de ce protocole.

Par conséquent, je vous autorise à mettre en œuvre votre enquête telle que soumise au Comité National d'Éthique.

Toutefois, il faut noter que la validité de cette autorisation est d'un an (1) à compter de la date de signature.

Par ailleurs, je vous saurai gré de bien vouloir transmettre au CNER une copie du rapport de cette étude dès la fin de sa mise en œuvre.

Je vous prie d'agréer, **Professeur**, l'expression de mes salutations distinguées.

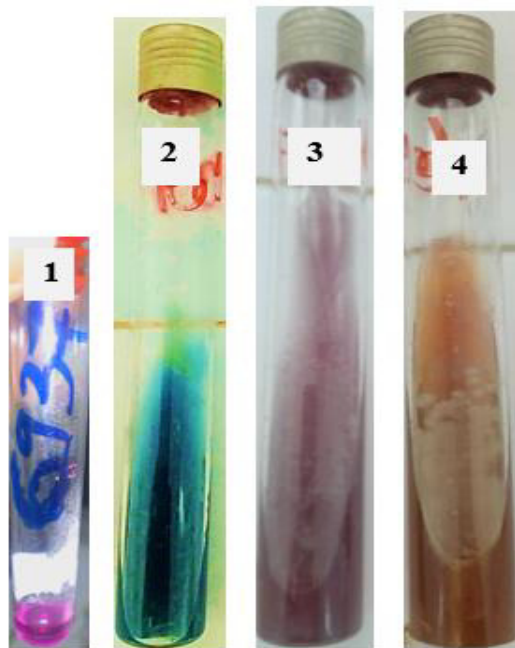
Le Président

Dr Louis PENALI

Annexe 5: Aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu EMB (Photo originale)



Annexe 6 : Photo de la galerie biochimique de *Klebsiella pneumoniae*

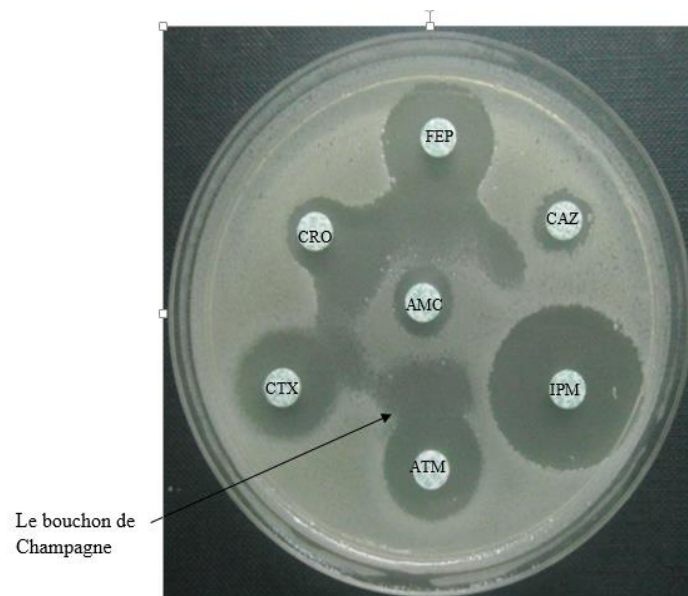


1 : Urée-indole ; 2 : Citrate de Simmons ; 3 : Lysine-Fer ; 4 : Kligler-Hajna

Annexe 7 : Aspect des colonies de *Streptococcus pneumoniae* sur milieu GSF (Photo originale)



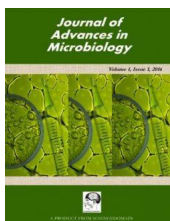
Annexe 8 : Mise en évidence de la production phénotypique de β -lactamases (test de synergie)



ATM : aztréonam ; AMC : amoxicilline/acide clavulanique ; CRO : ceftriaxone ; FEP : céfépime, CTX : cefotaxime, CAZ : ceftazidime ; IPM : imipénème

PUBLICATIONS
SCIENTIFIQUES

PUBLICATION 1



Bacteria Involved in Lower Respiratory Tract Infection in Adult in Côte d'Ivoire, West Africa

S. A. M. S. N'chott^{1,2*}, M. O. Koffi³, T. Kangah-N'goran^{1,4}, A. Sylla¹, K. Horo³, S. Kacou-Ngazona¹, A. Kacou-N'douba⁴, H. Faye-Kette^{1,4} and A. J. Djaman^{1,2}

¹Institut Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI), 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

²Laboratory of Biochemical Pharmacodynamics, UFR Biosciences, Félix Houphouët-Boigny University (UFHB), 01 BP V 34 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

³Pneumophysiology Service of Cocody University Hospital Center, BP V 13 Abidjan, Côte d'Ivoire.

⁴Department of Bacteriology-Virology, UFR of Medical Sciences, Félix Houphouët-Boigny University (UFHB), 01 BP V34 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author HFK designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol and the first draft of the manuscript. Authors MOK and KH investigated the field outbreak and collected samples required for diagnosis and described the disease epidemiology. Authors SAMSN, TKN and AS conducted the laboratory work whereas authors SKN and AKN managed the analyses of the study. Author AJD collected the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JAMB/2018/42687

Editor(s):

(1) Ana Claudia Correia Coelho, Department of Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Portugal.

Reviewers:

(1) Ds Sheriff, Benghazi University, Libya.

(2) Hany Shaarawy, Alex University, Egypt.

(3) Alcibey Alvarado, Internal Medicine and Neumology, Clínica de Diagnóstico Médico. San José, Costa Rica.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/25694>

Original Research Article

Received 26th April 2018

Accepted 6th July 2018

Published 26th July 2018

ABSTRACT

Aims: Performing diagnosis in patients with lower respiratory tract infection is still challenging and is only achieved in half of the cases by conventional methods in Côte d'Ivoire. A few works concerning the etiologies of severe pneumonia were carried out in spite of methods of diagnosis. The present study was conducted to identify and highlight the common causative bacteria of pneumonia by culture method and through the method of multiplex polymerase chain reaction (PCR).

*Corresponding author: E-mail: michelenchott@yahoo.fr;

Study Design: A prospective cohort analysis was conducted for 90 adult African patients hospitalised for acute pneumonia.

Place and Duration of Study: Pneumophtisiology department (PPH) of the University Hospital Center of Cocody (Côte d'Ivoire) and laboratory of Bacteriology- Virology of Pasteur Institut of Côte d'Ivoire, between February 2016 and October 2017.

Methodology: A total of 90 patients (42 men, 48 women, age range 18-77 years) with symptoms of acute lower respiratory infection and diagnosed with pneumonia were included. Only 33 patients fulfilled inclusion criteria and gave the consent to do fibroscopy. Culture and PCR methods were performed to isolate the most common bacteria in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.

Results: Four bacterial isolates were identified in 33 cases (12.1%) in all patients using the culture method. This number increased to 21 (63.6%) with multiplex PCR. The most commonly identified bacteria by PCR were *Streptococcus pneumoniae* (15.1%) and *Haemophilus influenzae* (36.4%). There was a significant increase in PCR method compared to the culture in terms of bacterial detection rate ($P = 0.05$).

Conclusion: Real-time PCR tests were very sensitive and fast. The prevalence of bacteria and multiple agents detected by real-time PCR versus culture was considerably higher.

Keywords: Infection; Lower respiratory tract; bacterial etiology; culture; multiplex PCR.

Definitions, Acronyms, Abbreviations

BAL : Bronchoalveolar lavage fluid

EMB : Eosine Methylene Blue

AMRUGE : Appui à la Modernisation et à la Réforme des Universités et Grandes Ecoles de Côte d'Ivoire

1. INTRODUCTION

Lower respiratory tract infection is a serious health problem that causes a huge burden. They are the major causes of adult consultation and hospitalisation [1] in sub-Saharan Africa [2]. Establishing a rational medical treatment becomes a major challenge. Viruses and bacteria may show similar symptoms, making them difficult to distinguish clinically [3]. While this concept seems to be generally underlay by the viral etiology, in community-acquired pneumonia, bacterial origin prevails and represents 60 to 80% cases [4].

In general, treatment management is clinical, based on empiric antibiotic therapy and targets *Pneumococcus*, the most commonly encountered pathogen [5]. This relegates to the background, typical agents such as *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila*, recognized as responsible in 40% of cases for this pneumonia [6].

Lower respiratory tract infection causes a high rate of morbidity and mortality, but a definitive microbiological diagnosis is often not obtainable by traditional culture or serological methods. Besides, the culture of some bacteria may be

difficult or require more extended periods of time [7], particularly when antibiotics have been administered to the patient before sampling [8]. Molecular techniques such as qPCR can improve diagnostic performance and reduce the identification time of pathogens [9]. It is a fast and accurate tool that does not depend on the microbiological viability of bacteria [10]. The etiological diagnosis of severe acute respiratory infections remains a major health issue in Africa and Côte d'Ivoire.

