

Aide aux Cliniques de pédiatrie :
éléments de:
bactériologie et virologie

Ulg, faculté de médecine

Professeur Oreste Battisti

Introduction

Le diagnostic des affections pédiatriques repose sur les éléments classiques : l'anamnèse, l'examen clinique et les données paracliniques.

En ce qui concerne les données paracliniques, l'imagerie et la microbiologie seront souvent utilisées (voir « Maladies infectieuses de l'enfant et immunologie » et « Chirurgie et imagerie de l'enfant »).

Nous faisons dans cet ouvrage un rappel utile des méthodes microbiologiques ainsi qu'une présentation intégrée à la clinique, des microorganismes potentiellement responsables des affections dues à une infection bactérienne ou virale.

Nous remercions les collègues microbiologistes pour leur contribution.

A PROPOS DU DIAGNOSTIC D'UNE INFECTION BACTERIENNE

A - GÉNÉRALITÉS

Le diagnostic bactériologique est un ensemble de moyens permettant de confirmer telle ou telle étiologie infectieuse d'origine bactérienne. Ces moyens diagnostiques sont variés et caractérisent soit le diagnostic direct soit celui indirect :

DIAGNOSTIC DIRECT : mise en évidence de la bactérie elle-même, donc finalement de sa culture ou isolement qui permettra l'identification ultérieure ainsi que de préciser sa sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

DIAGNOSTIC INDIRECT : mis en évidence de la réponse de l'organisme à l'infection par la présence d'anticorps spécifiques, le plus souvent sériques ou plus rarement par une réponse d'hypersensibilité, dite allergique.

B - DIAGNOSTIC DIRECT

La prescription s'intitulera "examen cyto-bactériologique" d'une urine (ECBU), d'une expectoration (ECBC), d'un liquide pleural... ayant pour objectif de rechercher la mise en évidence de la bactérie responsable de l'infection.

1 - Demande :

Il sera important de bien identifier le patient par son nom, son prénom, sa date de naissance, le sexe. Il existe une procédure standard de recherche de cellules et de germes, d'où l'appellation suivante : "Examen cytobactériologique des urines ". Celle-ci exclut toute recherche systématique de germes particuliers telle la recherche de BAAR (Bacilles Acido-Alcoolo-Résistants), de leptospires...

Le clinicien ne devra jamais oublier d'indiquer toute demande ou recherche particulière, en raison de l'utilisation de milieux spéciaux.

Exemple : La culture du bacille tuberculeux (BAAR) se fera sur le milieu de Lowenstein-Jensen après, au minimum 3 semaines d'incubation à 37°C, le milieu étant protégé de la dessication par un bouchon en caoutchouc.

2 - Examen macroscopique :

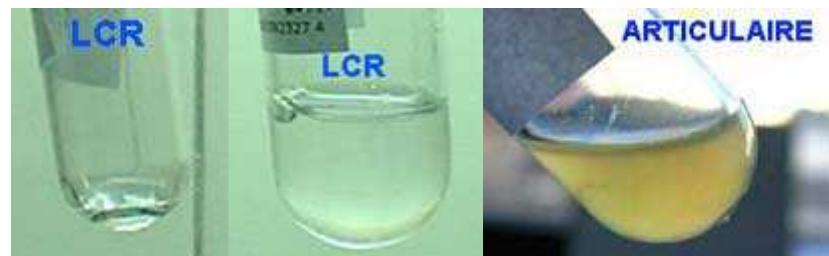
Toute infection bactérienne s'accompagne, outre la présence de bactéries, de signes biologiques liés à l'inflammation avec l'éventuelle présence de leucocytes, notamment de polynucléaires.

Ces éléments peuvent entraîner au-delà d'un seuil, une modification

visuelle, clairement perceptible à l'oeil nu, qui signe une anomalie patente.

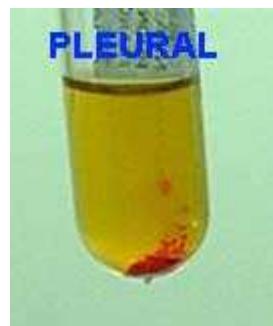
Divers éléments sont alors obtenus comme le montrent les exemples suivants:

Trouble : urine, LCR, liquide pleural ou articulaire



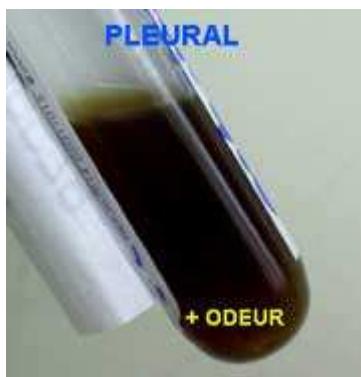
**Hématurique : urine, LCR,
liquide pleural ou articulaire**

Autre coloration anormale



**Odeur : on notera celle
caractéristique lors d'infections
à germes anaérobies stricts dans
un liquide pleural**

**Consistance : Exemple d'une
selle diarrhéique.**

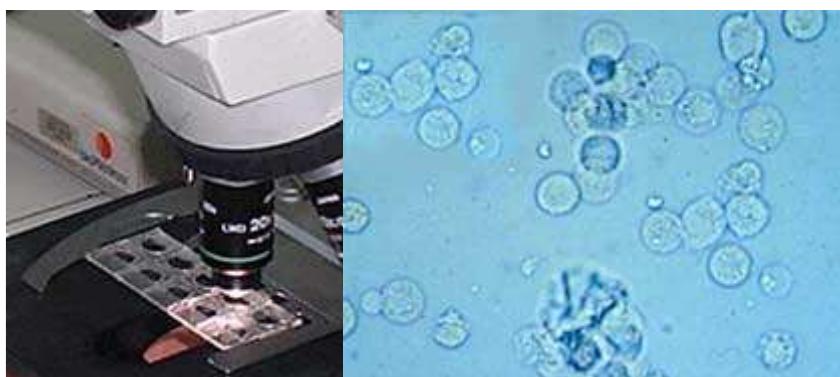


3 - Examen microscopique

3 - 1 Etat frais (**Grossissement de 400, en général**):

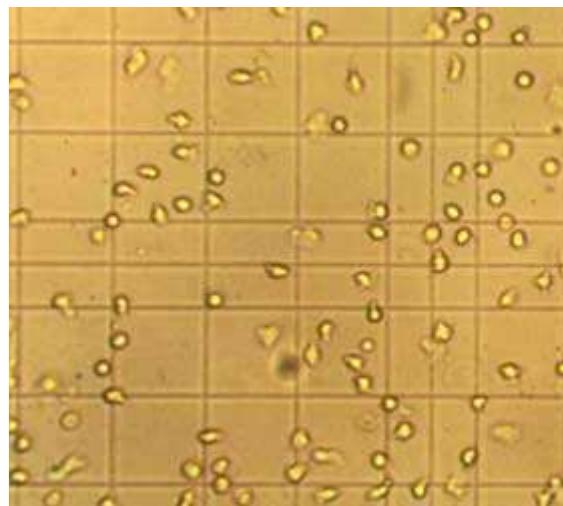
L'examen microscopique a un intérêt diagnostique au delà d'un certain seuil... Donc souvent, on notera aucune anomalie macroscopique ou visible, d'où la nécessité de rechercher des bactéries et des éléments cellulaires de type polynucléaire au microscope optique.

Une préparation est obtenue avec le dépôt d'une goutte entre lame et lamelle, puis on observe au microscope d'une part, la présence éventuelle de bactéries (coque, diplocoque, chainette, coccobacille, bacille...), le type de mobilité comme celle du "rameur" ou celle en "en vol de moucheron".



Par ailleurs, lors de cette observation, seront évaluées les cellules avec une appréciation semi-quantitative (rares, peu nombreux, nombreux, très nombreux...) ou mieux quantitative, exprimée par nombre d'éléments / mm^3 ou ml ou par champ.

Exemple d'une cellule de Malassez pour LCR, liquides de ponction, urines

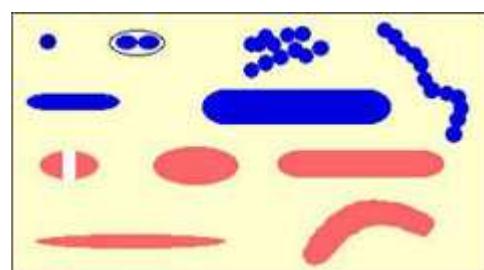
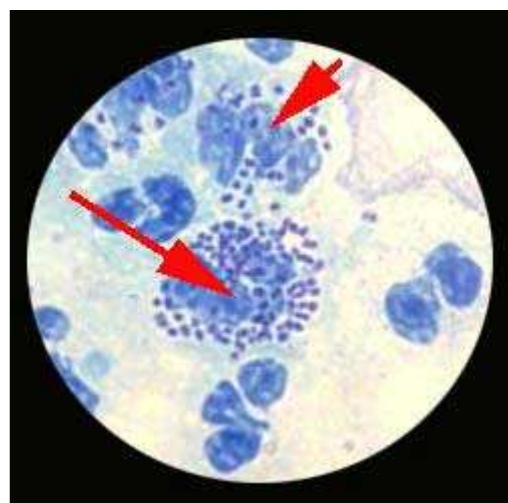


3 - 2 Examen après coloration (Grossissement de 1000, en général) :

Un frottis fin est obtenu à partir du produit pathologique, puis coloré permettant une meilleure visualisation des bactéries et/ou des éléments cellulaires

Coloration simple: Le frottis fin est traité par un seul colorant basique (bleu de méthylène). Cette technique est simple et rapide, peu courante, à l'exception de l'examen de pus urétral pour la recherche de gonocoque: diplocoques en grain de café intracellulaires.

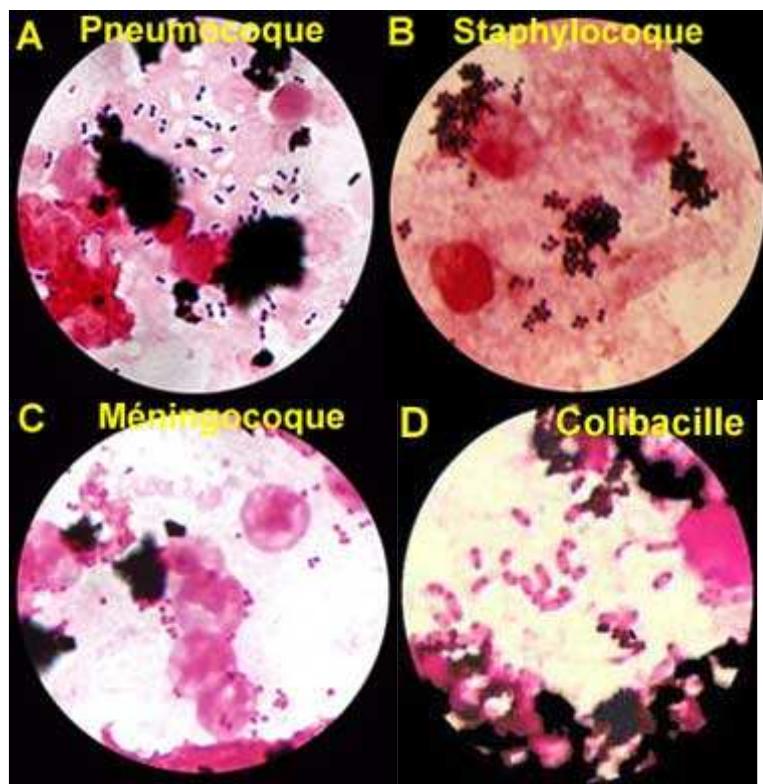
Coloration différentielle : Compte tenu des différences structurales (cf anatomie) de la paroi des bactéries, la coloration de Gram découverte par Hans GRAM en 1884 permet de distinguer les bactéries colorées en violet (G+) de celles en rose (G-).



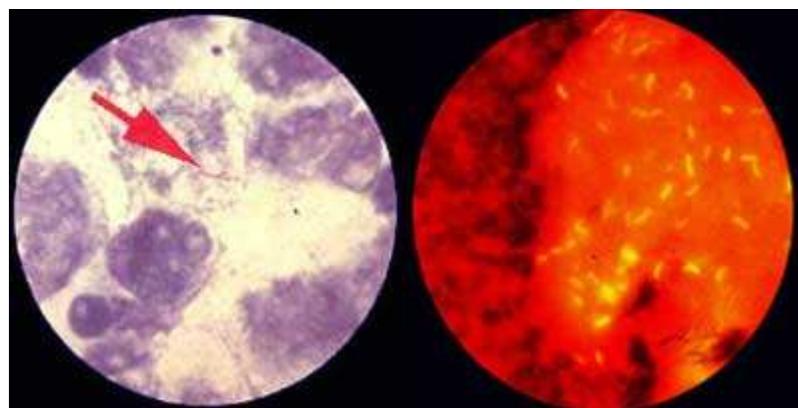
Il est alors possible de suspecter en tenant compte de la réponse Gram+ ou - et des morphologies observées d'évoquer un probable diagnostic

Exemples de probables diagnostics bactériologiques en fonction des

commémoratifs :
suspicion de pneumonie (A), de bronchopneumonie (B), de méningite (C), de pyélonéphrite (D)

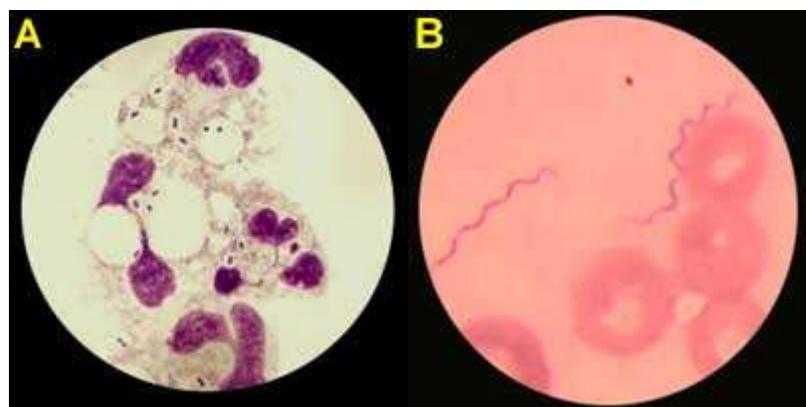


3 - 3 Examen après coloration spéciale (Ziehl-Neelsen) : Les bacilles acido-alcooloo-résistants (BAAR) compte tenu de la composition de leur paroi sont détectés spécifiquement. Il s'agit du groupe des mycobactéries dont le bacille tuberculeux (Bacille de KOCH/BK) colorées en rouge sur un fond bleu. Ce contraste de coloration permet une recherche plus facile sur un frottis. D'ailleurs, l'usage actuel d'un colorant fluorescent (auramine) confirme l'intérêt d'une visualisation plus facile (cf GBEA).



3 - 3 Examen après coloration spéciale (MGG):

La coloration de May-Grunewald-Giemsa (MGG) est principalement à visée cytologique pour une meilleure individualisation des éléments cellulaires tels polynucléaires, macrophages, lymphocytes... Les bactéries peuvent être néanmoins observées avec leur capsule comme le pneumocoque (A). D'autres peuvent être spécialement recherchées telle *Borrelia burgdorferi* dans la maladie de Lyme (B).

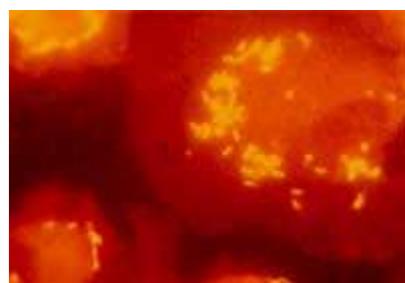


3 - 4 : Autres types de microscopie

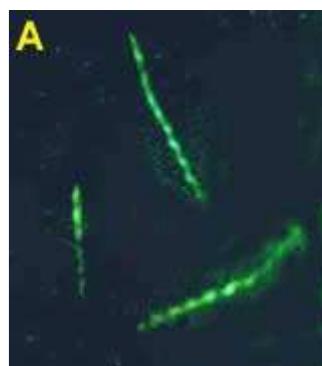
Microscopie à fluorescence (source particulière ; lampe UV) : coloration spécifique des BAAR (mycobactéries) par fluorescence (auramine)(cf GBEA). Cette technique est d'usage courant en laboratoire.



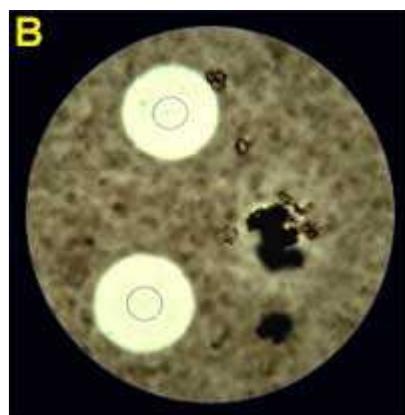
coloration par anticorps marqués par un conjugué fluorescent. Ce type de technique est maintenant d'usage plus limité (sensibilité insuffisante) comme celle de la recherche de *Legionella pneumophila* dans un prélèvement pulmonaire. La recherche de l'antigène urinaire est très supérieure en sensibilité.



Microscopie au fond noir (condenseur spécial) : Il s'agit de rechercher des bactéries sur lesquelles la lumière s'est réfléchie. Cette recherche est inhabituelle: diagnostic bactérioscopique de la syphilis (*Treponema pallidum*) sur un prélèvement de chancre (A).

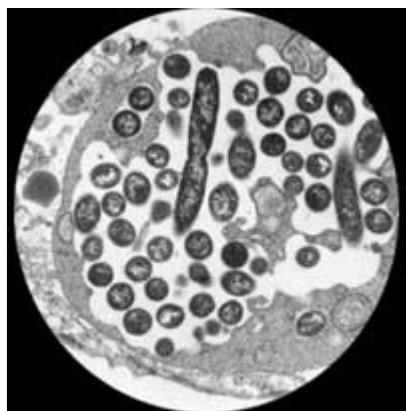


La recherche d'un microorganisme rare de type levure (*Cryptococcus neoformans*) est constante dans une suspicion de méningite chez le sidéen (B).



Microscopie électronique : rarement utilisée en pratique, plus souvent dans le cadre de l'identification d'une nouvelle étiologie bactérienne (*Bartonella*, *Helicobacter*...).

Exemple: individualisation d'un corps d'inclusion à *Chlamydia trachomatis*



3 - 5 : Autres types de coloration :

Il existe en bactériologie, diverses autres techniques de coloration qui ne présentent qu'un intérêt anecdotique. Cependant il convient de ne pas les méconnaître dans le cadre d'une nouvelle étiologie bactérienne comme la technique d'imprégnation argentique (intérêt historique) dans l'angiomatose bacillaire ou la maladie des griffes du chat. Les autres comme celle de visualisation de la capsule (coloration de Moeller) ou encore celle des cils ou flagelles (coloration de Leifson) sont quelquefois mises en oeuvre dans le cadre de diagnostic d'une espèce...

PHYSIOLOGIE – CROISSANCE des bactéries

A - DIVISION BACTERIENNE

La bactérie se multiplie par fission binaire : la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire.



B - DYNAMIQUE DE LA CROISSANCE

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries.

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

1 - Courbe de croissance : La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide. Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance.

. Phase de latence : **le taux de croissance nul ($\mu = 0$)**. La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent).

. Phase d'accélération : **il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.**

. Croissance exponentielle : **le taux de croissance atteint un maximum ($\mu=\text{max}$)**. Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

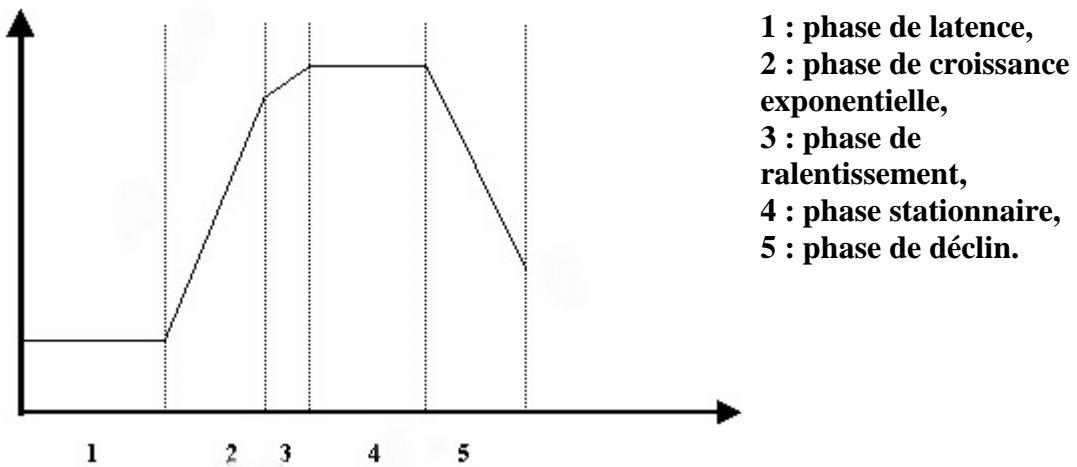
. Phase de ralentissement : **la vitesse de croissance régresse**. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

. Phase maximale stationnaire : **le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$)**. Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

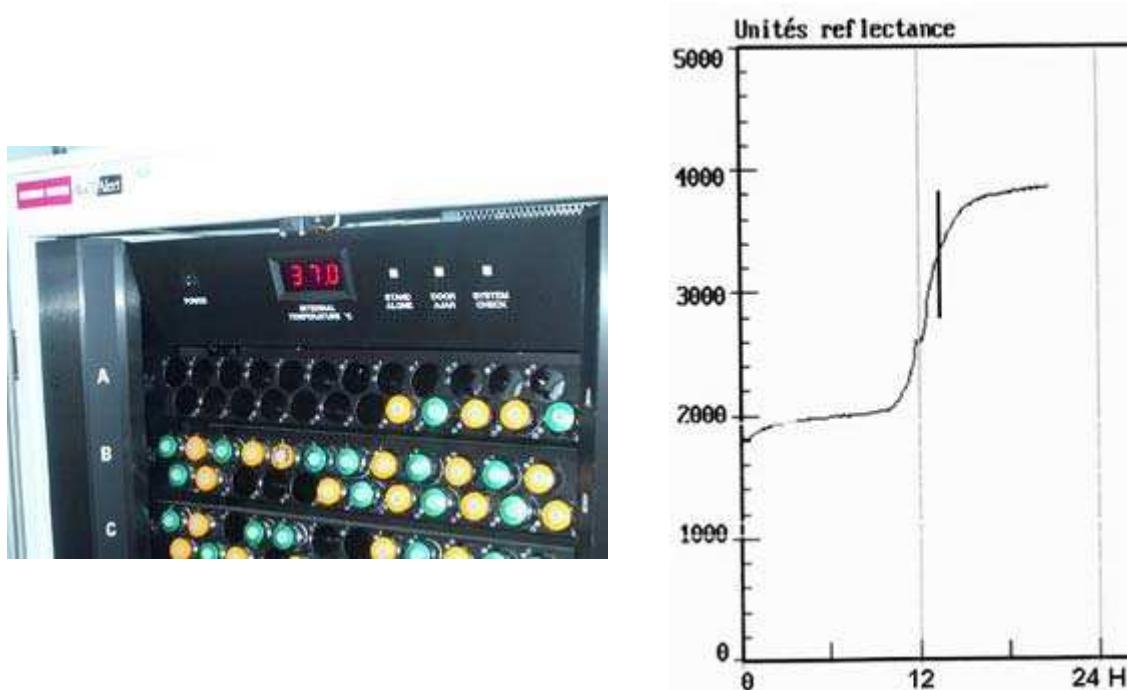
. Phase de déclin : **le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$)**. Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une

diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).

Exemple d'une courbe de croissance



Courbe de croissance dans un automate d'hémoculture



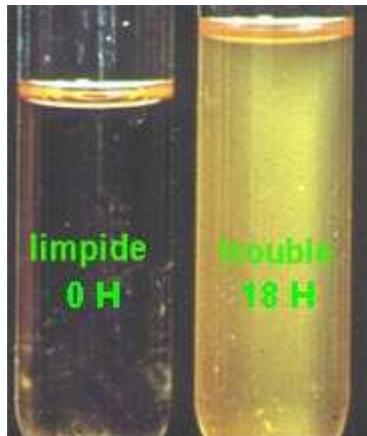
Haut

2 - Croissance *in vitro* (milieux liquides et solides)

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide, solide et semi-liquide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries pures ou lors d'infection monomicrobienne (hémoculture).

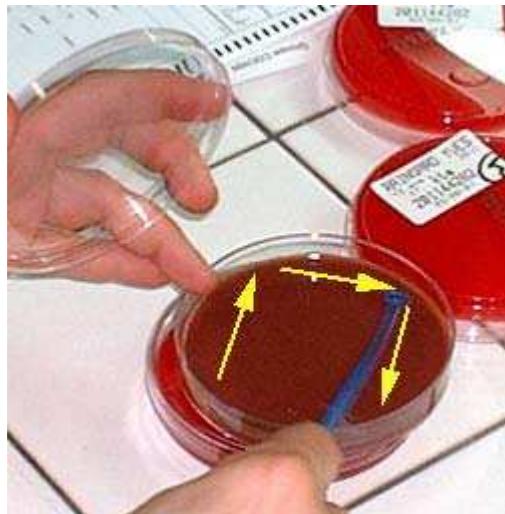
Exemples : culture d'une bactérie dans un bouillon nutritif ou encore à partir du sang

d'un malade (hémoculture en flacon)



Les milieux solides ou semi-solides, à base d'agar (gélose), sont utilisés pour l'isolement de bactéries. Dans ces milieux, ont été ajoutés des nutriments favorisants la croissance des bactéries étudiées.

Exemples : culture par isolement d'une bactérie à la surface d'un milieu gélosé contenant du sang (mouton, cheval) montrant après 18 à 24 H à 37°C d'incubation des colonies hémolytiques.



3 - Croissance *in vivo*

In vivo, la croissance bactérienne n'est pas similaire à celle observée *in vitro*. Elle est beaucoup plus ralentie. La phase de latence est beaucoup plus longue. Les bactéries n'ont pas toujours tous les nutriments à leur disposition pour leur croissance. *In vivo*, les bactéries peuvent être phagocytées par les macrophages et les polynucléaires et être inhibées par les produits antibactériens comme le lysozyme ou le complément.

Temps de génération (TG) de quelques espèces bactériennes

Bactérie	<i>In vitro</i> (min)	<i>In vivo</i> (h)
<i>Escherichia coli</i>	20-40	5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	20-40	3-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	3-5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	4
<i>Vibrio cholerae</i>	20	2-5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	120-240	24-48

4 - Croissance en culture continue

Il y a maintien d'une croissance exponentielle continue lorsque le milieu de culture est renouvelé régulièrement et que les métabolites sont éliminés en même temps. La valeur μ est maximale et constante.

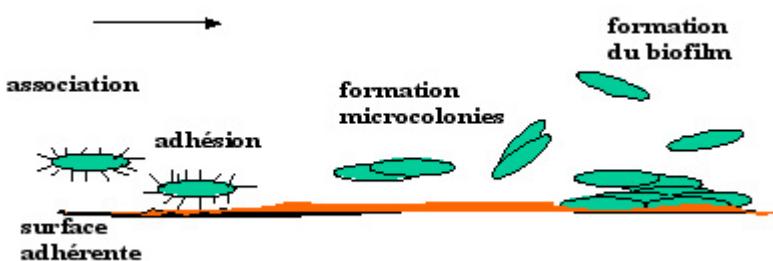
5 - Croissance en culture synchrone

Les bactéries se multiplient toutes au même moment. La courbe de croissance montre des paliers successifs. Ce type de culture permet d'étudier la division cellulaire indépendamment de la croissance.

6 - Croissance en biofilm

Les bactéries peuvent s'attacher aux surfaces, s'associer entre elles et s'entourer d'un polymère organique pour constituer un biofilm. Leur organisation et leur métabolisme dépendent de la nature de la surface et de l'environnement physico-chimique. Les biofilms intéressent tous les domaines de la microbiologie et de la médecine (matériels d'exploration, matériels implantés, muqueuses lésées). Les biofilms sont caractérisés par une hétérogénéité spatiale : il existe des variations métaboliques importantes à l'intérieur du biofilm et à l'interface milieu liquide/milieu solide.

Schéma d'organisation d'un biofilm

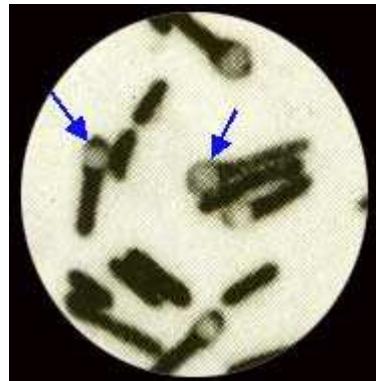


7 - Effets de carence et de stress

En situation de carence ou de stress, la bactérie peut adopter deux types de stratégie pour sa survie :

1 - la bactérie se différencie vers une forme de résistance métaboliquement inactive C'est le cas des *Bacillus* qui produisent une spore.

2 - la bactérie développe des systèmes de régulation pour contrôler cette période de carence en adaptant son métabolisme pour faire un maximum d'économie. C'est le cas de *Escherichia coli*.



Dans ce type de situation, la bactérie présente les adaptations suivantes :

- . Dégradation de l'ARN cellulaire total, libérant des nucléotides utilisables pour la synthèse de nouveaux ARN ou comme source d'énergie.
- . Dégradation des protéines : libération d'acides aminés réutilisés ou dégradés pour la production d'énergie
- . Mise en œuvre de systèmes de transport et d'assimilation comme substituts aux éléments manquants qui sont essentiellement les composés azotés, phosphorés, carbonés et le fer.
- . Synthèse de protéines de stress qui protègent la bactérie de la privation de nutriments et d'autres stress (existence de gènes impliqués dans les phénomènes de carence ou de stress).

C - CONDITIONS FAVORABLES A LA CROISSANCE

1 - Sources d'énergie

Les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

Les bactéries phototrophes utilisent l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique).

Les bactéries chimiotrophes puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Elles utilisent des donneurs et des accepteurs d'électrons (élément minéral : bactérie chimiolithotrophe ; élément organique : bactérie chimioorganotrophe).

La grande majorité des bactéries d'intérêt médical sont chimioorganotrophes.

2 -Sources de carbone

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants de la bactérie. Le plus simple des composés est l'anhydride carbonique ou CO₂. Celui-ci peut être utilisé par la bactérie pour la synthèse de certains métabolites essentiels qui ferait intervenir une réaction de carboxylation.

Le CO₂ est la seule source de carbone pour les bactéries autotrophes. Les bactéries hétérotrophes utilisent facultativement le CO₂. Les bactéries hétérotrophes dégradent une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide acétique, acide lactique, polysaccharides, sucres divers).

3 - Sources d'azote et besoins en soufre

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés (réactions de désamination, de transamination)

Le soufre est incorporé par les bactéries sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques.

4 - Besoins inorganiques

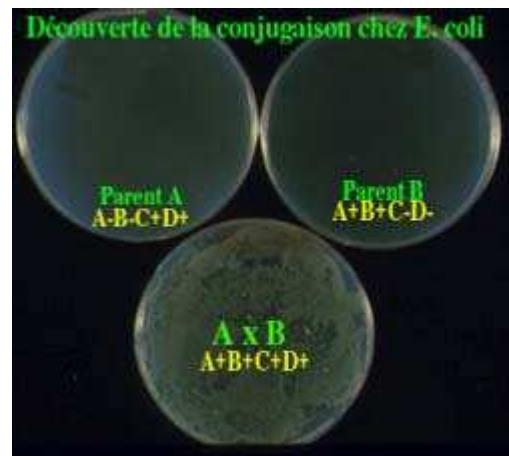
Le phosphore fait partie des acides nucléiques et de nombreuses réactions enzymatiques. Il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la bactérie. Il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

5 - Autres éléments

D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium, chlore) et dans les réactions enzymatiques (calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines)

Exemple d'un milieu solide minimum pour étudier le transfert de marqueurs d'auxotrophie (cf découverte de la conjugaison)

composition: SO₄(NH₂)₂ 1 g, PO₄K₂H 7g, PO₄KH₂ 2g, citrate 0,5g, SO₄Mg, 7H₂O 1g, eau 500 ml



D - CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA CROISSANCE

1 - Effet de l'oxygène

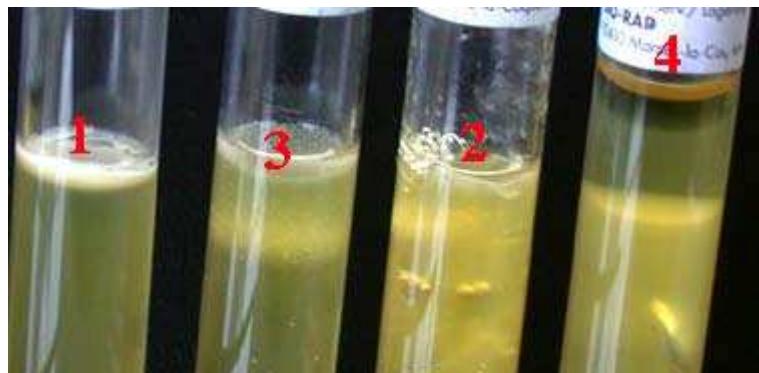
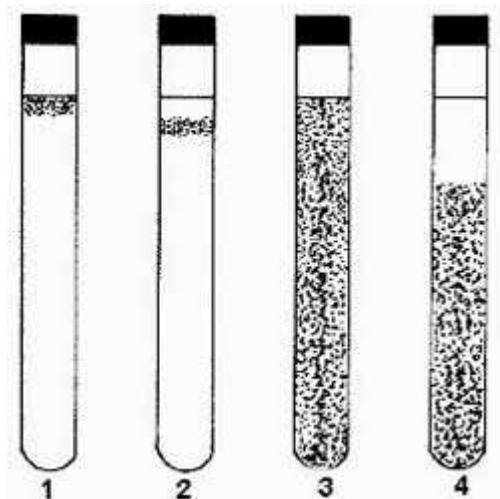
Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

1 - Les bactéries aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*).

2 - Les bactéries microaérophiles se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter*, *Mycobacteriaceae*).

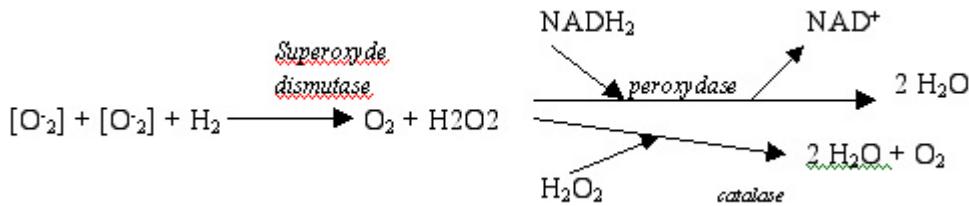
3 - Les bactéries aéro-anaérobies facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.