Therefore, this study was conducted to identify the common causative bacteria of community-acquired pneumonia from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid through culture and polymerase chain reaction methods.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Recruitment and Sampling

This prospective cohort study was conducted between February 2016 and October 2017 in the Pneumophtisiology department (PPH) of the University Hospital Center of Cocody (Côte d'Ivoire). Adult patients (older than 18 years) with one or more symptoms or signs suggestive of pneumonia and radiographic evidence of pneumonia, who gave verbal informed consent were enrolled and included in this study. TB patients and those who refused to do fibroscopy were not included. BAL fluid samples were collected in a sterilized container and immediately sent to the Institut Pasteur of Côte d'Ivoire at the Bacteriology-Virology laboratory for bacteriological analysis and also to the Molecular Biology platform for molecular

analysis. This study was approved by the National Ethics.

2.2 Culture

Bronchoalveolar lavage samples sent to the laboratory were analyzed by direct microscopic examination and Gram stain [11]. After Gram staining, BAL samples were dropped on Eosine Methylene Blue (EMB) agar, Chapman-Mannitol Salt, Columbia agar with 5% fresh sheep blood, gentamicin 5.0 g/mL and Columbia with 5% cooked sheep blood supplemented with polyvitex, to facilitate detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*, respectively. Inoculated media were aerobically incubated at 37°C for 24-48 hours in a CO₂-enriched atmosphere for target bacteria.

Colony identification was performed using morphology (appearance after Gram stain) and biochemical (single enzymatic, catalase and oxidase, metabolic enzyme activities, sugar metabolism) traits [12]. So, *S. pneumoniae* was identified by alpha-haemolytic colony morphology and inhibition by optochin and confirmed by a latex agglutination test. The identification of *H. influenzae* was based on Gram stain, growth on chocolate medium supplemented with vitamin factors, hemin and nicotine adenine nucleotide. Bacteria that did not agglutinate with antisera against *H. influenzae* were considered to be undetectable. *M. catarrhalis* was identified by colony morphology, Gram stain, cytochrome oxidase assay, and butyrate hydrolysis [13]. The identification of *K. pneumoniae* was made on the morphology of the mucous colonies, the growth on Eosine methylene blue medium, an oxidase test followed by a seeding on an API 20E biochemical strip for searching for the use of glucose and maltose [14]. *Staphylococcus aureus* was identified by morphology of golden colonies on Chapman agar using mannitol by the changing to yellow of the agarose color, a catalase and DNAase assay.

2.3 Multiplex PCR Analysis

The bacterial nucleic acid was extracted from 600 µL of each specimen of BAL using the pure MagNa Compact (Roche) according to the manufacturer's instructions. One hundred microliters of DNA was recovered and stored at 4°C for amplification. Multiplex PCR using the "FTD bacterial *pneumonia*_CAP" kit was used to

analyse DNA samples extracted from BAL. Bacteria detection was performed with the ABI Fast® 7500 controller following the manufacturer's instruction. This multiplex kit usually detects seven bacteria that are: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella sp.*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumophila* and *Haemophilus influenzae*.

2.4. Statistical Analysis

Quantitative variables were expressed as mean and standard deviations from the mean and were compared using the Chi 2 test. A p-value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Patient Description

For over a period of one-year, 90 hospitalised adult patients with pneumonia were included in the study. There were 42 men (46.7%) and 48 women (53.3%) constituting a sex ratio of 0.87. The mean age of patients was 40 ± 13.7 years and the age of the study population ranged from 18 to 77 years (Table 1).

3.2 Analysis of Bronchoalveolar Lavage Samples

A total of 33 BAL were cultured and collected from 16 female patients against 17 male. Out of 33 BAL, 4 (12.1%) were considered positive because they contained bacterial colonies against 29 (87.9%) negative (no bacterial colonies). Three (75%) of the 4 positive BAL were from female patients and 1 (25%) from male patients, and no significant ($P = 0.26$) difference (P value <0.05) was observed (Table 2). The isolated bacteria were *K. pneumoniae* (9.1%) and *S. pneumoniae* (3%).

Patients with a negative culture had maximum age of 68 years, a median of 43 years and a minimum value of 18 years. While those, who resulted a positive culture had a maximum value of 59 years, a median of 29 years and a minimum value of 24 years. This figure allowed us to compare the two (2) variables and it showed that there was a difference between the age and the bacteria as found by the culture (Fig. 1).

Table 1. Patients' information

		Numbers	Percentage (%)
Sex	Male	42	46.7
	Female	48	53.3
Age	<29	19	21.1
	30-39	27	30
	40- 49	26	28.9
	50-59	8	8.9
	>60	10	11.1
Antibiotics	Yes	2	6.1
	No	31	93.9
Serology HIV	Yes	65	72.2
	No	25	27.8

Table 2. Bacterial cultures results of bronchoalveolar lavage samples of patients

Patients	Culture		Total
	Negative	Positive	
Female	13 (39.4%)	3 (9.1 %)	16 (48.5%)
Male	16 (48.5%)	1 (3 %)	17 (51.5%)
Total	29 (87.9%)	4 (12.1%)	33 (100%)

*P = 0.26; Chi 2 = 1.28

3.3 Multiplex PCR Analysis

Out of 33 BAL samples, 21 (63.6%) were positive after using multiplex PCR technique. The detected bacterial strains were, three *S. pneumoniae* (14.3%) and nine *Haemophilus influenzae* (42.8%), one *Legionella pneumophila* (4.8%) and one *Moraxella catarrhalis* (4.8%) (Table 3).

Bacterial co-infections were also detected in these BAL samples. There were three cases (14.3%) of *H. influenzae* associated with *S. pneumoniae*, followed by two cases (9.5%) of *H.*

influenzae associated with *M. catarrhalis* and finally one case of *S. pneumoniae* associated with either *S. aureus* or *M. catarrhalis*, respectively (4.8%) (Table 3).

For PCR, the maximum age of patients for undetected bacteria was 69 years, a median of 33 years and a minimum of 21 years. However, detected positive bacteria had a maximum value of 62 years, a median of 42 years and a minimum value of 18 years. This figure allowed us to do a descriptive analysis. A difference between age and the bacteria was found by PCR (Fig. 2).

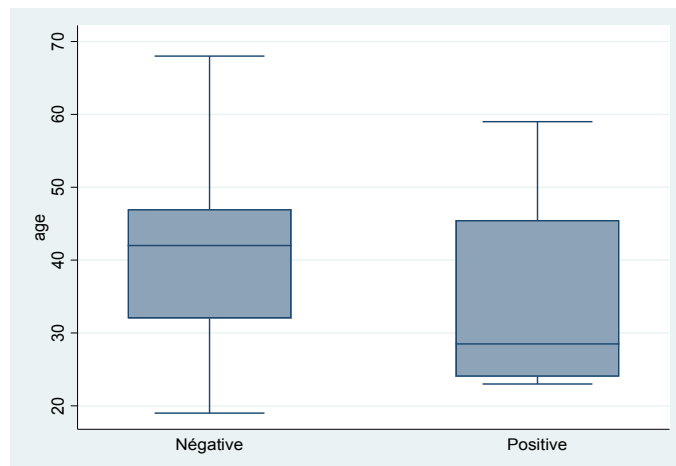


Fig. 1. Age according to the bacteria found by the culture

Table 3. Distribution of bacteria in BAL after multiplex PCR

Type of infection	Names of Bacteria	Numbers (%) N = 21
Mono-infection bacteria	<i>S. pneumoniae</i>	3 (14.3%)
	<i>H. influenzae</i>	9 (42.8%)
	<i>L. pneumophila</i>	1 (4.8%)
	<i>M. catarrhalis</i>	1 (4.8%)
Co-infection bacteria	<i>H. influenzae</i> + <i>S. pneumoniae</i>	3 (14.3%)
	<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	2 (9.5%)
	<i>S. pneumoniae</i> + <i>S. aureus</i>	1 (4.8%)
	<i>S. pneumoniae</i> + <i>M. catarrhalis</i>	1 (4.8%)

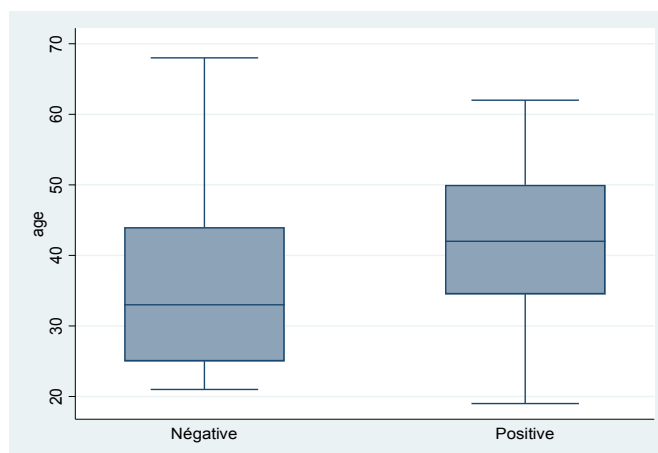


Fig. 2. Age according to bacteria detected by PCR

3.4 Comparison of Culture and PCR Method

The detection rate of the bacterial pathogen was significantly higher in the PCR method compared to the culture method ($P < 0.05$). The sensitivity of the calculated culture method was 15% with a positive predictive value of 75%.