4 - Les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent se cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par fermentation.



C'est le cas des bactéries intestinales (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*) et de nombreuses bactéries présentes dans les flores normales de l'organisme. La toxicité de l'oxygène s'explique par la production de radicaux superoxydes que les bactéries anaérobies ne peuvent pas détruire (absence de superoxyde dismutase) et/ou par l'absence d'une activité enzymatique à type de catalases et de peroxydases.

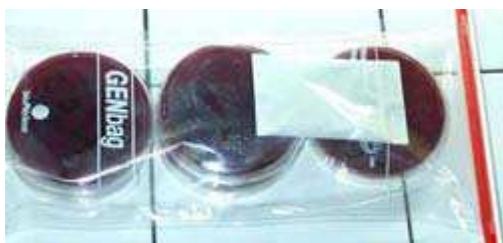
Mode d'action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase



Exemple : Etuve avec culture de bactéries anaérobies stricts en jarre



Autre exemple : culture de bactéries anaérobies stricts en sachet plastique et en atmosphère contrôlée



2 - Effet de la température

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance.

- Bactéries mésophiles (Ex. : *Escherichia coli*) : température de croissance proche de celle du corps humain (37°C)
- Bactéries thermophiles (Ex. : *Thermus aquaticus*) : températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C .
- Bactéries hyperthermophiles (Ex. : *Archaea*) : températures de croissance supérieures à 80°C .
- Bactéries psychrophiles (Ex. :) : Températures proches de 0°C (optimum à $10-15^\circ\text{C}$).
- Bactéries psychrotropes (Ex. : *Pseudomonas*) : températures de croissance proches de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles.

Exemple : Dans un laboratoire d'analyse, étuve dont la température intérieure est réglée à 37°C



Autre exemple : étuve dont la température intérieure est réglée à 37°C avec une atmosphère de 5% de gaz carbonique (CO₂)



3 - Effet du pH

Le pH (concentration en ion hydrogène [H⁺]) de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines des lacs).

Les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins.

On distingue les bactéries:

- neutrophiles qui se développent pour des pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. La plupart des bactéries médicalement importantes sont ainsi.

Exemple : isolement d'une souche de *Escherichia coli* sur un milieu usuel



- alcalophiles qui préfèrent les pH alcalins: cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*, donc milieux de culture particuliers

- acidophiles qui se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*.

4 - Effet de la pression osmotique

Les bactéries sont assez tolérantes aux variations des concentrations ioniques. Certaines espèces sont osmotolérantes (*staphylocoques*, *Vibrio cholerae*).

5 - Effet de l'eau libre

La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. L'activité de l'eau (Aw) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

- Présence de sels : Les bactéries halophiles nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusqu'à 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (*Halobacterium*).

Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).

- Présence de sucres : Les bactéries osmophiles nécessitent des sucres pour leur croissance. Celles osmotolérantes acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance. Enfin les bactéries xérophiles peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

6 - Métabolisme énergétique

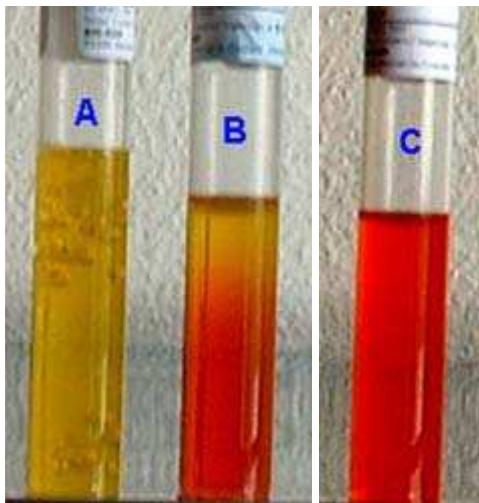
On peut opposer les bactéries ayant un métabolisme fermentatif et celles ayant un métabolisme de type respiratoire.

Pour les bactéries à métabolisme fermentatif, la dégradation du glucose est

incomplète et aboutit à la formation de divers composés organiques (acides organiques).

Pour les bactéries ayant un métabolisme oxydatif , la dégradation se fait par le cycle de Krebs. L'accepteur final d'électron est l'oxygène. Chez les bactéries, le système de transport d'électrons est situé dans la membrane cytoplasmique.

Exemple : Mise en évidence du caractère fermentaire (A) ou oxydatif (B) avec un milieu dit de MEVAG contenant du glucose. Le témoin (C) est le même milieu sans sucreensemencé de manière identique.



E - APPLICATIONS

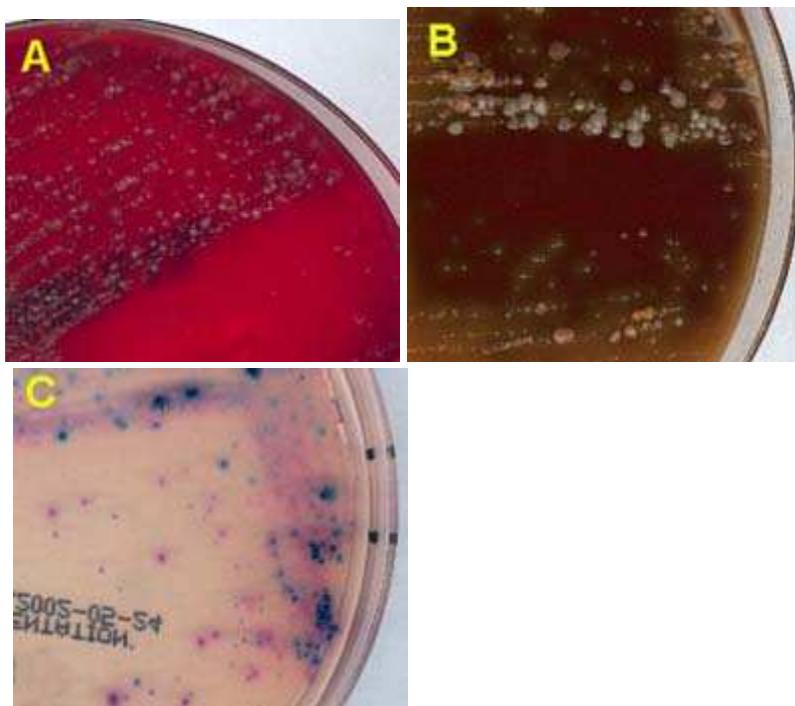
1 - Milieux de culture

Un milieu de culture est composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, etc), d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH, de sels minéraux et de vitamines. Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance (sang, protéines, hémoglobine, vitamines). Ils sont de nature solide, semi-solide ou liquide.

Parmi les milieux de culture, on distingue les milieux :

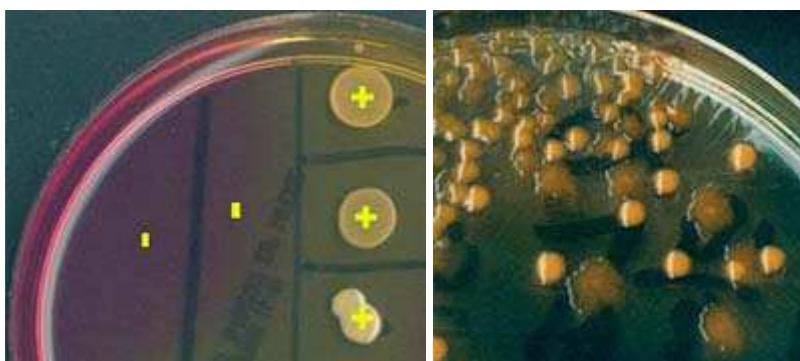
- d'isolement qui sont le plus souvent solides (gélosés) et de composition variable pour permettre le développement de plusieurs espèces bactériennes: gélose au sang frais, gélose dite au sang cuit.....

Exemple : isolement d'une aspiration bronchique sur milieu gélosé au sang frais (A), au sang cuit (B) ou contenant des substrats chromogéniques (C)



- sélectifs qui favorisent artificiellement la croissance d'une espèce au détriment des autres tels le Milieu de Chapman (hypersalé + mannitol + indicateur de pH), Drigalski (sels biliaires + cristal violet + lactose + indicateur de pH).....

Exemple : culture d'une part sur le milieu de Chapman (gauche) de trois souches de *Staphylococcus aureus* et d'autre part sur celui de Drigalski (droite) de *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*



- identification permettent au cours de l'isolement ou non de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés biochimiques d'une bactérie pour commencer à l'identifier



2 - Apparences des colonies

L'aspect des colonies est le caractère primaire utilisé pour orienter le diagnostic effectué par le bactériologue. La forme des colonies dépend de :

A) facteurs intrinsèques à la bactérie :

mobilité,

morphologie : taille, forme, contour, relief, surface

production d'une capsule,

production de matériel extracellulaire,

pigmentation,

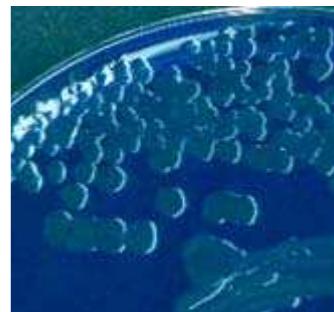
présence de fimbriae

B) facteurs extrinsèques :

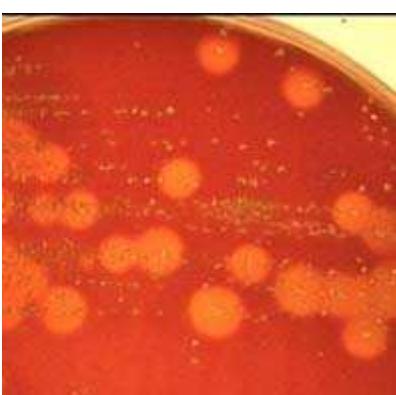
gradients de solutés créés autour de la colonie

présence de colorants dans le milieu de culture.

Exemple : Aspects de colonies bactériennes sur le milieu sélectif dénommé Drigalski



Autre exemple : Aspects de colonies bactériennes sur le milieu enrichi au sang



3 - Recherche des caractères biochimiques

L'identification des bactéries est effectuée en utilisant des milieux de culture dont la composition permet de mettre en évidence une enzymatique.

Exemples : activités variables (souches A et B) de type β -galactosidase (ONPG), lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC), uréase (URE)



L'activité fermentaire est révélé avec un milieu type contenant un sucre, un indicateur coloré des changements de pH. La fermentation du sucre entraîne un abaissement du pH et donc un changement de couleur de l'indicateur coloré.

Exemples : activité fermentaire positive vis-à-vis de divers hydrates de carbone:



A l'heure actuelle, des systèmes automatisés plus sensibles effectuent des mesures photométriques en continu et peuvent identifier les principales bactéries isolées en pratique médicale en moins de 5 heures.

Exemples : automates d'identification et de sensibilité aux antibiotiques



A PROPOS DES ANTIBIOTIQUES

A – INTRODUCTION

Quelle est la nécessité pour un clinicien de demander un antibiogramme de la souche pathogène ?

En fait selon l'agent bactérien impliqué et la probabilité élevée de résistance acquise (cf classe thérapeutique), il pourra être nécessaire d'isoler l'agent infectieux (examen cyto-bactériologique) et d'effectuer un antibiogramme.

B - L'ANTIBIOGRAMME

. Définition: détermination de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques. **Terme contracté par analogie avec l'hémogramme. Examen quotidien de laboratoire, en particulier hospitalier pas toujours nécessaire (cf classes thérapeutiques)**

. Méthodologies:

- détermination directe de la **CMI en milieu liquide ou solide (cf antibiotique IV)**
- méthode des disques ou diffusion (**pratique**)
- E- test
- antibiogramme automatisé **ou automates**

Choix des antibiotiques: **malgré la grande diversité des antibiotiques disponibles, ils seront choisis selon leur spectre, donc un antibiotique d'un groupe peut répondre pour un autre appartenant au même groupe.**

En pratique quotidienne: Choix de 10 (en ville) à 30 antibiotiques (en milieu hospitalier) selon la prise en compte de l'examen morphologique: coques,

coccobacilles, bacilles disposition (en amas, en chaînette) coloration (Gram + ou +).
Celà suppose la connaissance du spectre des antibiotiques.

Réponses de l'antibiogramme : un exemple de rendu d'antibiogramme

i) <u>Enterobacter cloacae</u>	GERME No :	1
<i>B-LACTAMINES</i>		
AMOXICILLINE.....	R	
AMOXICILLINE+AC.CLAV	R	
TICARCILLINE.....	R	
TICARCILLINE+AC.CLAV	R	
PIPERACILLINE.....	R	
PIPERACILLINE + TAZO	R	
CEFALOTINE.....	R	
CEFUROXIME.....	R	
CEFOXITINE.....	R	
CEFIXIME.....	..	
CEFOTAXIME.....	R	
CEFTAZIDIME.....	R	
CEFEPEMITE.....	I	
CEFPYRAME.....	..	
AZTREONAM.....	R	
IMIPENEME.....	S	
ANTIBIOTIQUES		

Interprétation :

BUT = classement en catégorie clinique au nombre de trois

1/ SENSIBLE

2/ INTERMEDIAIRE

3/ RESISTANT

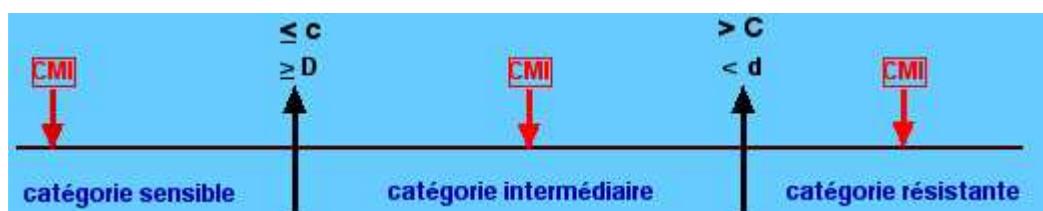
1/ SENSIBLE: Les souches S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est acceptable. On doit s'attendre à un effet thérapeutique dans le cas d'un traitement à dose habituelle par voie générale.

2/ RESISTANT: Les souches R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique. On ne peut s'attendre à un effet thérapeutique quel que soit le traitement.

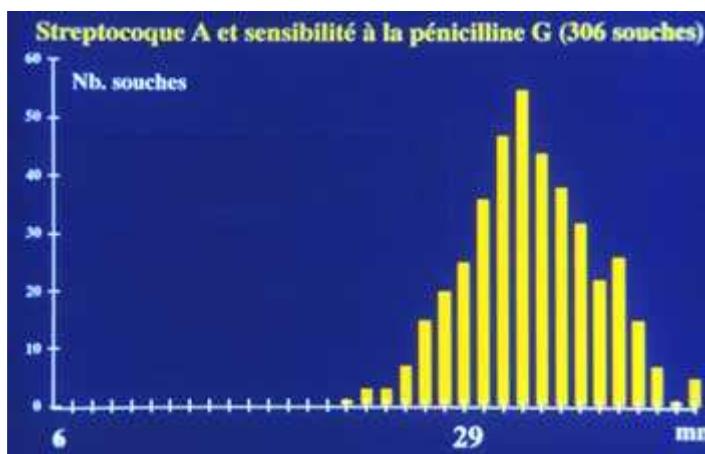
3/ INTERMEDIAIRE: Les souches I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Elles forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive:

il peut s'agir d'un caractère de résistance avec expression très faible (S ???). In vivo, une partie de ces souches apparaîtront résistantes à la thérapeutique, observations cliniques partielles ou inexistantes, risque d'échec thérapeutique. On peut espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou accrues). En fait, il existe une zone tampon entre incertitudes techniques et biologiques.

Catégories définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) délimitées par deux concentrations critiques (c, C) et à deux diamètres critiques (D, d) et choisies par un compromis : données bactériologiques, cinétique; résultats cliniques.



Vision banalisée par deux bornes (c, C ou D, d) schématique avec l'évolution de nos connaissances sur l'activité intrinsèque des antibiotiques en termes de CMI (moyennes, modales, CMI 50%) vis-à-vis des espèces bactériennes.



C - SPECTRE CLINIQUE DES ANTIBIOTIQUES (SCA)

L'antibiogramme n'est pas nécessaire si'il y a prise en compte du spectre clinique des antibiotiques (SCA), Pour deux classes thérapeutique (habituellement sensibles et modérément sensibles) le recours à l'antibiogramme n'est pas nécessaire, celà implique qu'il n'y aura pas d'examen cytobactériologique.

La prescription d'un antibiotique sans antibiogramme prend alors en compte la faible probabilité de la présence d'un mécanisme de résistance.

Le SCA se définit selon les éléments suivants: c, C, données pharmacocinétiques, spectre naturel de l'antibiotique (CMI modales, CMI 50%, CMI 90%) et enfin résultats cliniques.

Ainsi 4 classes sont proposées au clinicien par espèce bactérienne:

- HABITUELLEMENT SENSIBLE

- MODEREMENT SENSIBLE

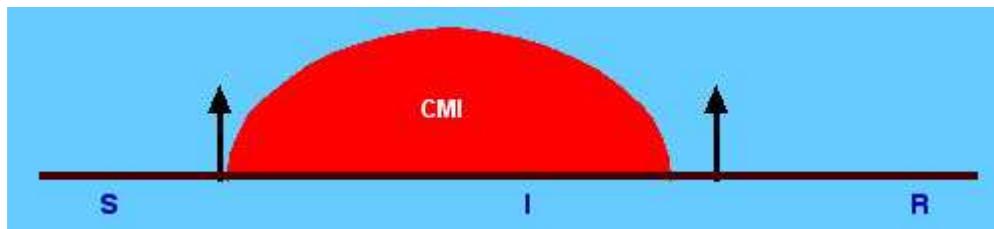
- INCONSTAMMENT SENSIBLE

- RESISTANTE

- Les espèces habituellement sensibles appartiennent au spectre naturel de l'antibiotique et le pourcentage de souches résistantes ne dépasse pas 10%. Le médecin peut choisir cet antibiotique pour une infection peu sévère et l'antibiogramme n'est pas nécessaire.



- Les espèces modérément sensibles sont naturellement peu sensibles à l'antibiotique mais ne possèdent pas de résistance acquise (CMI 50% comprises entre c et C). Le traitement impose de fortes doses ou il s'agit d'une infection de localisation particulière avec des concentrations très élevées de l'antibiotique.

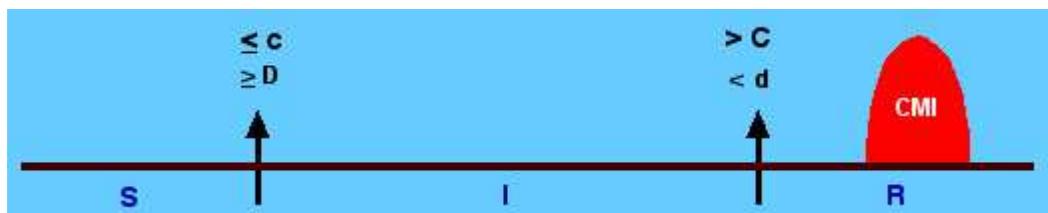


- Les espèces inconsistamment sensibles sont dans le spectre naturel de l'antibiotique mais la fréquence de résistance acquise dépasse 10%.



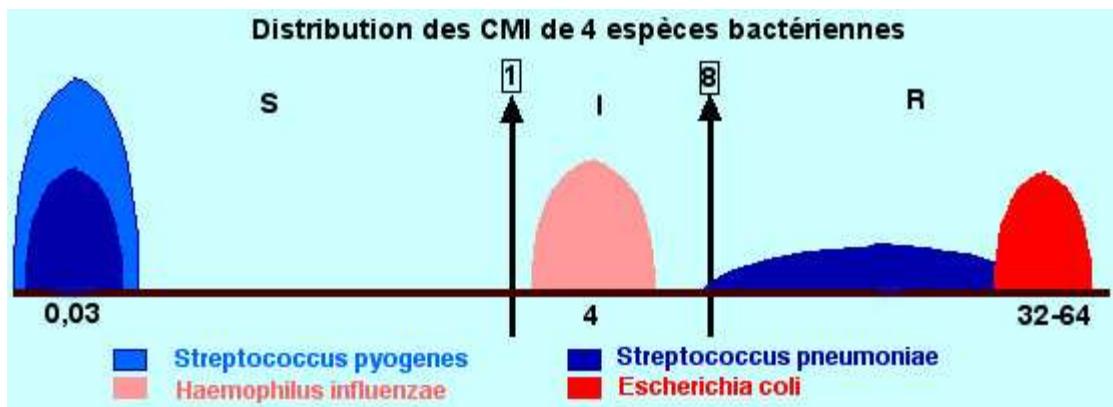
Sensibilité imprévisible, donc l'antibiogramme est nécessaire.
Risque d'échec clinique inacceptable

- Les espèces résistantes : fréquence de résistance > 90%, catégorie hétéroclite dont les espèces naturellement résistantes ou espèces habituellement sensibles mais le pourcentage de résistance est supérieur à 90% ou encore l'espèce est sensible *in vitro* mais résistante cliniquement.



Haut

Voici un exemple de SCA : érythromycine, antibiotique de la famille des macrolides



- . espèce habituellement sensible : *S. pyogenes* : CMI modale de 0,03 mg/l
- . espèce modérément sensibles : *H. influenzae* : CMI modale de 4 mg/l
- . espèce insconstamment sensible : *S. pneumoniae* : CMI modale de 0,03 mg/l mais 30-40% de souches résistantes en 2000
- . espèce résistante : *E. coli* : CMI modale de 32 à 64 mg/l : résistance naturelle incompatible avec un traitement

D - CONCLUSIONS

Demander un examen cyto-bactériologique avec antibiogramme est un acte quotidien, banalisé, donc la prescription n'est pas toujours nécessaire, compte tenu de la quasi-certitude d'avoir une souche sensible aux antibiotiques.

La corrélation clinique n'est pas toujours facile à établir entre les résultats d'activité in vitro (CMI) et ceux obtenus in vivo (chez le patient).

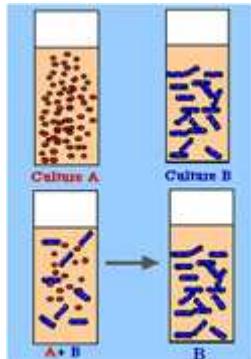
Malheureusement l'antibiogramme n'exploré que partiellement l'activité in vitro d'un antibiotique (effet bactériostatique mesuré par la CMI).

Les autres caractéristiques d'un antibiotique sont l'effet bactéricide, l'effet post-antibiotique (PAE) ou encore le phénomène de tolérance.

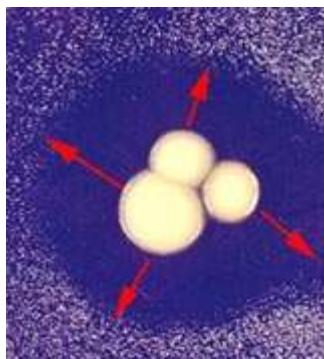
DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES

A – GENERALITES

* Découverte de l'antibiose = antagonisme bactérien avec la bactéridie charbonneuse (Pasteur et Joubert, 1877).



Voici un exemple d'antibiose entre E. coli et Brucella à partir de lysier liquide (INRA, 1966)



* Erlich P. suggéra l'intérêt possible des colorants de teinturerie dès 1885. Le prontosil ou rubiazol® premier futur sulfamide, fut découvert par G. Domagk en 1935.

* Découverte de la pénicilline G par A. Fleming en 1928: Transformation vitreuse de colonies de staphylocoques.

* Découverte des sulfamides en 1935

* Purification et usage en clinique de la pénicilline G en 1938-1942 (H. Florey, E. Chain).

* Le terme d'antibiotique a été proposé par R. Dubos (1940).

Cette grande étape du progrès médical entrainant la découverte ultérieure de centaines de molécules a engendré rapidement l'émergence de souches multirésistantes, d'où un usage des antibiotiques qui devra être de plus en plus raisonné.

B - DEFINITIONS D'UN ANTIBIOTIQUE

- WAKSMAN (1943) : " toutes les substances chimiques produites par des micro-organismes capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes"

- TURPIN ET VELU (1957): " Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certaines êtres pluricellulaires".

C - CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES

Pourquoi ?

→ faciliter le choix thérapeutique.

→ associer un mode d'action semblable ainsi qu'une modalité d'action et un spectre d'action, donc classification en famille au sein desquels peuvent exister des groupes ou sous-groupes. Néanmoins, il existe des antibiotiques "orphelins": acide fusidique, fosfomycine, triméthoprime.

Critères de classification ?

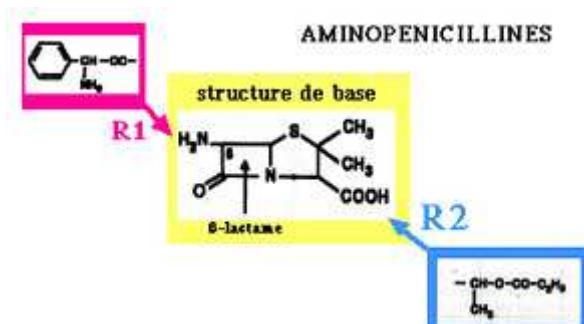
- . origine
- . nature chimique
- . mode d'action
- . modalité d'action
- . spectre

C - 1 . Origine : " élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse".

Intérêt historique. A l'heure actuelle, il s'agira souvent de molécules, le plus souvent obtenues par hémisynthèse.

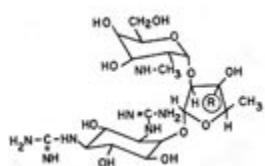
C - 2 . Nature chimique :

Très variable, souvent une structure de base comme le cycle β -lactame (famille des β -lactamines) sur laquelle il y a hémisynthèse.

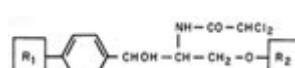


Donne souvent, le nom à la famille: Exemples

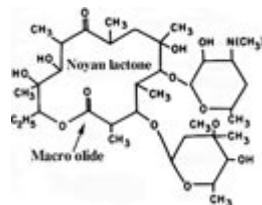
Aminosides



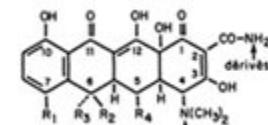
Macrolides



Phénicolés



Tétracyclines

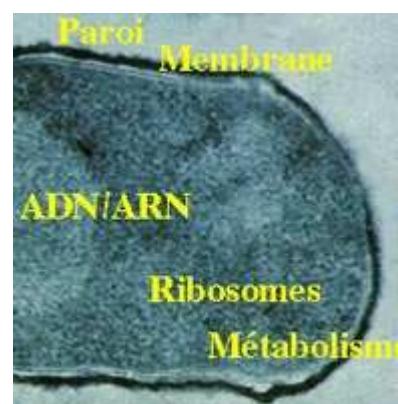


C - 3 . Modes d'action :

"L'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certaines êtres pluricellulaires".

Leur mode d'action bien que parfois imparfaitement connu, est d'une grande variabilité, voire complexité. Sa connaissance peut permettre de comprendre la synergie et les mécanismes de résistance naturelle et acquise.

Principaux modes d'action :



INTERFÉRENCE AVEC LA BIOSYNTHESE DE LA PAROI Fixation sur des cibles

- | | |
|---------------------|---|
| B-lactamines | → PLP (protéines fixant la pénicilline) |
| Vancomycine | → dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine |
| Fosfomycine | → phosphoénol pyruvate synthétase |
| Cycloséride | → D-alanine-D-alanine synthétase |

FIXATION SUR MEMBRANES Polypeptides cycliques → membranes externe/interne phospholipides

BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES Fixation sur des cibles

REPLICATION	
Quinolones	→ ADN-gyrase ou topoisomérase II (sous-unité A)
TRANSCRIPTION	
Rifamycines	→ ARN polymérase-ADN dépendante (sous-unité B)

TRADUCTION DES ACIDES NUCLEIQUES

Fixation sur des cibles

SOUS-UNITE 30S

Aminoglycosides → protéines (lecture ARNm perturbée)

SOUS-UNITE 50S

Macrolides → site A (aminoacyl) avec translocation perturbée

Tétracyclines → inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN

Acide fusidique → inhibition du facteur d'elongation EF-G

Phénicolés → inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN

→ inhibition de la peptidyltransférase

AUTRES (étapes du métabolisme intermédiaire)

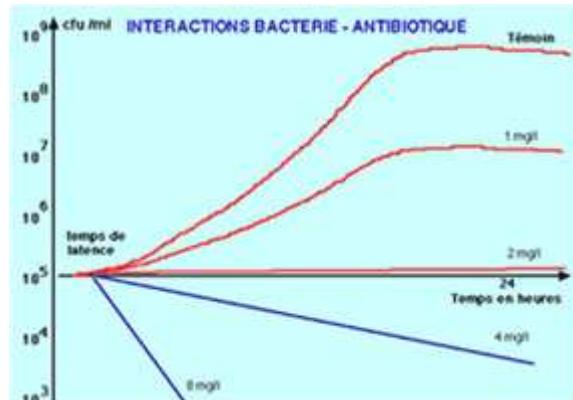
Sulfamides → dihydroptéroate synthétase (DHPS)

Triméthoprime → dihydroptéroate synthétase (DHFR)

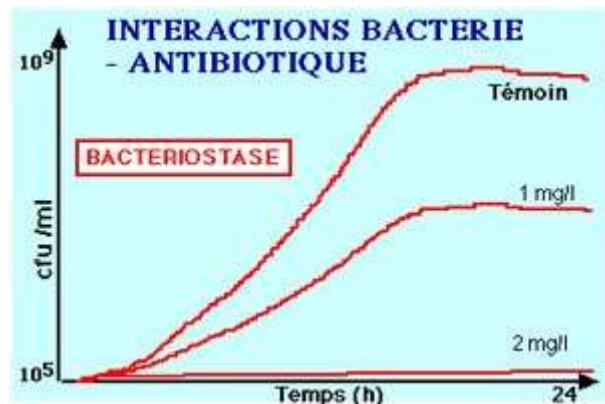
Isoniazide → analogues structuraux du NAD

C - 4 . Modalités d'action :

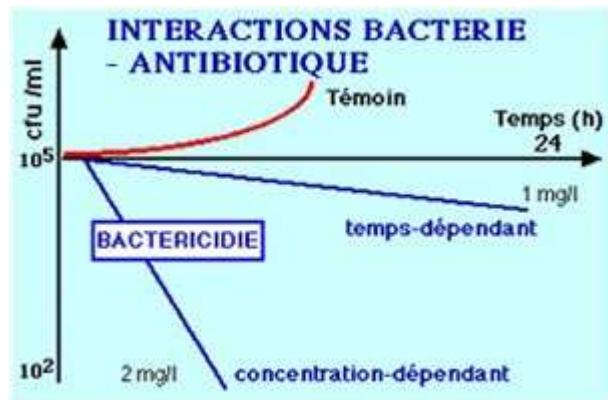
Etudions les interactions dans le temps entre des concentrations variables d'un antibiotique et d'une bactérie:



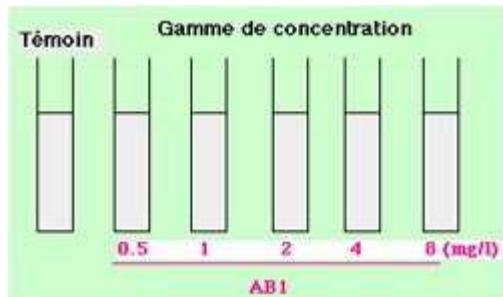
Bactériostase : Le nombre de bactéries viables après un temps d'incubation et de contact donné avec un antibiotique est inférieur à celui observé, en l'absence d'antibiotique (témoin), pour une culture incubée dans les mêmes conditions. Donc ralentissement ou arrêt de la croissance quantifiable en termes de CMI (concentration minima inhibitrice en mg/l)



Bactéricidie: Le nombre de bactéries tuées après un temps d'incubation et de contact donné avec un antibiotique est inférieur à celui déterminé au temps 0. Donc arrêt de la croissance et mortalité quantifiable en termes de CMB (concentration minima inhibitrice en mg/l)



CMI = Plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne étudiée, les conditions de culture étant standardisées.



CMB = Plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,99 %, les conditions de culture étant standardisées.



C - 5 . Spectre d'activité : Liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).

Le spectre sera évoqué lors de l'étude des classes thérapeutiques.



Spectre d'activité des antibiotiques selon la nature de la paroi bactérienne

Famille	Antibiotique	Gram +	Gram -
β -lactamines	Benzylpénicilline	+	-
	Oxacilline	+	-
	Ampicilline	+	+
	Imipénème	+	+
Aminosides	Gentamicine	+	+
	Tobramycine	+	+
Phénicolés	Chloramphénicol	+	+
Tétracyclines	Doxycycline	+	+
Macrolides	Erythromycine	+	-
Glycopeptides	Vancomycine	+	-
Quinolones	Acide nalidixique	-	+
Autres	Acide fusidique	+	-

D - CONCLUSION

La diversité des dénominations communes internationales (DCI) comme celles commerciales justifie une connaissance de la classification des antibiotiques, évitant par exemple une seconde prescription sans effet bénéfique.



L'abus de prescription des antibiotiques a amené à l'émergence de souches bactériennes nombreuses (prévalence importante) ou encore multirésistantes, nous ramenant dans une situation d'avant leur découverte.

La résistance bactérienne aux antibiotiques

Elle a souvent été rapportée dès l'usage d'un nouvel antibiotique en clinique comme indiqué ci-dessous pour les β -lactamines, principale famille. La résistance bactérienne est donc une fatalité mais d'importance variable selon le pays, l'espèce bactérienne et l'antibiotique, victime de son succès.

La résistance bactérienne dite acquise présente certaines caractéristiques **ci-dessous évoquées**:

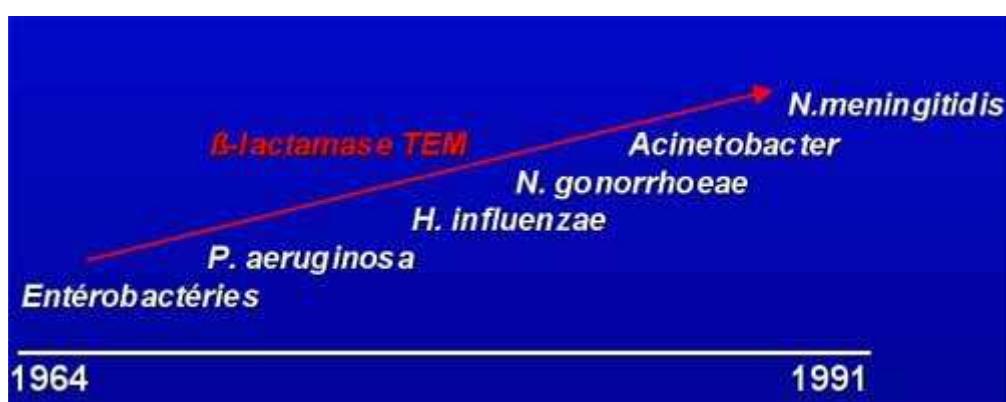
- Emergence rapide de quelques souches résistantes après l'introduction d'un antibiotique

Mise sur le marché	Résistance découverte
Pénicilline G (1942)	Staphylocoque doré (1943)
Méticilline G (1961)	Staphylocoque doré (1962)
Ampicilline G (1962)	Entérobactéries (1964)
Céphalosporines (1980)	Entérobactéries (1981)

- Fréquence de ce nouveau mécanisme rapidement en augmentation mais variable selon l'antibiotique. L'émergence de la résistance des pneumocoques à la pénicilline G constitue une exception, puisqu'elle est apparue en France en 1984, alors que la pénicilline G a été utilisée dès les années 45. Ce décalage, peu habituel, est en relation avec un déterminisme génétique plus complexe qu'à l'accoutumée (cf déterminisme génétique).