The culture method was able to detect only 2 types of bacteria in only 4 BAL samples from the 33 cultures, while PCR showed several pathogens in 21 patient samples.

Only 3 (9.1%) of the 33 samples were true culture positive and PCR positive against 12 (36.4%) true culture negative and PCR positive (Table 4). One case was positive for culture (*K. pneumoniae*) while negative for PCR. Two cases gave different results for culture and PCR, culture detected *K. pneumoniae* and PCR detected *S. pneumoniae*.

4. DISCUSSION

In the present study, the proportion of men with pneumonia was lower than that of women (47% versus 53%). These results do not agree with data from the literature which showed a predominance of pneumonia in males. Indeed, in a study conducted at the Mohammed V military hospital in Rabat during 2007-2008, the predominance of this condition among men was 82%, compared to 78% in 2010 [15].

In addition, the age group above 60 years was least affected by this disease, as it represented only 11% of pneumonia cases highlighted in this study; unlike the results of the study of Aboukad, [15], who showed that the risk of developing pneumonia was higher in the elderly population. However, results similar to this study were obtained by Kollef, which showed that 10% of pneumonia patients were over 70 years of age, while 40% were in the 20-40 years age groups [16].

Table 4. Comparison of culture method and multiplex PCR

	Result	PCR multiplex		Total
		Negative	Positive	
Bacterial culture	Negative	12 (92.3%)	17 (85%)	29 (87.9%)
	Positive	1 (7.7%)	3 (15%)	4 (12.1%)
	Total	13 (100%)	20 (100%)	33 (100%)

*P = 0.53; Chi 2 = 0.39

With respect to the biological samples, 4 BAL positive of the 33 put in culture, made it possible to isolate *Klebsiella pneumoniae* (9%) and *Streptococcus pneumoniae* (3%). The study conducted by Ze et al. in Yaoundé showed that *Pneumococcal pneumonia* and *Klebsiella pneumonia* were the most common (81%) [17]. In addition, *Klebsiella pneumoniae* was found to be the most common bacterial pathogen leading to hospitalisation in medical intensive care unit in Singapore [18]. However, the low detection rate of *Streptococcus pneumoniae* could be due to the fact that *Streptococcus pneumoniae* is a fragile bacterium and the culture methods take time with relatively low sensitivity, especially, when antibiotics have been administered to the patient before sampling [8]. Also, early and accurate diagnosis of *Pneumococcal pneumonia* in health care settings remains difficult due to the limitations of conventional diagnostic methods [10]. In addition, the bacteriological profile of community-acquired pneumonia varies from country to country and changes over time in the same country, probably due to the frequent use of antibiotics, environmental pollution, public enlightenment about the disease and life expectancy. For example, *Streptococcus pneumoniae* remains the most common causative pathogen, although the incidence of this organism varies widely [19].

Twenty-nine (87.9%) of the 33 BAL showed no bacterial growth after seeding in the culture medium. These negative results of the cultures could be either due to the antibiotic treatment before the samples were collected, or due to an infection by other etiological agents such as the viruses, and the bacteria like *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*, which were not detected in laboratories routine analysis [20].

Of the 33 BAL samples tested, frequently detected bacteria by multiplex PCR were *Haemophilus influenzae* (36%) and *Streptococcus pneumoniae* (15%). These results are in agreement with those of File [21] and Lode [19] who found in their study that *Streptococcus*

pneumoniae and *Haemophilus influenzae* are the main causes of community-acquired pneumonia [19,21]. In addition, Abdeldaim et al. worked on BAL samples from 156 patients with acute lower respiratory infection, and reported that the pathogen detection rate increased from 13% to 35% in *Streptococcus pneumoniae* and from 20% to 46% in *Haemophilus influenzae* [9].

In fact, these germs are the responsible agents for bacterial meningitis and represent a major public health problem in developing countries where vaccination coverage is still low [22]. The last 20 years have been marked by the emergence, then the spread-out in many countries due to resistance and often multi-resistance to antibiotics, and two main pathogenic species are involved in community-acquired respiratory tract infections namely *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* [23].

The co-infections by *H. influenzae* + *S. pneumoniae*, *H. influenzae* + *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* + *S. aureus* and *S. pneumoniae* + *M. catarrhalis* were found in the proportions of 9%, 6%, 3%, and 3%, respectively. The presence of co-infections could be explained due to the HIV positive status for these patients. In community-acquired pneumonia in immunocompromised patients, all the usual bacteria may be involved knowing that clinical-radio profile may be extremely atypical [24].

The high rate of bacterial detection by PCR (63.6%) could be explained by the fact that the PCR is based on the detection of genetic material (DNA or RNA) and does not require the survival of the microorganism and therefore is not affected by previous use of antibiotics. In addition, PCR is more sensitive in the detection of multiple microorganisms and provides quick results [25]. Indeed, the sensitivity of the culture was calculated at 15% and the specificity of 92%. The positive predictive value was 75% and the negative predictive value was 41%. This could be explained by the requirement of the different culture medium for different bacteria and

because of different varieties of microorganisms and also by the inhibition of the growth of multiple species of bacteria due to the selectivity of culture positive conditions [11]. However, there was only one case of culture positive (*Klebsiella pneumoniae*), in which PCR detected no pathogens and two samples where both culture and PCR methods detected different pathogens (two *Klebsiella pneumoniae* with the culture gave *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*). This could be explained by the use of the bacterial pneumonia-CAP kit which detects seven bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*). *Klebsiella pneumoniae* is not included in the multiplex kit for the detection of respiratory pathogens. The multiplex kit used in this study detected atypical bacteria such as *L. pneumophila*. However, it was impossible to identify these pathogens with culture methods. Therefore, there are difficulties in the common practice of culture used in the diagnosis of atypical pathogens because the bacteria develop slowly (3-6 weeks). PCR methods have been proved to be highly sensitive and specific in the simultaneous and rapid detection of these atypical slow-growing and tough bacteria.

5. CONCLUSION

Traditional culture methods and phenotypic identification of bacteria are not always adequate for detecting pathogens in the lower respiratory tract. In this study, the multiplex PCR was found to be reliable because it allowed the detection of multiple pathogens of which 5 out of 8 bacteria were responsible for pneumonia. It also provided rapid identification of bacteria and etiologic agents of infection in the BAL samples collected. However, limitation in both bacterial culture of BAL samples and PCR-multiplex kits (*Klebsiella pneumoniae*, not included in the kit) for detection of pathogens involved in lower respiratory tract infections was observed. Therefore, an enormous need for new diagnostic tools, such as metagenomics, a method that will make it possible to study all the genomes of the populations of microorganisms present in the BAL samples collected, is required, because it is based on high throughput sequencing.

CONSENT

Patients were informed about this study and verbal consents were received from them.

ETHICAL APPROVAL

This study has been approved by the National Ethics Committee, N°31/MSLS/CNER-dkn in accordance with the ethical principles of the Helsinki Declaration.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Macfarlane J, Holmes W, Gard P, Macfarlane R, Rose D, Weston V, Leinonen M, et al. Prospective study of the incidence, aetiology and outcome of adult lower respiratory tract illness in the community. *Thorax*. 2001;56(2):109-14.
2. Scott JA, Hall AJ, Muyodi C, Lowe B, Ross M, Chohan B, et al. Aetiology, outcome, and risk factors for mortality among adults with acute pneumonia in Kenya. *Lancet*. 2000;355(9211):1225-230.
3. Edin A, Granholm S, Koskiniemi S, Allard A, Sjöstedt A, Johansson A. Development and laboratory evaluation of a real-time PCR assay for detecting viruses and bacteria of relevance for community-acquired pneumonia. *J Mol Diagn*. 2015;17: 315-24. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.01.005
4. Mayaud C, Parrot A, Houacine S, Denis M, Akoun G. Epidémiologie des germes responsables des pneumopathies communautaires. *Rev. Pneumol. Clin*. 1992;48:101-10.
5. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Leven M, Ortqvist A, et al. Guidelines for management of adult community acquired lower respiratory tract infections. *Eur. Respir. J*. 2005;26:1138-180. DOI: 10.1183/09031936.05.00055705
6. Marrie TJ, Peeling RW, Fine MJ, Singer DE, Coley CM, Kapoor WN. Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: The frequency of atypical agents and clinical cause. *Am. J. Med*. 1996;101:508-15.
7. Chan YR, Morris A. Molecular diagnostic methods in pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(2):157-64. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32808255f1
8. Dalhoff K, Braun J, Hollandt H, Lipp R, Wiessmann KJ, Marre R. Diagnostic value