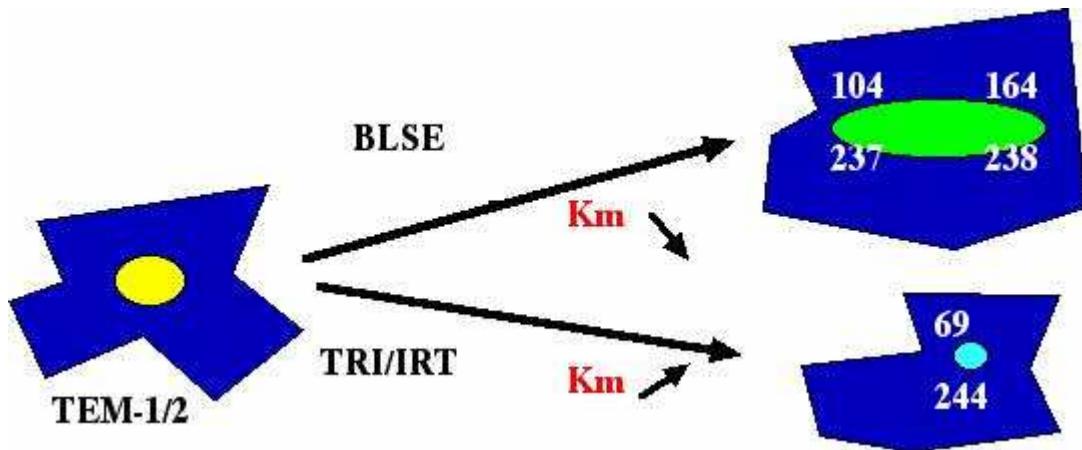
- Résistance transférable, car liée à la présence de gènes transférables comme ceux intégrés dans un plasmide, un intégron ou plus récemment avec l'individualisation de gènes cassettes.
 - Ces gènes transférables peuvent avoir une diffusion épidémique au sein du monde bactérien comme celui-ci codant la β -lactamase TEM identifiée dans des souches de *E. coli* et de *P. mirabilis*, deux ans après l'introduction de la première pénicilline à large spectre, l'ampicilline.



- L'addition de mécanismes de résistance est devenue monnaie courante dans le monde bactérien, aussi les bactéries deviennent de plus en plus résistantes, d'où l'appellation

de BMR pour Bactérie MultiRésistante.

- Enfin diverses observations illustrent le potentiel évolutif d'un gène de résistance bactérien avec, comme exemple, la découverte dans les années 85, des β -lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) et, quelques années après, celles TRI/IRT, résultats de mutations dans des positions différentes du gène codant pour l'enzyme précédemment citée TEM-1 ou TEM-2



La résistance acquise peut être donc, modulable **permettant au monde bactérien, une adaptation possible aux thérapeutiques, même les plus récentes.**

C - DEFINITIONS DE LA RESISTANCE

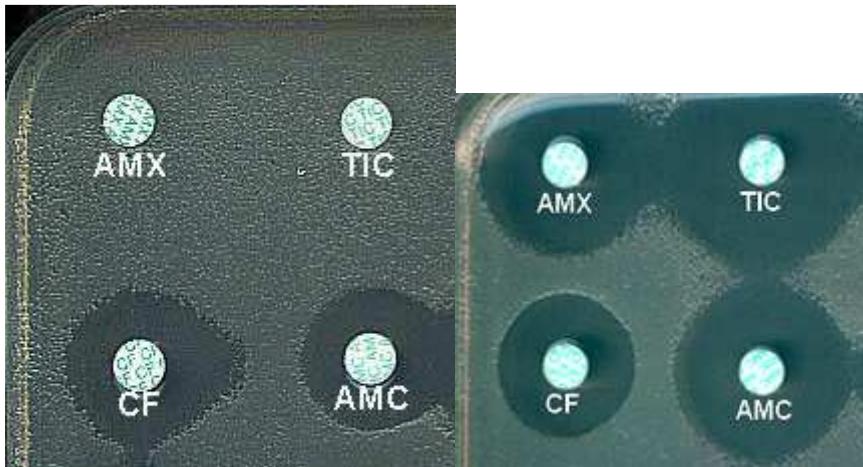
* naturelle : Existence d'un ou plusieurs mécanismes de résistance innés, donc propres à l'espèce. Elle permet de définir le spectre clinique d'un antibiotique.

Exemple: résistance en cocarde à la colistine de *Serratia marcescens*



* acquise : acquisition d'un mécanisme de résistance pour une souche d'une espèce habituellement sensible

Exemple: résistance acquise aux pénicillines (amoxicilline ou AMX) et ticarcilline ou TIC) chez *E. coli* (à droite souche sauvage)



* clinique : expression de la résistance *in vivo* par l'échec thérapeutique

Exemple: résistance clinique à la pipéracilline (PIP) lors de pneumopathie à *Klebsiella pneumoniae* de phénotype "pénicillinase de bas niveau", résistante à l'amoxicilline (AMX) et à la ticarcilline (TIC)

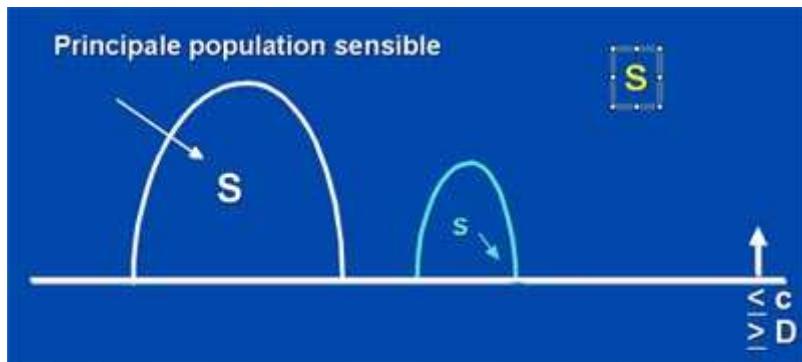


* croisée : fait référence au spectre d'inactivation lié à un même mécanisme de résistance vis-à-vis de divers antibiotiques appartenant à la même famille ou sous-groupe. Cette notion est utilisée lors de lecture interprétative de l'antibiogramme.

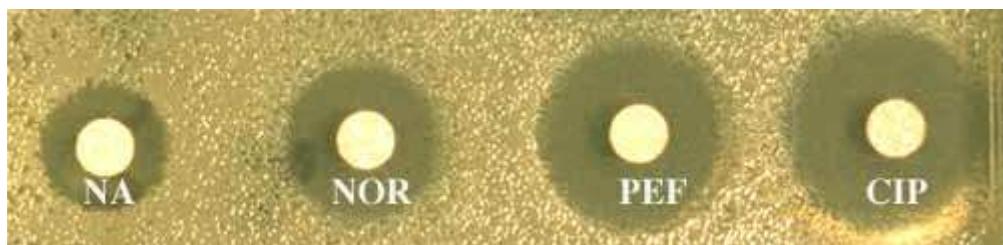
* chromosomique : résistance liée au chromosome. Il s'agit aussi d'expliquer le déterminisme génétique d'une résistance naturelle ou acquise dont le ou les gènes est ou sont liés au chromosome (mutation)

* génétique : modification du patrimoine génétique entraînant des augmentations limitées de CMI (X 3-5), souvent peu apparente

De légères modifications du patrimoine génétique d'une bactérie peuvent entraîner une moindre sensibilité à un antibiotique ou plusieurs de la même famille ou de plusieurs selon le mécanisme. Celles-ci sont révélées lors de la détermination de CMI ou par une diminution des diamètres d'inhibition dans un antibiogramme par diffusion (méthode des disques)(cf antibiotique IV). L'échec clinique n'est pas rapporté pour de telles souches de sensibilité diminuée.



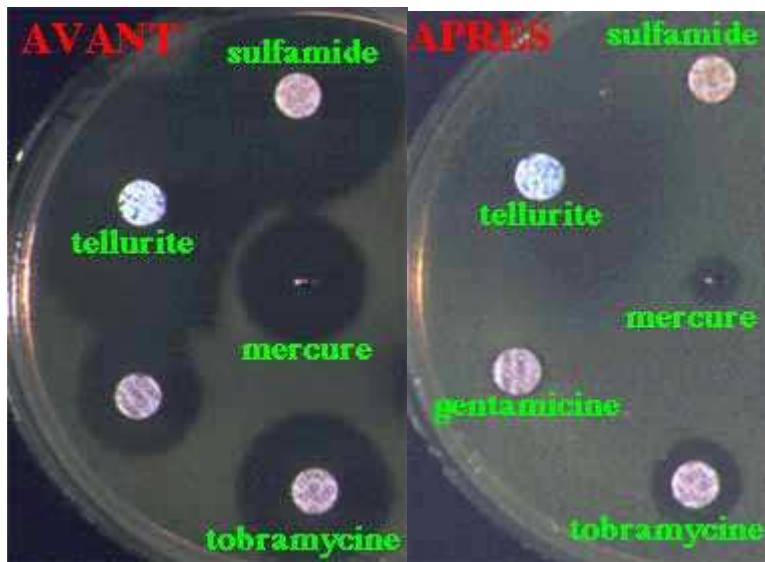
Exemple: *E. coli* et imperméabilité par rapport aux quinolones (NA, acide nalidixique)



* extrachromosomal : La résistance est liée à la présence d'un fragment d'ADN, le plus souvent en position cytoplasmique tel un ADN plasmidique révélé après une électrophorèse sur gel (cf plasmide ci-dessous):

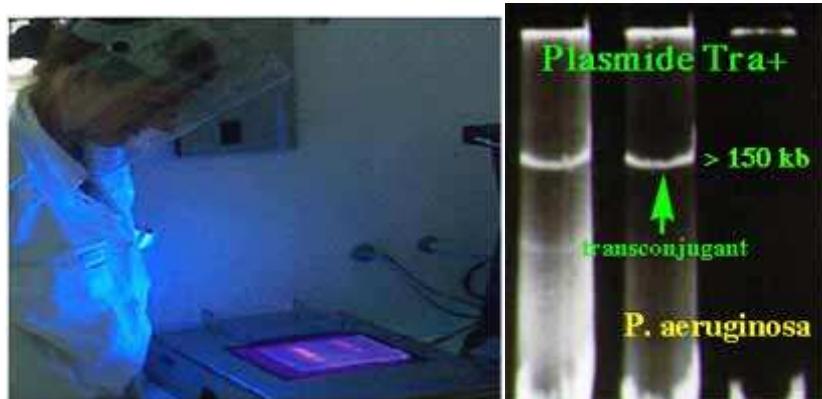
* associée : résistance médiée par un plasmide à des antibiotiques de familles différentes (cf résistance plasmidique transposable)(cf génétique IV)

Exemple : Chez *P. aeruginosa*, le plasmide (montré ci-dessous) est responsable de plusieurs marqueurs de résistance aux antibiotiques mais aussi aux antiseptiques (mercure) ou encore au tellurite.



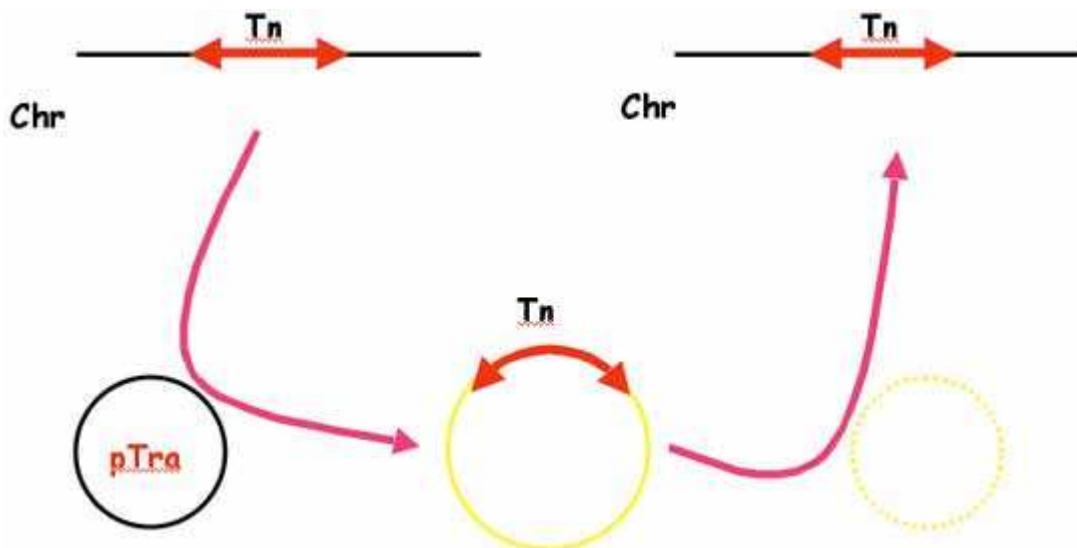
* plasmidique: support génétique de la résistance (cf extrachromosomique ci-dessus).

Exemple: Contenu plasmidique d 'une souche de *P. aeruginosa* (à gauche) et de *E. coli* réceptrice avant (à droite) et après transfert (au milieu) par conjugaison. Le plasmide de plus de 150 kD confère la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques ou encore aux antiseptiques.



* transposable : localisée sur des transposons (Tn) ou éléments génétiques mobiles, situés soit dans le chromosome, soit sur un plasmide.

Exemple: Mobilisation d'un transposon (Tn) d'une bactérie donatrice à gauche à une réceptrice par conjugaison (schéma selon Poyart C.) .

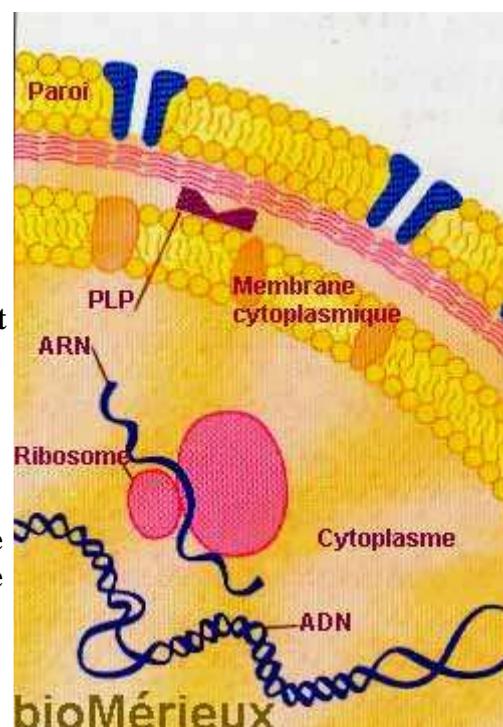


D - MECHANISMES BIOCHIMIQUES :

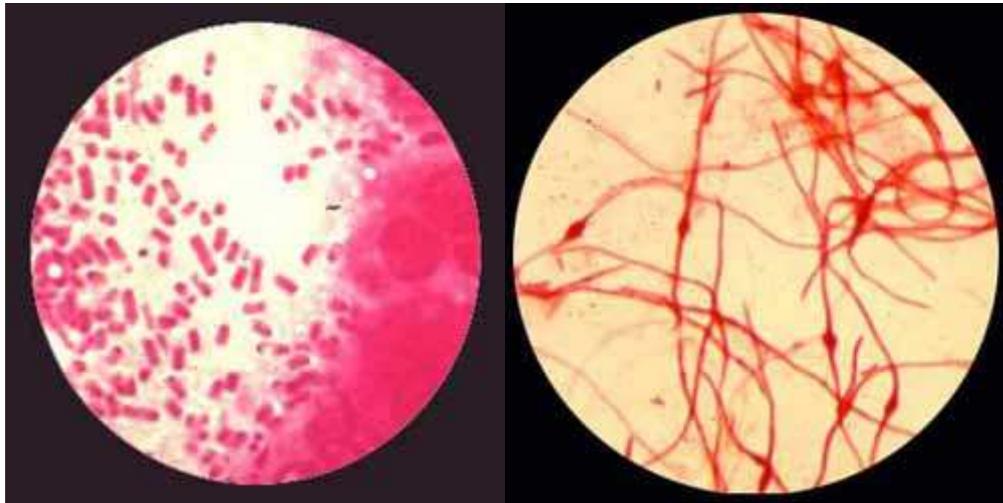
Préciser le déterminisme biochimique de la résistance amène à comprendre la résistance croisée entre antibiotiques de la même famille ou encore à imaginer de nouvelles molécules plus actives, car plus hydrophiles, donc ayant une meilleure diffusion à travers les porines chez une bactérie à Gram-négatif ou une meilleure affinité sur ses cibles telles certaines protéines du ribosome (macrolides).

A l'inverse, le mode d'action des antibiotiques peut permettre une meilleure compréhension des mécanismes de résistance possibles. Depuis quelques années, cinq mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer la résistance naturelle ou surtout acquise des bactéries aux antibiotiques.

Prenons l'exemple des β -lactamines chez un bacille à Gram-négatif, qui pour agir, doivent traverser la membrane externe ou la paroi au niveau des porines (motif en bleu), puis traverser l'espace cytoplasmique et enfin se fixer sur des cibles ou protéines liant la pénicilline (PLP ou PBPs en marron) qui sont situées principalement au niveau de la membrane cytoplasmique. Cette fixation amène à une inhibition de celles-ci (transpeptidase, transglycosylase....) entraînant des modifications morphologiques de type filaments (cf ci-dessous) ou au contraire formes sphéroïdes. Le résultat final est une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (couche interne de la paroi en rose ici) avec quelquefois, une lyse finale.



Exemple: modification morphologique (à droite) d'une souche de *E. coli* urinaire lors d'un traitement par une pénicilline à large spectre.

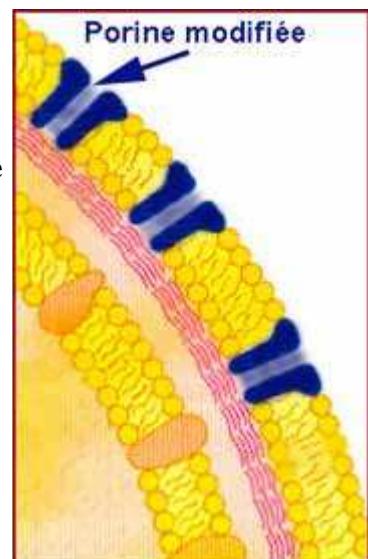


Les mécanismes de résistance individualisés à l'heure actuelle, en prenant comme exemple les β -lactamines, sont donc, les suivants:

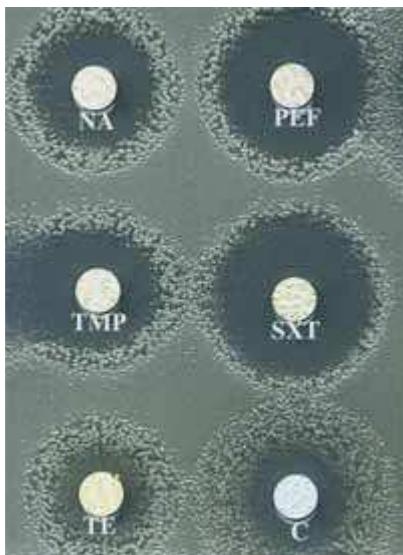
* Interférence avec le mécanisme de transport de type imperméabilité

Les porines (Omp ou Opr) sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. Le dysfonctionnement ou la perte de l'une d'entre elles peut entraîner une augmentation de CMI d'un facteur 4 à 8 de divers antibiotiques comme β -lactamines, acide nalidixique (NA), triméthoprime (TMP), fosfomycine, tétracycline (TE) ou encore chloramphénicol (C) (Exemple ci-dessous).

Chez d'autres entérobactéries telle *Enterobacter cloacae* ou *E. aerogenes*, la perte d'une porine (38 kD) associée à une hyperproduction de la β -lactamase chromosomique de type céphalosporinase permet l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes tel imipénème.

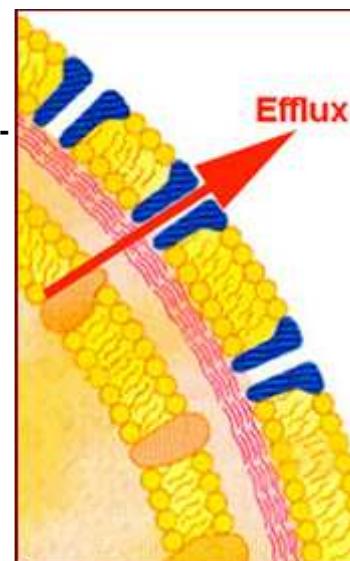


Exemple d'une souche de *E. coli* imperméable



* Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux

Les mécanismes d'efflux observés chez les bactéries à Gram-positif ou à Gram-négatif, en particulier *P. aeruginosa* sont de nature différente (famille MFS, SNR, RDN....), en particulier à l'origine chez cette dernière espèce où ont été individualisés les systèmes ayant des répercussions variables en termes de CMI vis-à-vis de divers antibiotiques dont les β -lactamines avec les protéines MexA-B/OprM, MexC-D/OprJ, MexE-F/OprN.....



Exemple d'activation du système d'efflux MexA-B/OprM chez *P.aeruginosa* avec la sensibilité diminuée à la ticarcilline (TIC) associée ou non à l'acide clavulanique (TCC) comparée à celle de la pipéracilline (PIP)

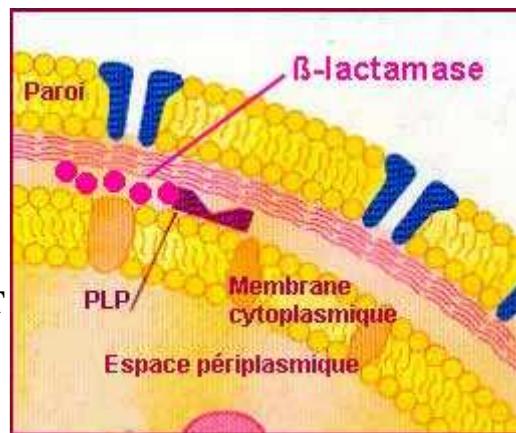


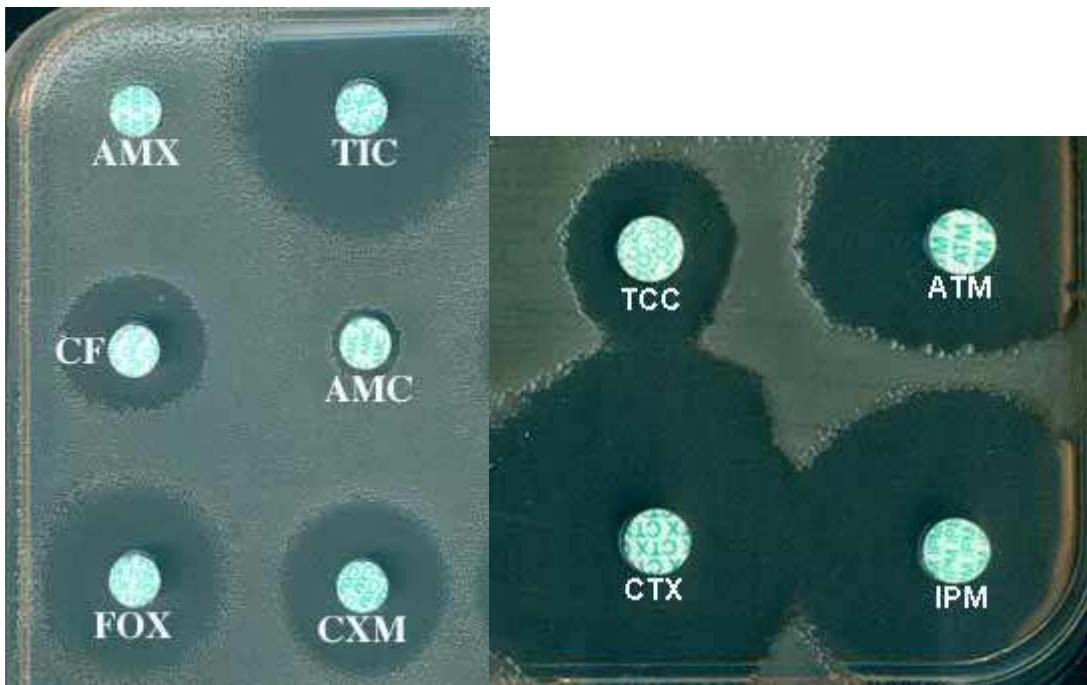
* Inactivation ou détoxification enzymatique

Le mécanisme de résistance naturelle ou acquise par inactivation ou détoxification enzymatique est important et très varié ainsi qu'en témoignent tout particulièrement, les β -lactamases, au moins 350 enzymes maintenant identifiées. La résistance par ce type de mécanisme à d'autres familles d'antibiotiques est bien connue comme pour les aminoglycosides avec les enzymes de AAC, ANT et APH (cf tableau ci-dessous).

Voulez-vous voir une animation:
<http://www.fda.gov/cvm/antiresistvideo.htm>

Exemple de phénotype " céphalosporinase inducible" chez une souche d'entérobactérie

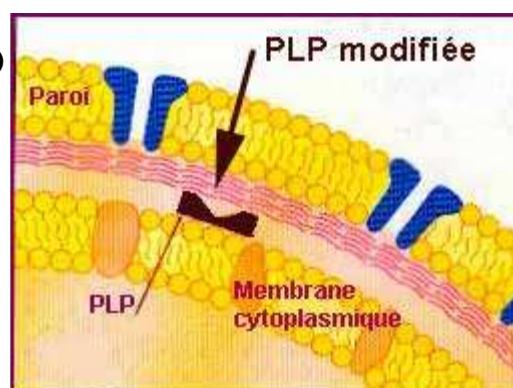




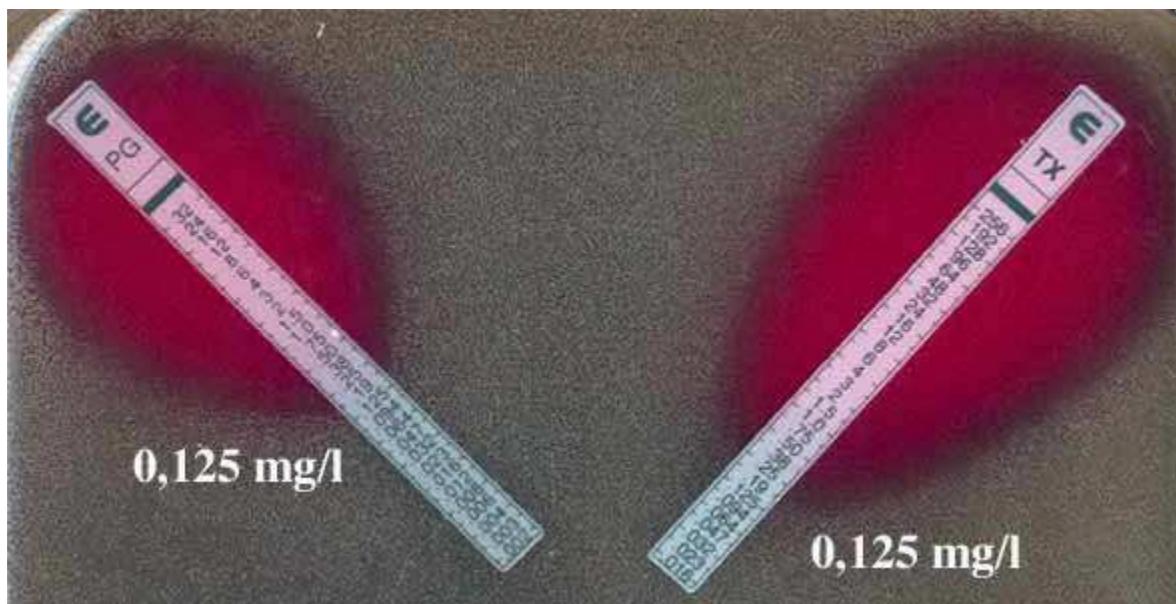
Le caractère "inductible" est réperable par un antagonisme ou perte d'activité liée à l'hyperproduction de la β -lactamase entre CF (céfalotine) et FOX (céfoxitine) mais surtout entre IPM (imipénème) et CTX (céfotaxime) ou ATM (aztréonam).

* Modification d'affinité de la cible

Ce mécanisme est en relation avec une modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles de type PLP ou PBP (Penicillin Binding Protein) comme chez *Streptococcus pneumoniae* définissant une résistance de niveau variable : BNR (bas niveau de résistance) et HNR (haut niveau de résistance). La résistance des entérocoques aux pénicillines telle l'ampicilline peut être en relation avec une hyperproduction de PLP d'affinité médiocre telle PLP5. La résistance à d'autres familles d'antibiotiques est indiquée dans un tableau de synthèse rapporté ci-dessous.

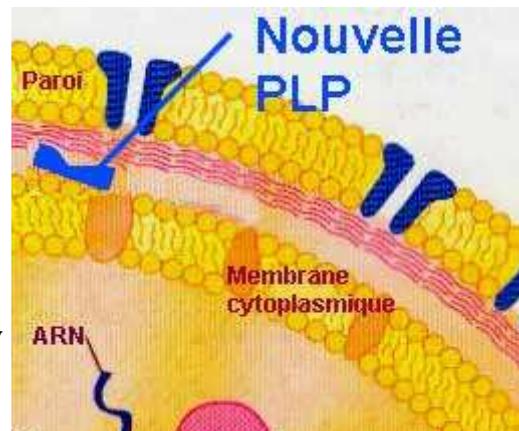


Exemple de diminution de CMI de la pénicilline G (PG) et du céfotaxime (TX) mesurées par le E-test chez une souche de *S. pneumoniae* BNR



* Substitution de cible

Ce mécanisme est de moindre importance dans le monde bactérien. Cependant, l'exemple majeur est la résistance intrinsèque ou méticillino-résistance de *Staphylococcus aureus* qui est liée d'une part, à la présence d'une nouvelle PLP de faible affinité, dénommée PLP2a et d'autre part à son hyperproduction. La conséquence clinique est importante, car il y aura résistance croisée entre β-lactamines.



Le tableau ci-dessous résume divers exemples de résistance naturelle ou acquise à diverses familles d'antibiotiques :

Mécanismes	Famille d'antibiotique	Protéines impliquées
Imperméabilité	B-lactamines, macrolides, tétracy-clines, quinolones, fosfomycine, chloramphénicol.....	Omp, Opr telle OprD2
Efflux	β-Lactamines Macrolides Lincosamides Tétracyclines	Mex, Mar, AcrAB-TolC MFS (MefA), MsrA, ABC LsA TET(A)-(L)

Inactivation	β-Lactamines Aminoglycosides Aminoglycosides Aminoglycosides Macrolides Lincosamides Streptogramines Chloramphénicol	β-Lactamases (> 350) Phosphotransférases (APH) Nucléotidyltransférases (ANT) Acétyltransférases (AAC) Phosphotransférases (<i>mphA-C</i>) Nucléotidyltransférases (linA, linB,...) Acétyltransférases (vatA-E), lyases (vgbA) Acétyltransférases (CAT)
Affinité	Aminoglycosides Macrolides Quinolones- Fluoroquinolones Tétracyclines	Protéines L22..... Méthylases (Erm) Topoisomérases: ADNgyraseA/B, ParC/E TET(M)-(T)
Substitution	β-Lactamines Glycopeptides Sulfamides Triméthoprime	PLP2a Van DHFR (dihydrofolate réductase) DHPS (dihydroptéroate synthétase)

E - MECANISMES GENETIQUES:

Le déterminisme génétique de la résistance naturelle et acquise est de mieux en mieux connu mais il présente de nombreux aspects comme déjà évoqué par les définitions de la résistance : chromosomique, extra-chromosomique ou plasmidique mais aussi transposable.

- Si la mutation peut affecter n'importe quel ADN (chromosomique ou plasmidique), elle peut être individualisée soit au niveau du gène de régulation ou un équivalent (promoteur) soit au niveau du gène de structure par exemple codant pour une β-lactamase (voir ci-dessous les enzymes de type BLSE et TRI/IRT). La modification de l'ADN peut être soit un simple changement de base (mutation ponctuelle) soit de plusieurs (déletion, insertion comme d'une courte séquence ou IS).

- L'acquisition d'ADN donc d'éventuels gènes de résistance s'effectue, le plus souvent par conjugaison ou sexualité bactérienne. Ces gènes sont portés sur diverses structures de type plasmide, intégron et gène cassette. Les analyses de séquences actuelles conduisent à la découverte de nouveaux aspects génétiques sur la résistance avec les CR et leurs probables recombinases.

Le tableau ci-dessous illustre par quelques exemples :

β-lactamases (bla): Aspects génétiques de la résistance	
Modifications du gène de structure	
- Substitution	Bla à spectre élargi/étendu (BLSE)
- Substitution	Bla résistantes aux inhibiteurs (TRIMRT)
- Déletion	Céphalosporinase à spectre élargi
- Duplication	Céphalosporinase à spectre élargi
Modifications de gènes de régulation	
- Substitution dans le promoteur	Hyperproduction bla OXY (<i>Klebsiella oxytoca</i>)
- Substitution dans le gène <i>ampD</i>	Hyperproduction bla AmpC (<i>Enterobacter</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>P.aeruginosa</i> ...)

- Il est classique de dire que la résistance chromosomique est d'incidence faible, de l'ordre de 10 à 20% alors que la résistance plasmidique est beaucoup plus importante, de l'ordre de incidence de 80%

F - CONCLUSIONS

A partir des années 1945, les antibiotiques ont révolutionné nos pratiques médicales, mais ils sont aujourd'hui en danger suite à une utilisation excessive et trop fréquente, même en dehors du domaine purement médical. Les bactéries échangent divers gènes dont ceux de la résistance et échappent à l'action des antibiotiques. Comme la découverte de nouveaux antibiotiques est devenue très hypothétique, il convient de mettre en oeuvre au plan planétaire, diverses stratégies comme la surveillance de la résistance au plan européen.

CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES

A - ANTIBIOTIQUES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE

β -lactamines I : Pénames, carbapénèmes et oxapénames (ou clavames)

β -lactamines II : Céphèmés et oxacéphèmés

Autres antibiotiques : Fosfomycine, Glycopeptides, Bacitracine

B - ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LES ENVELOPPES MEMBRANAIRES

Polymyxines

Gramicidines et tyrocidine

C - ANTIBIOTIQUES INHIBITEURS DES SYNTHÈSES PROTÉIQUES

Aminosides ou aminoglycosides (aminosides-aminocyclitols)

Macrolides, Kétolides, Lincosamides, Streptogramines (MLS)

Tétracyclines

Chloramphénicol

Acide fusidique

Oxazolidinones

D - ANTIBIOTIQUES INHIBITEURS DES ACIDES NUCLÉIQUES

Rifamycines

Quinolones

Novobiocine

5-Nitroimidazoles

Nitrofuranes

E - ANTIBIOTIQUES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DES FOLATES

Sulfamides

2-4-Diaminopyrimidines

8-Hydroxyquinoléines

Classification des bactéries :

coques gram positif					
morphologie	genre	espèce	nom courant	habitat	pouvoir pathogene
en amas	Staphylococcus	aureus epidermidis	staphylo doré staphylo blanc	peau muqueuses	suppuration
en chaînettes	streptococcus	a, c, g b d	strepto hémolytique enterocoque	pharynx voies génitales intestin	streptococcies synd.post strepto infections néonatales inf. urinaire, dig endocardites ...
diplocoques	streptococcus	pneumoniae	pneumocoque	voies respiratoires	pneumonies meningites otites

coques gram négatif					
morphologie	genre	espèce	nom courant	habitat	pouvoir pathogène
diplocoques	neisseria	gonorrhoeae	gonocoque	voies génitales	blennorrhagie, MST
		meningitidis	meningocoque	pharynx	méningites cérébrospinales

bacilles gram positif					
morphologie	Genre	espèce	nom courant	habitat	pouvoir pathogène
"petits"	listeria	monocytogenes		ubiquitaire	Méningites infections néonatales lésions cutanées
		erysipelothryx	insidiosa	animaux (porc)	diphthérie
	corynebacterium	diphtheriae		oropharynx de l'homme	non pathogènes
		pseudodiphtheriae		peau et muqueuses	
"grands"	Bacillus	anthracis	bacille du charbon	spores dans les sols, dans les végétaux, dans les fourrures	charbon non pathogènes
		autres			

morphologie				nom courant	habitat	pouvoir pathog
bactéries de forme spiralée				Treponème	homme rongeurs et animaux domestiques poux, tiques poux, tiques homme	syphilis leptospirose fièvres récurrentes maladie de LYM sodoku

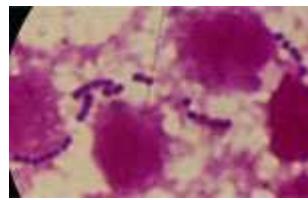
genre	espece				
treponema	pallidum				
leptospira	icterohemorragiae				
borrelia	recurrentis				
	burgdorferi				
spirillum	minus				

Mycoplasmes					
morphologie	Genre	Espèce	nom courant	habitat	pouvoir pathogene
pas de paroi	Mycoplasma	pneumoniae autres			pneumocystoses "atypiques" infections génitales

Mycobactéries					
morphologie	genre	espèce	nom courant	habitat	pouvoir pathogene
B.A.A.R.	mycobacterium	tuberculosis bovis B.C.G leprae	bacille de KOCH (BK) bacille de HENSEN	homme homme et animaux vaccin homme	tuberculose tuberculose lèpre

anaérobies stricts					
morphologie	genre	espèce	nom courant	habitat	pouvoir pathogene
coques gram négatif	veillonella				
coques gram positif	peptostreptococcus				
bacilles gram positif	clostridium	tetani		spores dans le sol	tetanos
		perfringens		intestin et sol	gangrène gazeuse
		botulinum		terre et aliments	botulisme
bacilles gram negatif	bacteroïdes				suppurations
	prevotella				suppurations
	actinomyces				suppurations

STREPTOCOQUES-ENTÉROCOQUES



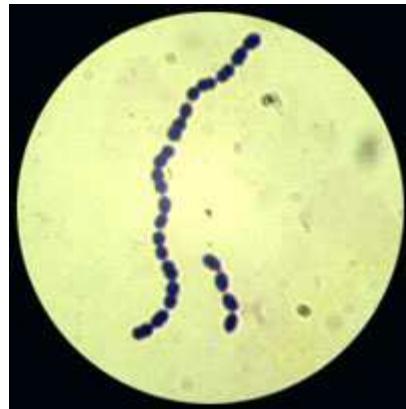
A - GENERALITES

1 - Définition

Les streptocoques sont définis comme des cocci à Gram positif disposés, le plus souvent en chaînettes

. qui ont un métabolisme anaérobie, cependant la plupart des souches tolèrent l'oxygène et peuvent être cultivées *in vitro* en atmosphère aérobie.

. qui sont exigeants en nombreux facteurs de croissance: le sang ajouté aux géloses permet leur multiplication *in vitro*. Cette multiplication (ou croissance) peut être favorisée par l'apport de CO₂ ou par une atmosphère anaérobie.



Ces caractères morphologiques et métaboliques les distinguent des staphylocoques. Les entérocoques sont proches des streptocoques (même morphologie et métabolisme anaérobie), mais ils peuvent se multiplier sur des milieux de culture ordinaires (non additionnés de sang).

En microbiologie médicale on classe les streptocoques d'après leurs caractères pathogènes et leurs caractères biologiques, y compris leur sensibilité aux antibiotiques:

2 - Pouvoir pathogène

Les streptocoques pathogènes sont responsables d'infections aigües, ce sont

S. pyogenes ou streptocoques β-hémolytiques du groupe A,

S. agalactiae ou streptocoques β-hémolytiques du groupe B

S. pneumoniae ou pneumocoques.

Lorsque ces bactéries pathogènes sont présentes transitoirement et en faible quantité sur les muqueuses ou les téguments, on parle de "portage" et de porteurs

sains.

Parmi les streptocoques, les espèces commensales **appartiennent à la flore normale des muqueuses de l'homme**. Ce sont les streptocoques oraux (**commensaux de l'oropharynx**) et les streptocoques du groupe D (**commensaux de l'intestin**).

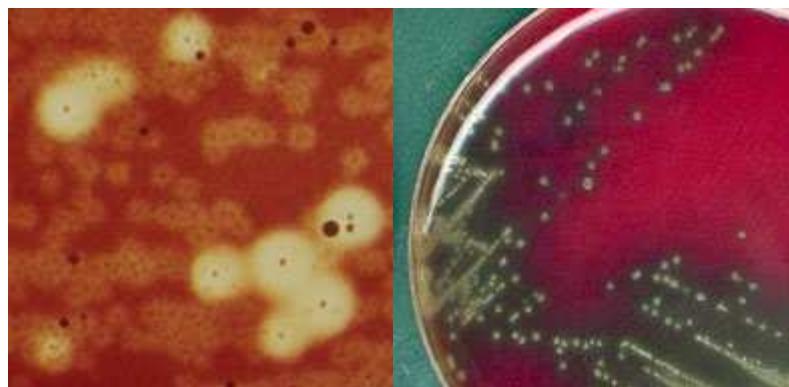
Dans certaines circonstances ces bactéries commensales deviennent pathogènes opportunistes et peuvent être responsables d'infections, notamment de septicémies ou d'endocardites.

3 - Classification et caractères d'identification au laboratoire

Les différentes espèces de streptocoques peuvent être classées et identifiées d'après les 5 types de caractères suivants.

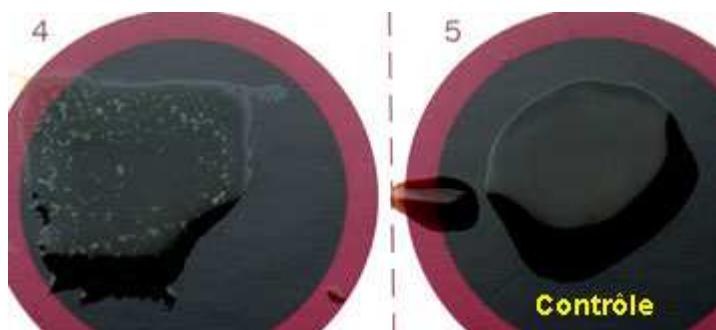
La morphologie et le groupement des cocci, la présence d'une capsule et l'aspect des colonies.

Le type d'hémolyse produite sur gélose au sang: β -hémolyse, a-hémolyse ou absence d'hémolyse.



La présence ou non d'un antigène lié à un polysaccharide de paroi et spécifique de groupe.

Parmi les groupes antigéniques désignés par Rebecca Lancefield par des lettres (de A à H, et de K à V), les groupes A, B, C ou G caractérisent les espèces de streptocoques β -hémolytiques les plus pathogènes. Les streptocoques a-hémolytiques ou non hémolytiques appartiennent à d'autres groupes ou sont non-groupables, et sont habituellement commensaux.



Un ensemble de caractères biochimiques.

Quelques tests suffisent à compléter l'identification des espèces β -hémolytiques des groupes A, B, C ou G, et celle des pneumocoques.

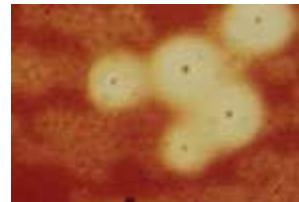
Une galerie complète de tests est nécessaire pour identifier les autres espèces.



La sensibilité aux antibiotiques. La pénicilline G est active sur les streptocoques, mais à des degrés divers selon les espèces. Certaines souches de pneumocoques ont acquis une résistance relative aux pénicillines.

B - LES STREPTOCOQUES β -HEMOLYTIQUES OU STREPTOCOQUES PYOGENES.

Ils sont reconnus par l'hémolyse de type β (complète et à bords nets, détruisant totalement les globules rouges incorporés dans la gélose) qui entoure des colonies de petite taille. Ils comprennent plusieurs espèces responsables de différentes infections aiguës.



1 - *Streptococcus pyogenes* ou streptocoques β -hémolytiques du groupe A

Historique

- Fièvres puerpérales connues avant même que leur étiologie bactérienne soit confirmée par Pasteur (1822-1895) et par Koch (1843-1910).
- Rebecca Lancefield caractérise l'antigène du groupe A et le facteur majeur de pathogénicité, la protéine M (1928)
- Scarlatine maligne, associée à un syndrome toxique, Troussseau, Cliniques de l'Hôtel Dieu, 1873.
- Syndrome de Meleney = cellulite gangrénouse ou fasciite nécrosante (1924).
- Recrudescence des infections graves en Europe et aux USA (début des années 1980) :

Septicémies avec syndrome de choc toxique streptococcique - redéfini en 1987 - décès dans 30 % des cas

Cellulites gangrénouses ou fasciites nécrosantes = Dermo-hypodermites nécrosantes

- Angleterre et Pays de Galles : 25 cas de fasciites nécrosantes (18 décès) (Janv-Juin 1994).

- Norvège : nombre de cas (janv-Juin, 1994) x 2 par rapport à 1993

En France : augmentation des infections sévères

Septicémies à *S. pyogenes* estimées à 1000 cas / an en 2000.

Conférence de consensus en janvier 2000 sur les dermo-hypodermites nécrosantes

Habitat et pouvoir pathogène

Ce sont des bactéries strictement humaines, elles se propagent par voie aérienne ou par contact direct dans l'entourage des enfants ou des adultes atteints de pharyngites ou de lésions cutanées. Elles peuvent provoquer des épidémies.

On distingue les infections streptococciques suppurées qui peuvent être invasives ou non invasives et les complications post-streptococciques qui surviennent à distance de l'infection aiguë, tel que le rhumatisme articulaire aigu et la glomérulonéphrite aiguë.

Fréquence des infections dues à *S. pyogenes* : Enquête nationale -1995

Types d'infection	Fréquence (%)
Infections non invasives (79%) :	
Lésions cutanées	48
Angines	25
Oties	2-3
Vulvo-vaginites	3
Conjonctivites	<0,5
Infections invasives (21 %) :	
Erysipèles	5
Dermo-hypodermites nécrosantes (ex : cellulites et fasciites)	5
Septicémie d'origine cutanée	3
Pleuro-pneumopathies	2
Arthrites	2
Bactériémies isolées	1
Péritonites	1
Ostéomyélites	1
Autres localisations	1

Les infections non invasives : La plupart sont traitées en ville et représentent plus de 80 % des maladies dues à *S. pyogenes* et concernent les muqueuses ou les téguments. Les pharyngites ou angines sont les manifestations les plus fréquentes des infections streptococciques aiguës. *S. pyogenes* est la principale bactérie responsable des angines érythémato-pultacées (rouges) ou érythémato-pultacées (rouges avec des points blancs) qui touchent surtout les enfants à partir de 4 ans et les jeunes adultes. La scarlatine est une angine streptococcique accompagnée d'une éruption cutanée due à la sécrétion de toxine.

Parmi les infections cutanées, l'impétigo peut être provoqué soit par *S. pyogenes*, soit par *Staphylococcus aureus*; les deux espèces peuvent aussi être associées.

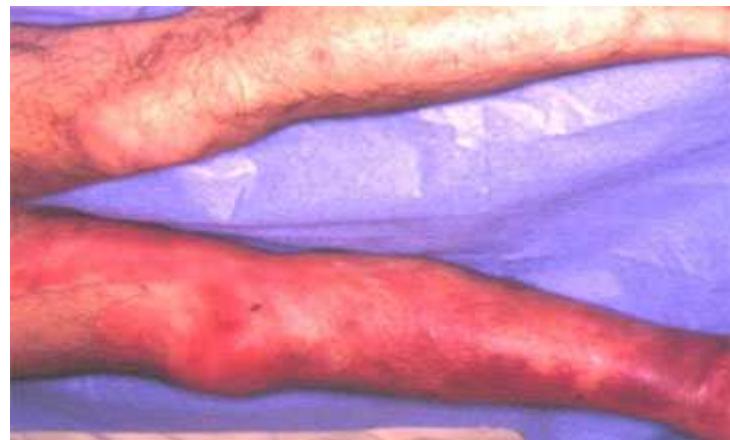
Les infections sévères et invasives

L'érysipèle, il survient surtout chez les sujets âgés et les personnes souffrant d'insuffisance lymphatique. La lésion cutanée apparaît rouge, chaude et douloureuse. La lésion est limitée par un bourrelet résultant de la réaction inflammatoire qui tend à juguler le phénomène infectieux. La positivité des hémodcultures témoigne du passage dans le sang des streptocoques et donc de leur caractère invasif.



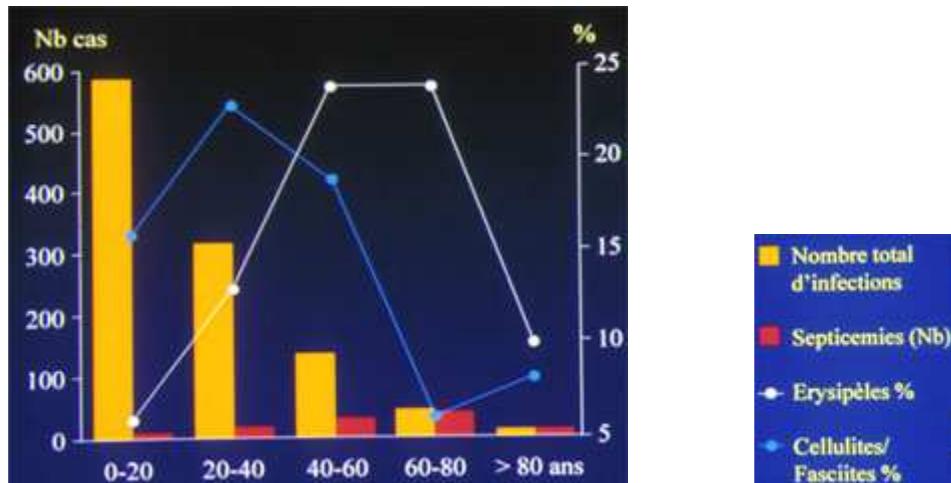
Le traitement comporte la pénicilline G. La sévérité de cette infection est liée au caractère septicémique et à la fréquence des récidives.

La cellulite extensive ou fasciite nécrosante est une lésion plus profonde appelée désormais en France : dermo-hypodermite nécrosante. La nécrose tissulaire peut atteindre l'aponévrose ou même la dépasser. La lésion cutanée apparaît rouge, chaude, très douloureuse et mal limitée. Son extension peut nécessiter l'excision chirurgicale des tissus nécrosés ou même une amputation d'un membre.



Cette infection survient sur des personnes de tout âge, sans facteur prédisposant. Elle peut s'accompagner d'un syndrome de choc toxique souvent mortel.

Répartition selon l'âge



Dans certains cas les premières manifestations se limitent à des douleurs intenses sans lésion cutanée évidente, le diagnostic repose alors sur l'isolement du streptocoque β-hémolytique du groupe A par hémoculture et à partir des tissus profonds.

Habituellement, la cellulite périorbitaire n'est pas nécrosante



D'autres septicémies peuvent être à point de départ pulmonaire ou génitale; un portage vaginal de streptocoque est sans conséquence, sauf au moment d'un accouchement où il peut être à l'origine d'une septicémie puerpérale. Dans certains cas on parle de bactériémie isolée du fait d'un syndrome infectieux avec hémoculture positive, sans que l'on reconnaisse ni porte d'entrée du streptocoque, ni localisation secondaire.

Le syndrome de choc toxique streptococcique est associé à des souches isolées du sang ou des prélèvements tissulaires qui sécrètent des toxines érythrogènes de type A ou C, agissant comme super-antigène. Il est mortel dans plus de 90% des cas, malgré la prise en charge en réanimation et l'antibiothérapie.