- of bronchoalveolar lavage in patients with opportunistic and non-opportunistic bacterial pneumonia. *Infection*. 1993;21: 291-96.
9. Abdeldaim GM, Strålin K, Korsgaard J, Blomberg J, Welinder-Olsson C, Herrmann B. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *BMC Microbiol*. 2010;10:310.
DOI: 10.1186/1471-2180-10-310
 10. Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G, et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7): 3221-226.
DOI: 10.1128/JCM.43.7.3221-3226.2005
 11. Aydemir O, Aydemir Y, Azdemir M. The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Pak J Med Sci*. 2014;(30)5: 1011-1016.
 12. Wilhelm N, Le Coustumier A, Fevrier F, Le Flèche A, Grasmick C, Grimon P. Bactéries d'identification difficile ou non cultivables en routine : Quelles solutions ? Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine. *Spectra Biol*. 2005;145:49-4.
 13. Lieberman D, Shimoni A, Shleyfer E, Castel H, Terry A, Harman-Boehm I, et al. Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling for Isolation of Potential Respiratory Pathogens in Adults. *J Clin Microbiol*. 2006; 525-28.
DOI: 10.1128/JCM.44.2.525-528.2006
 14. Djeungoue TSJ. Epidémiologie de la méningite bactérienne au mali en 2007. Thèse de Doctorat en Médecine, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Université de Bamako, Mali. 2008;87.
 15. Aboukad N. Pneumopathies nosocomiales d'origine bactérienne en réanimation à propos de 474 PDP (2007-2008). Pharmacie. HMIMV, thèse n° 08. 2008; 53(2).
 16. Kollef MH. The prevention of ventilator associated pneumonia. *N. Engl J. Med*. 1999;340:627-34.
 17. Ze AE, Tafeukeng DN, Vouking M. Étiologies des Pneumopathies Bactériennes non Tuberculeuses en Milieu Pneumologique à Yaoundé. *Health Sci. Dis*. 2013;14(3):1-4.
 18. Lee KH, Hui KP, Tan WC, Lim TK. Severe community-acquired pneumonia in Singapore. *Singapore Med J*. 1996;37(4): 374-77.
 19. Lode HM. Managing community-acquired pneumonia: A European perspective. *Respir Med*. 2007;101:1864-873.
DOI: 10.1016/j.rmed.2007.04.008
 20. Akter S, Shamsuzzaman SM, Jahan F. Community acquired bacterial pneumonia: Aetiology, laboratory detection and antibiotic susceptibility pattern. *Malaysian J Pathol*. 2014;36(2):97-03.
 21. File TM. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2003;362:1991-001.
 22. Haidara TM. Etude cyto bactériologique du LCR à Bamako: 1415 cas. Thèse de médecine, Université de Bamako. 2003;70.
 23. Varon E, Houssaye S. Résistance des agents infectieux impliqués dans les infections des voies respiratoires basses en France. *Med Mal Infect*. 2006;36:555-69.
 24. Ernst A, Gordon F, Hayek J, Silvestri R, Koziel H. Lung abscess complicating *Legionella micdadei* pneumonia in an adult liver transplant recipient: Case report and review. *Transplantation*. 1998;65:130-34.
 25. Murdoch DR. Impact of rapid microbiological testing on the management of lower respiratory tract infection. *Clin Infect Dis*. 2005;41(10):1445-447.

© 2018 N'chott et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history/25694>

PUBLICATION 2



Viral Aetiology of Severe Acute Respiratory Infections in Hospitalised Adult Patients in Abidjan, Côte d'Ivoire

**Sandrine Michele Anne Sopi N'chott^{1,2*}, Herve Kadjo¹, Alima Koné³,
Marius Adagba N'tapke¹, Klinignan Horo^{2,3}, Adele Kacou-N'douba²,
Joseph Alico Djaman^{1,2} and Hortense Faye-Kette^{1,2}**

¹Institut Pasteur of Côte d'Ivoire (IPCI), 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

²Felix Houphouët-Boigny University (FHBU), 01 BP V34 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

³Department of Pneumophtisiology, University Hospital Center (UHC) of Cocody, BP V13 Abidjan, Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author JAD designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol and the first draft of the manuscript. Authors AK and HK investigated the field outbreak and collected samples required for diagnosis and described the disease epidemiology. Authors SMASN and MAN conducted the laboratory work. Authors HK and AKN managed the analyses of the study. Author HFK collected the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/MRJI/2019/v28i430140

Editor(s):

(1) Dr. Ana Claudia Correia Coelho, Department of Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Portugal.

Reviewers:

(1) Nain Taara Bukhari, Agha Khan University Hospital, Kenya.

(2) John Shindang, University of Jos, Nigeria.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticle3.com/review-history/50385>

Original Research Article

**Received 15 May 2019
Accepted 30 July 2019
Published 06 August 2019**

ABSTRACT

Aims: Pneumonia is a leading cause of morbidity and a significant cause of mortality worldwide. Although information is available on pneumonia in children, the incidence in adults in many parts of Africa including Côte d'Ivoire is unknown. Knowledge of local etiologic agents of pneumonia is critical for making reasonable decisions about treatment as differences in etiology may result in poor response to therapy chosen to cover common pathogenic microbes in studies done in high countries of income.

*Corresponding author: E-mail: michelenchott@yahoo.fr;

The objective of this study was to identify the viral etiology of pneumonia in adult patients with pneumonia in Abidjan, Côte d'Ivoire.

Study Design: This is a prospective experimental study conducted on the basis of the successive recruitment of patients admitted to hospital for severe pulmonary interstitial pneumonitis confirmed by radio or CT scan of the thorax.

Place and Duration of Study: Pneumophtisiology department (PPH) of the University Hospital Center of Cocody (Côte d'Ivoire) and laboratory of Bacteriology- Virology of Pasteur Institut of Côte d'Ivoire, between February 2016 and October 2017.

Methodology: Among all admitted patients in the unit of pneumophtisiology (PPH) of the hospital University, 90 patients aged at least 18 years were pre-included. A total of 33 bronchoalveolar lavage fluid (BAL) samples from adults suspected of pneumonia were analyzed. The viruses were identified by the real-time multiplex reverse polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Of the 33 BAL samples tested, 18.2% (6/33) viral agents were detected. Parainfluenza-3 PV-3 was the most prevalent virus (57.1%, 4/7), followed by coronavirus OC43 (14.3%, 1/7), coronavirus HKUI (14.3%, 1/7).) and human rhinovirus (14.3%, 1/7).

A virus and virus association was detected, which was PV-3 associated with coronavirus HKUI (14.3%, 1/7).

Conclusion: The viral etiology of pneumonia is not very frequent in Côte d'Ivoire.

Keywords: Pneumonia; respiratory viruses; adults; real-time multiplex PCR.

ABBREVIATIONS

ARI : Acute respiratory infections.

BAL : Bronchoalveolar lavage fluid.

1. INTRODUCTION

Acute respiratory infections (ARI) are very common ubiquitous conditions, affecting both adults and children [1]. The infectious etiologies are extremely varied. Among them, bacteria and viruses are most frequent cause of infection, viruses are responsible for most severe form of infection [1]. Thus, viral respiratory infections are a significant aspect of bronchopulmonary infections [1]. Pneumonia is the most severe form of all lower respiratory tract infection [2]. It is a common infectious disease with an estimated incidence of 2 to 11 cases per 1,000 adults in developed countries and a mortality rate of 2% to 14% [3,4]. There is a dearth of information on the prevalence of respiratory tract infection caused by viruses as they draw attention only when there is a flare up of infection. However, viruses have been reported to be responsible for 15-40% of RTI [5]. In addition, frequency of viral infection decreases in healthy adults but increases significantly in the elderly [6].

Of the 13-50% of diagnosed cases of community-acquired pneumonia, viruses have been reported as the second most frequently isolated cause [7].

In addition, the causative agents are in most cases of the viral type with among them:

influenza and para-influenza viruses, respiratory syncytial virus, rhinoviruses, coronaviruses, and adenoviruses [8].

Since molecular biology methods have complemented conventional methods such as viral culture and immunoassays; the diagnosis of viral respiratory infections has not only increased in sensitivity, specificity and rapidity but has also made it possible to detect new virus subtypes [9].

Viral diagnostic methods have evolved significantly with the advent of molecular biology techniques and more specifically so-called "multiplex" molecular tests for the simultaneous detection of a large number of infectious agents [1]. Indeed, various techniques derived from the PCR (Polymerase Chain Reaction) have many advantages: the real-time PCR or RT-PCR ("reverse transcription polymerase chain reaction") allows not only specific but also quantitative detection of viral nucleic acids (DNA or RNA) and multiple techniques can co-detect several different viruses in a single reaction in the presence of signs of respiratory infection [9]. This method is therefore ideal for the rapid detection of a viral origin with panels that can include up to more than 12 different viruses and to identify viral co-infections and study their clinical impact [9].

The purpose of this study is to determine infections of viral origins associated with pneumonia in adult patients hospitalized at the University Hospital Center of Cocody Abidjan, Côte d'Ivoire.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Description of the Study

This is a prospective experimental study conducted on the basis of the successive recruitment of patients admitted to hospital for severe pulmonary interstitial pneumonitis confirmed by radio or CT scan of the thorax, between February 2016 and October 2017. Among all admitted patients in the unit of pneumophthysiology (PPH) of the hospital University, 90 patients aged at least 18 years were pre-included. The analysed samples were composed of blood, serum, sputum of patients suspected of having pneumonia. After this biological assessment (Tuberculosis, serology HIV, glycemic, creatinin, transaminase, CRP), 57 patients were excluded at a rate of 63.3% (Fig. 1). Inclusion criteria are inpatients, of both sexes, aged 18 years and older with severe febrile alveolo-interstitial pneumonitis confirmed by standard chest radiograph and the negativity of tuberculosis bacilli sputum. The exclusion criteria were the patients detected tuberculous and those refusing to do fibroscopy.

Only 33 (36.7%) patients were included and underwent fibroscopy to obtain bronchoalveolar lavage fluid (BAL). BAL was performed during fibroscopy by instillation and aspiration of saline into the nasal cavity in sub segmental bronchi. Thirty three LBAs samples were collected in a sterile disposable container and sent to the Bacteriology-Virology laboratory in transport containers containing cold accumulators, within one hour for virus detection.

2.2 Extraction of RNA and DNA

Bronchoalveolar lavage samples were placed in Eppendorf tubes after specimens collection. Thus, total viral nucleic acids (DNA or RNA) were extracted from 140 µL of each clinical sample of BAL using the QIAamp® viral RNA mini kit, QIAGEN for the extraction of RNA viruses and the QIAamp® DNA mini kit, QIAGEN for that of viruses. The DNA / RNA was eluted with 60 µL of AVE elution buffer supplied with the kit and stored at -80°C until use.

2.3 Amplification and Molecular Detection of Viruses by Real-time Multiplex PCR

Samples were analysed using the Super script®III platinum® One-step qRT-PCR system

detection kit (Van Allen Way Carlsbad CA 92008, USA) for simultaneous detection of respiratory viruses. Two DNA viruses (Adenovirus and Bocavirus) and 14 RNA viruses were amplified and detected using a real-time thermal cycler: ABI® 7500 FAST. This kit uses a 5-tube multiplex PCR technique for the simultaneous detection and identification of viruses. The primers and probes used were recorded in Table 1.

For viruses with RNA, the amplification conditions consisted of a step of reverse transcription of the RNA into DNA for 30 min at 50°C followed by an initial denaturation and activation step the Taq polymerase for 2 min at 95°C. A second step of the amplification was performed in the same conditions by 45 denaturation cycles at 95°C for 15 s, hybridization at 55°C for 30 s and extension at 55°C for 30 s. Finally, a terminal extension at 4°C for 10 min.

For viruses with ADN, the amplification conditions consisted of a step of pre-activation of the enzyme for 2 min at 50°C, followed by an initial denaturation and activation step the Taq polymerase for 10 min at 95°C. A second step of the amplification was performed in the same conditions by 45 denaturation cycles at 95°C for 15 s, hybridization at 60°C for 1 min and extension at 60°C for 1 min.

2.4 Statistical Analysis

Data entry and description were performed using Epi-info software version 7.2.0.1. These data were then transcribed into an Excel database making their analysis easier. Statistical tests were interpreted at the significance level corresponding to an alpha risk of 5%. Statistical analyzes were analyzed using the STATA version 15.0 software. Thus, the quantitative variables were expressed as mean and standard deviations of the mean, and the qualitative variables as numbers and percentages. The Chi2 statistical test was used for proportion comparisons with a significance threshold *P* of 0.05.

3. RESULTS

3.1 Age Distribution by Gender

The age of patients ranges from 19 to 68 years, with an average of 39.6 years. The incidence of

pneumonia according to the age of the patients is as follows: 19-30 years (27.3%, 9/33), 30-40 years (48.5%, 16/33), 40-50 years (6.1%, 2/33) and over 50 years (18.1%, 6/33) Table 2.

3.2 Patient Distribution by Gender

Based on inclusion criteria, 33/90 patients continued the study. Of the 33 patients suspected of having pneumonia, our series included 16 women or 48.5% of cases and 17 men or 51.5% of cases. The sex ratio H / F was 1.1.

3.3 Period of Recruitment of Patients According to the Seasons

The breakdown of patients included according to the season is as follows: from March to June (45.5%, 15/33) followed by the season from November to February (24.2%, 8/33), then from September to October (24.2%, 8/33) and finally the season from July to August (6.1%, 2/33) Fig. 2.

3.4 Detection and Identification of Respiratory Viruses by Real-time Multiplex PCR

Detection of respiratory viruses from a total of 33 BAL samples resulted in 7 positive cases (21.2%) and 26 negative cases (78.8%). Real-time PCR performed on 33 BAL samples revealed the presence of the following viruses: coronavirus OC43 (14.3%, 1/7), parainfluenza-3 PV-3 (42.9%, 3/7), rhinovirus human (14.3%, 1/7). A viral coinfection has also been demonstrated in these BAL samples. Parainfluenza-3 (PV-3) was associated with coronavirus HKUI (14.3%, 1/7). The most incriminated virus in this study was the parainfluenza-3 virus (57.1%, 4/7).

3.5 Distribution of Viruses According to Age

Seven viruses were detected in this study. In patients aged between 19-30 years, a total of 3 isolates including 2 types of virus (42.8%, 3/7) were identified. These included the following viruses: parainfluenza-3 PV-3 (28.6%, 2/7) and coronavirus OC43 (14.3%, 1/7); in patients aged between 30-40 years, 2 viruses (28.6%, 2/7), parainfluenza-3 PV-3 (14.3%, 1/7), and viral infection parainfluenza-3 (PV-3) associated with coronavirus HKUI (14.3%, 1/7), in those having

40-50 years, rhinovirus was found (14.3%, 1/7) and finally it has not been detected in adults over the age of 50 with no virus (Fig. 3).

There is no significant difference between age and virus detection because the calculated probability is higher ($P = 0.136 > P = 0.05$).

3.6 Classification of Viruses by Sex

Of the seven viruses, two men were detected positive for viruses: 1 coinfection Parainfluenza-3 (PV-3) + Coronavirus HKUI and 1 Parainfluenza-3 (PV-3). These two men are 40 years old and 27 years old.

Four women were detected positive for the following viruses: 1 Coronavirus OC43, 2 Parainfluenza-3 (PV-3) and 1 human Rhinovirus. These women were aged 24, 30, 33 and 42 years old Fig. 4.

3.7 Virus Detection According to the Seasons

In this study, the distribution of viruses according to the seasons revealed the following results: the season of March-June PV-3 (28.6%, 2/7), coronavirus OC43 (14.3%, 1/7), PV-3 + HKUI (14.3%, 1/7); the July-August season: no virus detected (0%, 0/7); the September-October: human rhinovirus season (14.3%, 1/7) and November-February PV-3 (14.3%, 1/7) (Fig. 5). Viral detection has seen a peak in the March-June season.

The age distribution of patients detected positive for respiratory viruses was very different between the four seasons. During the March-June season, most of the patients affected were young adults aged 19-30 (PV-3, 28.6%, OC43, 14.3%). In the March-June period, patients aged 30-40 years (PV-3 + HKUI, 14.3%) as well in the period of September-October and November-February, patients aged 40-50 years (rhinovirus, 14.3%) and people aged 30-40 (PV-3, 14.3%) were very little affected respectively.

4. DISCUSSION

The objective of this study was to determine the viral etiology of pneumonia in Côte d'Ivoire particularly in Abidjan. During the study period (2016-2017), we included patients whose age was greater than or equal to 18 years. Thus, the age between 30-40 years was strongly represented with a rate of 48.5%. This result is contrary to that obtained in the Taqarort study in

which the study population aged 30-39 was the least represented with a rate of 9.8% [10]. The age group over 50 represents 18.1% of our study. This rate is close to that published by Taqarort which is 17.1%. This may be due to the fact that age is a risk factor that is independent of the occurrence of pneumonia [10] and that the frequency of hospitalization for severe pneumonia also increases with age, as well as mortality [11] Table 2.

Moreover in our series, the study showed that 51.5% of men were the most involved in the occurrence of viral pneumonia than women (48.5%). Our results are in agreement with those of the literature which observes a male predominance in other studies, with varying proportions [12]. This could be explained by the fact that risk factors for pneumonia such as smoking and alcoholism are found in men. This male predominance was also observed in the other studies, with varying proportions. Our results are similar to those of Barouhiel [13] who found men proportions of 52% and women 48%. Our results are also consistent with those of Horo et al. [14] who found that male dominance is the rule in community-acquired pneumonia [14,15]. In addition, the determination of the rate of patients recruited for pneumonia in this study revealed a high rate in the month of March to June which amounted to 45,5%. This rate is higher than previous studies reporting that

pneumonia occurred mainly in winter and then in autumn with a rate of 39% [16].

This result could be explained by the fact that in Côte d'Ivoire we have four (4) seasons: a big rainy season from March to June, a short dry season from July to August, a short rainy season from September to October and finally a long dry season from November to February [17]. The high number of patients recruited this season could be due to the fact that during the months of March to June we are in the rainy season and it is very cold. According to the literature, pneumonia can be observed throughout the year with maximum frequency in winter because cold seasons are conducive to respiratory infections [10] Fig. 2. Also, the distribution of viruses according to the age groups according to our study made it possible to detect that the majority of our patients are located in the slice between 30-40 years with a rate of 48,5%. In the series of Bouaiti, most of his patients were over 60 years old. Our results are different from those of the Bouaiti study, which detected a low rate of 10.3% in the 30-40 age group [18]. This could be explained in part by the phenomenon of demographic aging, which is becoming more evident in our country than in previous years. Also, this can be explained by the fact that in developing countries like Côte d'Ivoire, the age of predilection of this pathology is between 20 and 49 years old with an average age ranging from

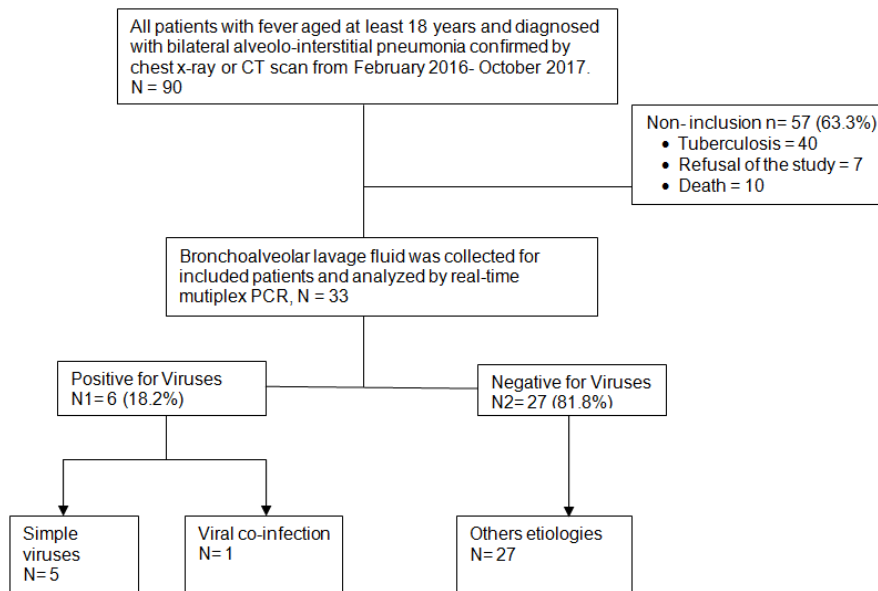


Fig. 1. Recruitment chart of adult pneumonia patients and detection of viral etiology by real-time multiplex PCR

Table 1. Primers and probes used for the detection of respiratory viruses

Multiplex	Viruses	Sequence (5'- 3')
1	PIV-1	Fwd: GTTGTC AATGTCTTAATTCGTATCAATAATT Rev: GTAGCCTMCCTTCGGCACCTAA Pr: (FAM)-TAGGCCAAAGATTGTTGTGCGAGACTATTCCAA-(TAMRA)
	PIV-2	Fwd: GCATTTCCAATCTTCAGGACTATGA Rev: ACCTCCTGGTATAGCAGTGAAGTGAAC Pr: (CY5)-CCATTTACCTAAGTGATGGAATCAATCGCAAA-(BHQ-2)
	PIV-3	Fwd: TGATGAAAGATCAGATTATGCATATC Rev: CCGCGACACCCAGTTGTG Pr: (ROX)-TGGACCAGGGATATACTACAAAGGCCAAAAT-(BHQ-2)
2	COV-OC43	Fwd : CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT Rev : CCTTCCTGAGCCTTAATATAGTAACC Pr : (ROX)-TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT-(BHQ-2)
	HRV	Fwd : AGTCCTCCGGCCCTGAAT Rev : ACACGGACACCCAAAGTAGT Pr : (CY5)-TGAGCAATTGTGGATGGGA-(BHQ-2)
	FLUB	Fwd : AAATACGGTGGATTAATAAAAAGCAA Rev : CCAGCAATAGCTCCGAAGCAA Pr : (JOE)-CACCCATATTGGGCAATTTCTATGGC-(BHQ-1)
3	HMPV	Fwd : ATGTCTCTTCAAGGGATTCACCT Rev : AMAGYGTATTTCTTGTGCAATGATGA Pr : (JOE)-CATGCTATATTAAGAGTCTCARTAC-(BHQ-1)
	VRS	Fwd : GCAAATATGCAAACATACGTGAACA Rev : GCACCCATATTGTWAGTGATGCA Pr : (ROX)-CTTCACGAAGGCTCCACATACACAGCWG-(BHQ-2)
	FLUA	Fwd : CTTCTAACCGAGGTCGAAACG Rev : AGGGCATTGTTGGACAAAACGCTCTA Pr : (FAM)-CCTCAAAGCCGAGATCGCGCA-(BHQ-1)
4	COV-229E	Fwd : CAGTCAAATGGGCTGATGCA Rev : AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTCT Pr : (FAM)-CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA-(TAMRA)
	COV-HKUI	Fwd : CCTTGCGAATGAATGTGCT Rev : TTGCATCACCCTGCTAGTACCAC Pr : (CY5)-TGTGTGGCGGTTGCTATTATGTTAAGCCTG-(BHQ-2)
	COV-NL63	Fwd : ACCTAATAAGCCTCTTTCTCAACCC Rev : GACCAAAGCACTGAATAACATTTTCC Pr : (JOE)-AACACGATTCCAACGAGGTTTCTTCAACTGAG-(BHQ-1)
5	ADV	Fwd : GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT Rev : GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC Pr : (FAM)-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-(TAMRA)
	BOV	Fwd : GCACAGCCACGTGACGAA Rev : TGGACTCCCTTTTCTTTGTAGGA Pr : (JOE)-TGAGCTCAGGGAATATGAAAGACAAGCATCG-(BHQ-1)

Table 2. Distribution of pneumonia cases by age

Age (year)	n	%
19- 30	9	27,3
30- 40	16	48,5
40- 50	2	6,1
>50	6	18,1
Total	33	100

35.12 to 42.05 years old [19,14]. Certainly the large population at a very young age, the precarious living conditions and the HIV infection are the factors that explain this observation [20]. On the other hand, our results are similar to those of Dhaimi whose studied population was younger [21]. Also, the oldest patients (> 50 years) in our study are less represented with a rate of 18.1%. This result is approximately similar to other studies in which 60-69 year olds were

reached at a rate of 17.1% [10] and 15% according to the Dhaimi study, [21] Fig. 3.

The study showed that the detection rate of viruses in women is higher (4/7, 57.1%) than men (3/7, 42.9%). This results are different to those of Barouhiel [13] who found men proportions of 52% and women 48% Fig. 4.

This study revealed a viral etiology in 7 cases (21.2%) of 33 pneumonia patients. These results approximate those of other studies in which viral infection rates in pneumonia patients increased from 23-56% [22,23,24]. This difference would

probably be due to the different methods chosen and the distinctions of different regions and populations. So this difference could be explained by the difference in climate and season in the countries where the studies would be conducted. In tropical environments, the incidence is highest during the rainy season. Indeed, the incidence of infections varies with the season; the frequency is higher in winter and spring [25]. Viral detection showed a peak in the March-June season (28.6%) because the season from March to June is a cold period Fig. 5.

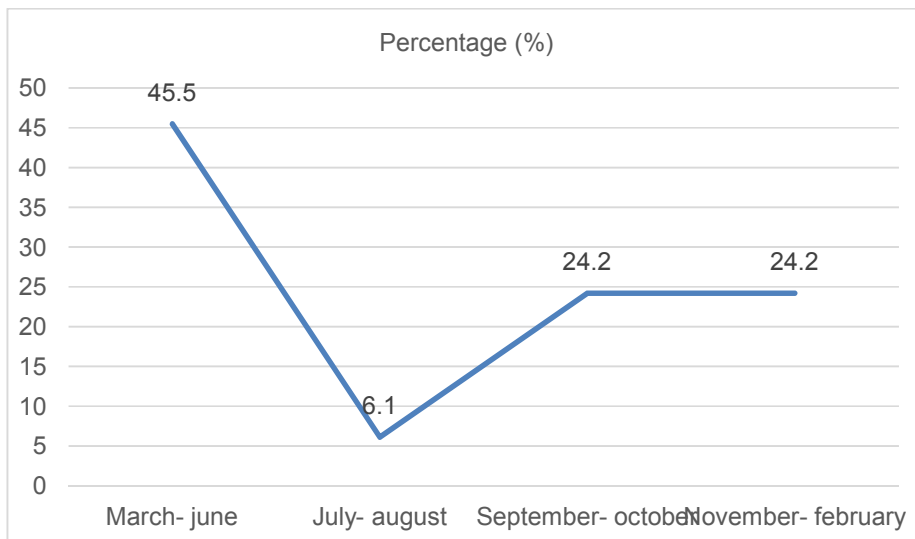


Fig. 2. Recruitment of patient according to the seasons

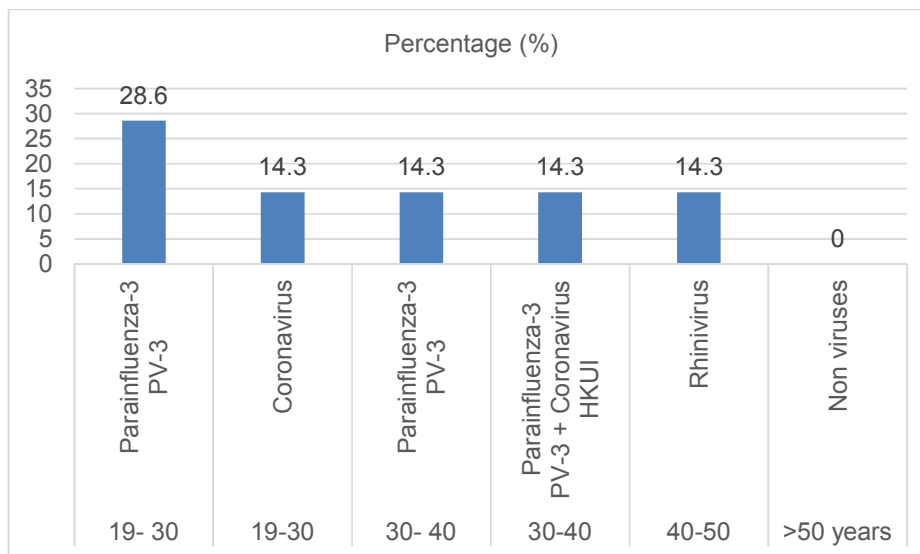


Fig. 3. Distribution of viruses by season

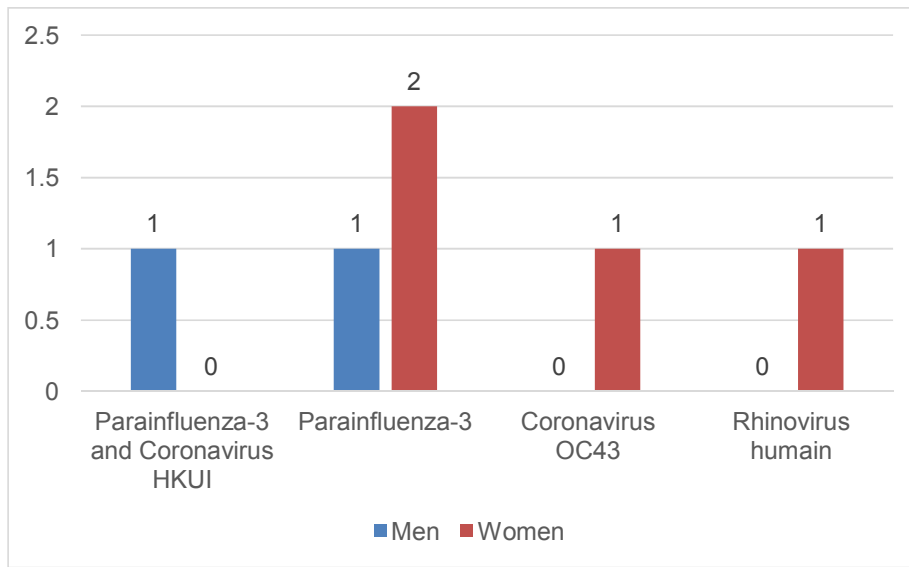


Fig. 4. Distribution of viruses by gender

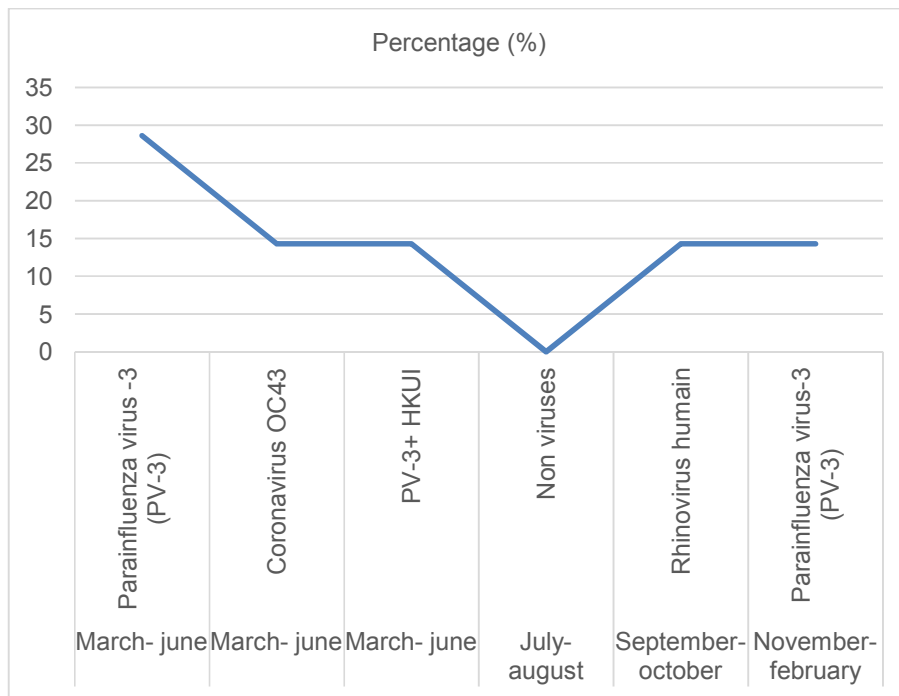


Fig. 5. Classification of viruses according to the seasons

PCR in this study revealed four types of viruses including OC43 coronavirus, Coronavirus HKUI, human rhinovirus and Para-influenza virus. The most incriminated virus in patients with pneumonia was Parainfluenza-3 (57.1%, 4/7). In fact, according to a study conducted in Lorraine, the PIV-3 subtype was the most frequently found subtype (62.7%)

compared to the other PIV-1 subtypes (25.3%), PIV-2 (7.3%) and PIV-4 (4.6%) [26]. Our results are consistent with those of Thomazelli et al. [27] who found a 57.7% positivity rate for parainfluenza-3 virus. This may be due to the fact that PIV-3 subtype infections occur in the spring and especially in the summer of each year [28].

5. CONCLUSION

The study of a series of 33 cases of hospitalized pneumonia from 2016 to 2017 at the University Hospital Center of Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, allowed us to note that this pathology is not frequent enough. The study population was predominantly 19-30 years old, male and of low socio-economic status. Hospital recruitment explains the significant frequency of the disease during cold seasons. The occurrence of acute pneumonia is most commonly seen in individuals with a particular field.

Thus, the search for viruses by real-time PCR in the bronchoalveolar lavage fluid gave a low detection rate of 18.2% with four (4) types of virus for a range of ten (10) that we offer the viral detection kit. These are Coronavirus OC43, Parainfluenza-3 PV-3, Human Rhinovirus and Coronavirus HKU1. These respiratory viruses cause seasonal infections in both children and adults, resulting in a wide range of clinical syndromes such as a common cold, laryngitis, bronchiolitis, but also more severe conditions such as pneumonia.

CONSENT

All authors declare that written informed consent was obtained from all the patient for the study.

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by the national ethics committee according to decision n°31 / msls / cnfr-dkn of 23 june 2015.

All authors hereby declare that all experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Horo Klinignan and his team of the Department of Pneumophysiology at the UHC of Cocody, Côte d'Ivoire for his help with the recruitment of patients. Our sincere thanks to Kadjo Hervé and N'tapké Maruis for here assistance in handling samples for PCR analysis in the laboratory of the Department of Epidemic Viruses of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, site Adiopodoumé.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Dorin J. Epidemiological study of viral respiratory infections from winter 2009 to 2012 in hospitals and new technologies to viral diagnosis. PhD Thesis in Pharmacy, University of Lorraine. 2012;100.
2. Anonymous CMIT. Acute community pneumonia. In, E. PILLY. Vivactis Plus Ed, French. 2008a;226-235.
3. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis. 2007;44:27-32.
4. Lim WS, Baudouin SV, George RC, Hill AT, Jamieson C, Le Jeune I, et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update. Thorax. 2009;64:1-55.
5. Díaz A, Zaragoza R, Granada R, Salavert M. Acute viral infections in immunocompetent patients. Medicina intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias, 2011;35(3):179-185.
6. Kesson AM. Respiratory virus infections. Paediatric Respiratory Reviews. 2007;8:240-248.
7. Korppi M, Don M, Valent F, Canciani M. The value of clinical features in differentiating between viral, pneumococcal and atypical bacterial pneumonia in children, Acta Paediatr. 2008;97:943-947.
8. Guery B, d'Esquivan T, Georges H, Legout L, Leroy O, Viget N, et al. Pneumonie virale sévère de l'immunocompétent. Réa. French. 2004;13:226-237.
9. Cantero VD-L. Viral respiratory infections in the lung transplant patient: review and critical analysis of clinical studies. PhD Thesis, Geneva University. 2012;40.
10. Taqarort. Profile of acute community-acquired pneumonia in the pneumology department at Ibn Nafiss hospital between 2005 and 2009. Doctoral thesis in medicine. Cadi Ayyad University, Marrakech. 2011;74:102.
11. Mounedji A, Roche N, Rabbate A, Huchon G. Low community respiratory infections in adults (immunosuppression excluded). Encycl Med Chir Pneumology. 2002;6-003-D-10, 22.
12. Jeong-Ok L, Dae-Young K, Joo Han L, Myung-Deock S, Hyeon Gyu Y, Yu Jung K,

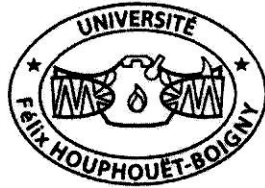
- et al. Risk factors for bacterial pneumonia after cytotoxic chemotherapy in advanced lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2008; 62:381-384.
13. Barouhiel C. Management of acute community acquired pneumonia in a Parisian hospital: retrospective study of 58 cases of hospitalized patients and comparison of medical practices with the recommendations of ANAES 2001. Thesis Doctorat Médecine, University Paris. 2006;176:113.
 14. Horo K, Koffi N, Kouassi B, N'gom AS, Kenmogné K, Ahui BJ, et al. Factors of death by acute community pneumonia in the African environment in Abidjan. *Rev Pneumol Trop*. 2004;1:10-13.
 15. Koffi N, N'gom A, Kouassi B, Aka-Danguy E, Tchamran MM. Bacterial pneumopathies with common germs during HIV infection in African adults hospitalized in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Bull Soc Path Ex*. 1997;90(5):370-372.
 16. Sibari N. Acute lobar pneumonia. Clinical, paraclinical, therapeutic and evolutionary aspects of 51 cases. Thesis doctorate Medecine, Rabat. French. 1984;208:80.
 17. Kouassi AM, Kouamé KF, Koffi YB, Je KB, Paturel JE, Oulare S. Analysis of climatic variability and its influences on seasonal rainfall patterns in West Africa: Case of the N'zi catchment (Bandama) in Côte d'Ivoire; 2010. DOI: 10.4000 / cybergeogeo.23388
 18. Bouaïti E. Evaluation of the management of community-acquired pneumonia in emergencies: Interest of the classification of Fine and review of literature. Thesis Doctorate Medicine Rabat. 2001;234:138.
 19. N'Guessan O, Adonis L. Contribution to the study of acute bacterial pneumopathies hospitalized in the service of PPH of the cocody CHU. PhD thesis in medicine, Abidjan. 2002;3276:130.
 20. Tchouasseu NL. Prognostic value of HIV-adapted CURB65 and CRB-65 scores in HIV-associated bacterial-associated community-acquired pneumonia. Doctoral Thesis in Medicine, University of Bamako. French. 2008;119.
 21. Dhaimi M. Pneumonia in a specialized department from 1982 to 1987 concerning 162 cases. Thesis Doctorate Medicine, Casablanca. 1989;133:77.
 22. Voiriot G, Visseaux B, Cohen J, Nguyen LBL, Neuville M, Morbieu C, et al. Viral-bacterial coinfection affects the presentation and alters the prognosis of severe community-acquired pneumonia. *Crit Care*. 2016;20:375. DOI: 10.1186/s13054-016-1517-9
 23. Gadsby NJ, Russell CD, McHugh MP, Mark H, Morris AC, Laurenson IF, et al. Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2016; 62:817-823.
 24. Das D, Le Floch H, Houhou N, Epelboin L, Hausfater P, Khalil A, et al. Viruses detected by systematic multiplex polymerase chain reaction in adults with suspected community-acquired pneumonia attending emergency departments in France. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(608):1-8.
 25. Saïdani M. Streptococcus pneumoniae: Bacteriological Reminders and Current State of Antibiotic Sensitivity. Laboratory of Microbiology-Hospital Charles Nicolle of Tunis. 2010;1-39.
 26. Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, Lubin C, Vaudecrane A, et al. Bronchiolitis viruses. *Arch Pédiatr*, 2010; 17(8):119-201.
 27. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Oliveira DB, Souza TS, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in south east Brazil. *J Pediatr (RioJ)*. 2007; 83:422-428
 28. Hall CB. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *New England J Med*. 2001;344(25):1917-1928.

© 2019 N'chott et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sdiarticle3.com/review-history/50385>

RÉPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

*Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique*



22 BP : 582 Abidjan 22

PERMIS D'IMPRIMER LA VERSION CORRIGÉE DE LA THÈSE DE

Doctorat de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Présenté par Madame N'CHOTT Sopi Anne-Michele Sandrine Épouse YÉRÉ

THÈME : Évaluation et caractérisation moléculaire du microbiote respiratoire du liquide de lavage broncho-alvéolaire pneumopathie sévère de la ville d'Abidjan, Côte d'Ivoire

Vu et approuvé

Abidjan, le 17 août 2021



KOUAMELAN Essetchi Paul
Professeur Titulaire

Vu et Permis d'Imprimer

Abidjan, 17 août 2021

Le Vice-Président de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY



KOUADIO Kouadio
Professeur Titulaire

Résumé :

Le diagnostic étiologique des Infections Respiratoires Aiguës Sévères (IRAS) qui conditionne une prise en charge thérapeutique adéquate du patient reste un défi majeur de santé publique en Afrique. En Côte d'Ivoire, peu de travaux concernant les étiologies des pneumonies sévères ont été réalisés. L'objectif général de ce travail est de caractériser les agents pathogènes potentiels par les techniques conventionnelles et moléculaires de microbiologie à partir de Liquide Broncho-alvéolaire (LBA) de patients atteints d'IRAS.

Pour cette étude, une étude expérimentale prospective a été effectuée sur les patients adultes atteints de pneumopathie alvéolo- interstitielle et menée au service de pneumophtisiologie (PPH) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Cocody et le laboratoire de la bactériologie- virologie, la plateforme de biologie moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, entre février 2016 et octobre 2017. La recherche des agents étiologiques des IRAS s'est faite par la culture sur les géloses GSF, GSC, Chapman, EMB et par la technique moléculaire de PCR en temps réel à travers l'extraction et l'amplification de l'ADN et de l'ARN des différents pathogènes présents.

Les résultats de cette étude ont montré la présence des bactéries, virus et *Pneumocystis jirovecii* dans les 33 échantillons de LBA selon les taux respectifs de 52,5 %, 15% et 32,5 %. Les agents étiologiques étaient en autres *Streptococcus pneumoniae* (9,1%), *Haemophilus influenzae* (27,3%), *Legionella pneumophila* (3%), *Moraxella catarrhalis* (3%), *Haemophilus influenzae* + *Streptococcus pneumoniae* (9,1%), *Haemophilus influenzae* + *Moraxella catarrhalis* (6,1%), *Streptococcus pneumoniae* + *Staphylococcus aureus* (4,8%) et de *Streptococcus pneumoniae* + *Moraxella catarrhalis* (4,8%), *Klebsiella pneumonia* (75%); Coronavirus OC43 (3%), Parainfluenza virus-3 PV-3 (9,1%), Rhinovirus humain (3%), Parainfluenza virus-3 (PV-3) + Coronavirus HKUI (3%) et *Pneumocystis jirovecii* (32,5%).

L'étiologie bactérienne a donc été prépondérante dans les infections respiratoires aiguës sévères dans la présente étude menée à Abidjan. D'où la nécessité aux chercheurs de développer des algorithmes de diagnostic microbiologique des IRAS afin de prendre en charge rapidement les patients.

Mots clés : IRAS, Liquide Broncho-alvéolaire, PCR temps réel, Culture

Abstract :

The etiological diagnosis of Severe Acute Respiratory Infections (IRAS), which determines adequate patient management, remains a major public health challenge in Africa. In Côte d'Ivoire, little work has been done on the etiologies of severe pneumonia. The general objective of this work is to characterize potential pathogens by conventional and molecular microbiology techniques from Broncho alveolar Fluid (BAL) from patients with IRAS.

For this study, a prospective experimental study was carried out on adult patients with alveolo-interstitial pneumonitis and carried out in pneumophtisiology department (PPH) at the University Hospital Center (CHU) of Cocody and the laboratory of bacteriology-virology, the Molecular Biology Platform of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, between February 2016 and October 2017. The search for the etiological agents of the IRAS was done by the culture on GSF, GSC, Chapman, and EMB agar plates and by the real-time PCR molecular technique by extracting and amplifying DNA and RNA from the various pathogens present.

The results of this study showed the presence of bacteria, virus and *Pneumocystis jirovecii* in the 33 BAL samples at the respective rates of 52.5%, 15% and 32.5%. Other etiological agents included *Streptococcus pneumoniae* (9.1%), *Haemophilus influenzae* (27.3%), *Legionella pneumophila* (3%), *Moraxella catarrhalis* (3%), *Haemophilus influenzae* + *Streptococcus pneumoniae* (9.1%), *Haemophilus influenzae* + *Moraxella catarrhalis* (6.1%), *Streptococcus pneumoniae* + *Staphylococcus aureus* (4.8%) and *Streptococcus pneumoniae* + *Moraxella catarrhalis* (4.8%), *Klebsiella pneumonia* (75%); Coronavirus OC43 (3%), Parainfluenza virus-3 PV-3 (9.1%), Human Rhinovirus (3%), Parainfluenza virus-3 (PV-3) + Coronavirus HKUI (3%) and *Pneumocystis jirovecii* (32.5%)).

The bacterial etiology was therefore predominant in severe acute respiratory infections in this study conducted in Abidjan.

Hence the need for researchers to develop microbiological diagnostic algorithms for IRAS in order to quickly take care of patients.

Keywords: IRAS, Bronchoalveolar fluid, Real-time PCR, Culture