Les complications post-streptococciques

Rhumatisme articulaire aigu

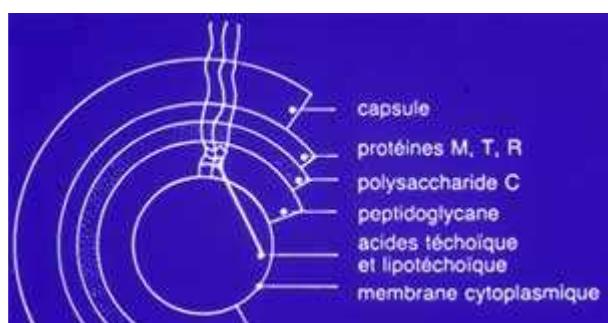
Glomérulonéphrite aiguë

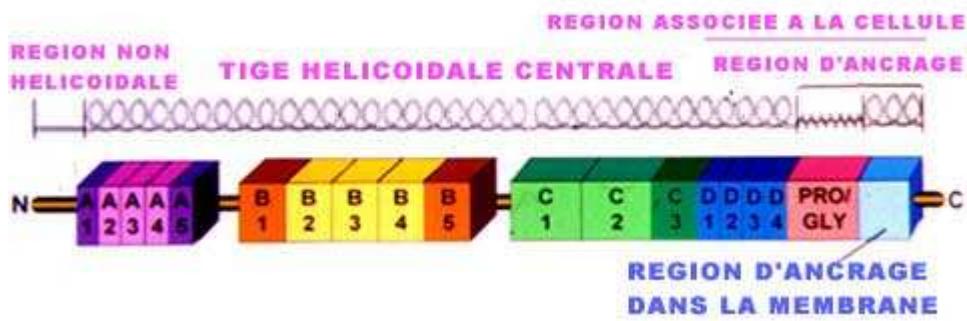
Facteurs de pathogénicité de *S. pyogenes*

- La capsule est un facteur majeur de pathogénicité et de virulence : elle empêche la phagocytose, certaines souches sécrètent une quantité plus importante de capsule et sont particulièrement virulentes (la colonie prend un aspect muqueux et lisse).

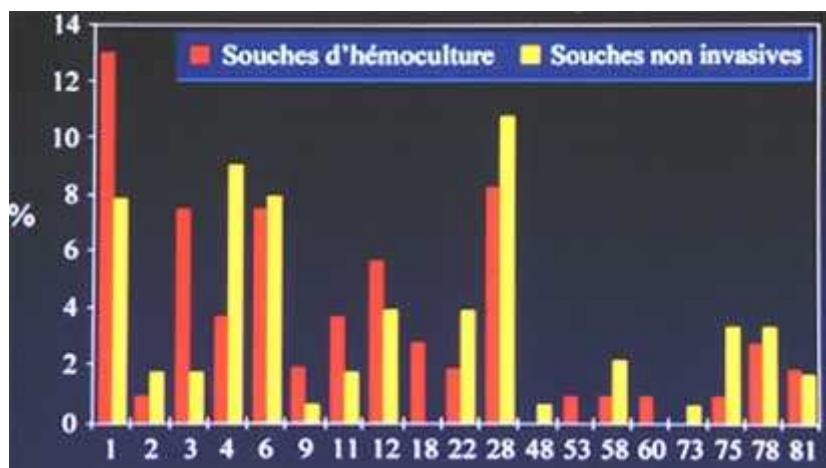


- Les protéines de surface sont nombreuses et interviennent dans la fixation du streptocoque sur les muqueuses pharyngées ou sur la peau. La protéine M a un rôle dans l'adhérence des streptocoques et joue aussi un rôle majeur dans l'inhibition de la phagocytose. L'extrémité de la protéine M comprend un site antigénique; il existe de l'ordre de 100 types différents de protéine M. L'immunisation contre un streptocoque, par exemple à l'occasion d'une angine due à une souche de streptocoque de type M1, ne protège pas contre la réinfection par une souche de streptocoque d'un autre sérotype (M2, M3, ou M4). Les souches de type M1 sont les plus fréquentes et le plus souvent, isolées de syndrome de choc toxique.





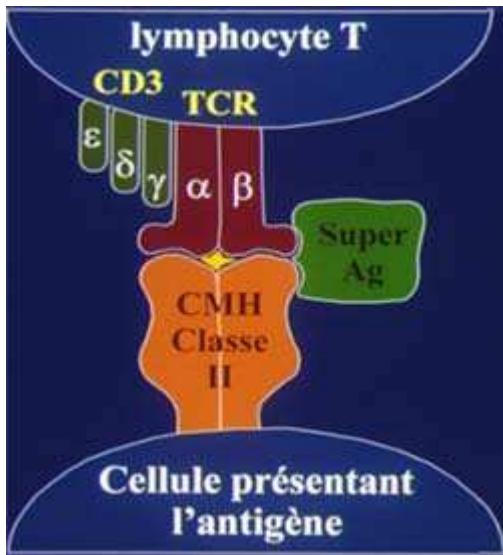
Répartition selon les types M des souches d'hémocultures (108) et celles non invasives (182)



Le pouvoir néphritogène ou rhumatogène est associé à certains types de protéines M.

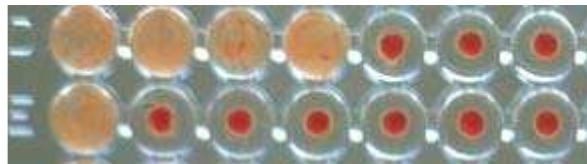
- Les toxines érythrogènes A, B et C (ou exotoxines pyrogènes streptococciques SpeA, SpeB ou SpeC) sont secrétées par certaines souches. Elles sont responsables de l'éruption de la scarlatine.

Les toxines A et C ont en plus des propriétés de super antigènes, comme une autre protéine appelée Ssa (ou superantigène de streptocoque du groupe A). Elles stimulent les lymphocytes polyclonaux qui libèrent des cytokines ou d'autres médiateurs de l'inflammation et provoquent syndrome de choc toxique ou scarlatine maligne.



Pour activer les lymphocytes T, l'antigène classique est dégradé, puis présenté par le complexe majeur d'histo-compatibilité (CMH) de classe II, avant d'être reconnu par un site spécifique du lymphocyte. Le superantigène se fixe directement en pont sur CMH et sur la région V β du récepteur du lymphocyte T. Ainsi il active une population très importante de lymphocytes.

- Les streptolysines O et S sont des hémolysines dont l'effet est observé *in vitro* sur gélose au sang (hémolyse β). Ce sont aussi des facteurs de pathogénicité. *In vivo*, la streptolysine O suscite la formation d'anticorps antistreptolysine O (ASLO).



L'élévation du taux d'antistreptolysine O dans les trois semaines qui suivent une infection à *S. pyogenes* permet un diagnostic rétrospectif.

- D'autres produits élaborés interviennent dans la pathogénicité (streptokinase, streptodornases, hyaluronidase ...). Les anti-streptodornases B sont augmentés dans les infections pharyngées et cutanées.

Identification de *S. pyogenes*

Morphologie

Caractères de culture *in vitro* et type d'hémolyse

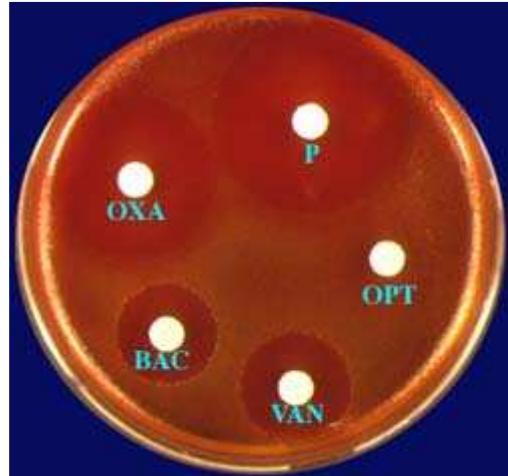
Antigène de paroi (antigène du groupe A de Lancefield)

En pratique médicale, il est maintenant possible de reconnaître une angine streptococcique (docteur test) par un test immunologique rapide effectué directement sur le prélèvement de gorge (écouvillon).

Sensibilité aux antibiotiques : toujours très sensible à la pénicilline G.

12-25 % de résistance acquise aux tétracyclines

10-15 % de résistance acquise aux macrolides due à des souches épidémiques. Le mécanisme de type MLS_B constitutif ou inducible est plus fréquent que le mécanisme par efflux.



2 - *Streptococcus agalactiae* : streptocoques β-hémolytique du groupe B

Autre espèce pyogène (responsable d'infections suppurées), elle provoque des méningites chez le nouveau-né, et des infections cutanées, urinaires ou génitales chez l'adulte, parfois accompagnées de septicémie.

L'infection néonatale est une urgence thérapeutique et le pronostic sévère des méningites néonatales justifie la recherche de portage vaginal de streptocoques du groupe B en fin de grossesse, et un traitement préventif en cas de colonisation.

C - STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE OU PNEUMOCOQUE

1 - Habitat et pouvoir pathogène

C'est le type même de l'espèce pathogène virulente, bien qu'elle existe à l'état de portage sur les muqueuses rhinopharyngées d'une partie de la population humaine.

Les pneumocoques sont isolés à partir de différents prélèvements : expectoration, liquide pleural, sang, liquide céphalo-rachidien (LCR), ou autres suppurations, selon qu'ils provoquent une pneumonie, une pleurésie purulente, une septicémie, une méningite purulente, ou une autre suppuration, telle qu'otite ou sinusite.

2 - Facteurs de pathogénicité

- Capsule: Ils possèdent une capsule de taille importante. Les antigènes capsulaires appartiennent à différents sérotypes, qui sont à la base de l'épidémiologie et de la préparation de vaccins anti-pneumococciques. sérotypes vaccin image

- Pneumolysine

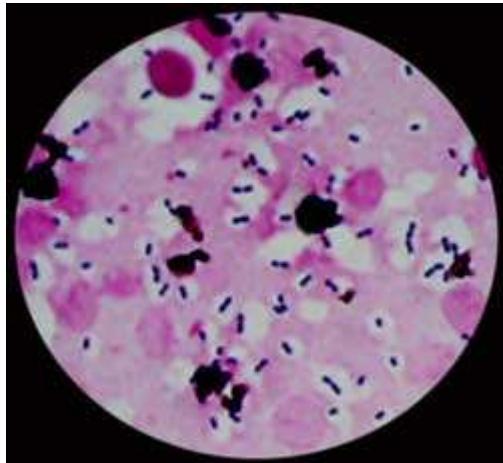
3 - Classification et identification

Bien que classés dans l'ensemble des streptocoques oraux, les pneumocoques s'en distinguent par leur pouvoir pathogène, leur aspect morphologique et par d'autres caractères biologiques.

Les pneumocoques ont les caractères généraux des streptocoques

Ils sont groupés en diplocoques ou courtes chaînettes.

Ils possèdent une capsule de taille importante révélée par agglutination :



Ils se multiplient sur gélose au sang sous forme de petites colonies "ombiliquées", l'aspect concave de leur surface résulte de la destruction des pneumocoques par une autolysine. Les cellules les plus vieilles de la colonie, situées à son sommet, sont détruites, ce qui donne à la colonie un aspect en cratère. Certaines souches de pneumocoques sécrètent une plus grande quantité de capsule, ce qui augmente la taille des colonies et leur donne un aspect muqueux.

Les pneumocoques sont classés parmi les streptocoques oraux (anciennement appelés streptocoques "viridans"). En effet, *in vitro* sur gélose au sang incubées en atmosphère aérobie ou enrichie en CO₂, on observe autour des colonies une hémolyse de type a (hémolyse incomplète à bords flous donnant à la gélose une couleur verdâtre). Cependant une hémolyse complète de type β est observée autour des colonies de pneumocoques dans certaines circonstances, notamment lorsque les cultures ont été faites en atmosphère anaérobie. Cette hémolyse est liée à la pneumolysine, ou hémolysine intra-cellulaire qui est détruite en présence d'oxygène.



Les pneumocoques étaient initialement très sensibles à la pénicilline G. Les concentrations minimales inhibitrices de la pénicilline G sur les souches "sauvages" sont de l'ordre de 0,01 µg/mL. Actuellement près de 50% des souches dites non invasives (isolées d'otite ou de sinusite), et près de 30% des souches invasives (isolées de sites habituellement stériles : sang, plèvre, LCR) ont une

sensibilité diminuée à la pénicilline G.

- . Ils sont dits "de sensibilité intermédiaire" pour des CMI > 0,1 et < 1µg/mL
- . Ils sont dits "résistants à la pénicilline G" pour des CMI > 1 µg/mL.

Le mécanisme de résistance est lié à des modifications des protéines de liaison aux pénicillines (PLP)(cf transformation bactérienne). Selon les modifications d'une ou plusieurs PLP, la diminution de sensibilité concerne non seulement la pénicilline G, mais aussi d'autres β -lactamines telles des pénicillines à large spectre (comme l'amoxicilline) ou des céphalosporines (comme le céfotaxime). Le niveau des CMI est d'autant plus élevé que le nombre de PLP modifiée(s) est important. Il est donc obligatoire de tester la sensibilité de chaque souche par la méthode du E-test, lors d'infections sévères (septicémies, pleuro-pneumopathies, méningites), pour ajuster le traitement antibiotique.



Selon le niveau de résistance, les posologies de pénicilline G prescrites habituellement (10 à 20 Millions d'UI) permettent ou non de guérir une pneumonie et de juguler une septicémie (en inhibant la multiplication des pneumocoques, qui ensuite seront détruits), mais la quantité de pénicilline qui traverse la barrière pleurale ou méningée est insuffisante pour traiter efficacement une pleurésie ou une méningite.

D - LES AUTRES STREPTOCOQUES ORAUX

Selon les espèces, ils sont commensaux de l'oro-pharynx, des muqueuses génitales ou intestinales. C'est à partir de ces portes d'entrée qu'ils vont devenir pathogènes opportunistes et provoquer des pneumopathies avec syndrome de détresse respiratoire chez certains malades neutropéniques, ou des endocardites subaiguës chez des personnes atteintes de valvulopathies cardiaques.

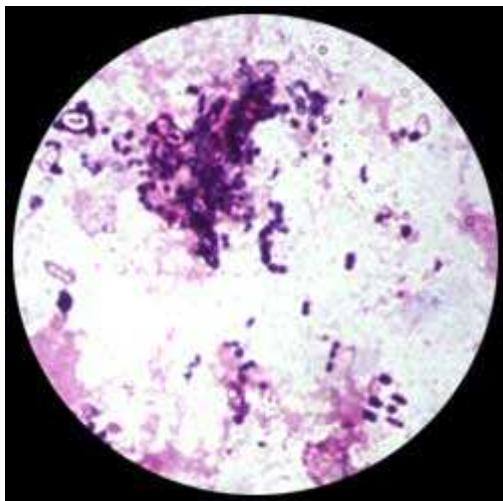
Ces infections sévères nécessitent un diagnostic étiologique : isolement de la souche responsable, identification précise de l'espèce d'après un ensemble des caractères morphologiques, culturaux, biochimiques ... , et étude de sa sensibilité aux antibiotiques.

Certaines espèces : *S. mutans* et *S. sobrinus* sont responsables de caries dentaires. Ce sont des infections chroniques, dont le diagnostic est clinique (et radiologique). Leur traitement est local, il ne comprend pas d'antibiotique, il ne nécessite donc pas de prélèvement pour caractériser la bactérie en cause ou étudier sa sensibilité

aux antibiotiques (en dehors d'étude épidémiologique).

E - LES STREPTOCOQUES DU GROUPE D

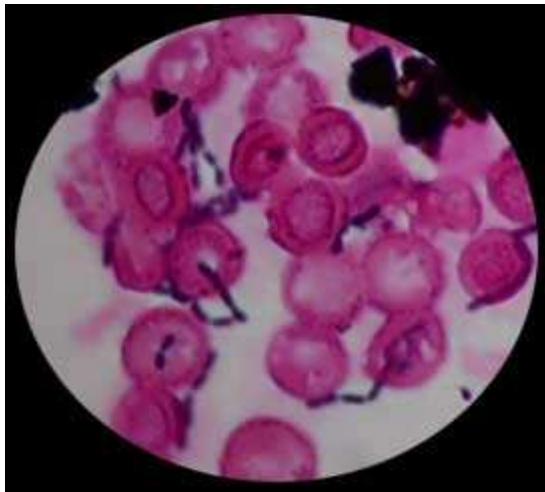
Ils sont commensaux de l'intestin de l'homme et de certains animaux. Ils sont parfois isolés de produits laitiers ou d'autres produits agro-alimentaires. Ils comprennent plusieurs espèces dont la classification est en cours de remaniement.



Parmi les espèces appelées il y a quelques années *S. bovis*, on distingue actuellement : l'espèce *S. gallolyticus* souvent isolée à l'occasion d'endocardite associée à un cancer colique, *S. infantarius* (1ère souches isolées de selles d'enfants, mais plus souvent isolées chez des adultes atteints d'endocardite) et *S. bovis/S. equinus* plus souvent d'origine animale.

F - LES ENTEROCOQUES

Ils appartiennent à un genre différent des streptocoques, bien qu'ils s'en rapprochent par certains caractères, notamment l'aspect morphologique et le métabolisme de type "anaérobie". La présence chez les entérocoques d'un acide téchoïque de paroi porteur de l'antigène D les rapproche plus particulièrement des streptocoques du groupe D, de même que leur présence dans l'intestin de l'homme et de certains animaux. Les entérocoques sont de plus commensaux des muqueuses génito-urinaires (urètre).



Ils peuvent être pathogènes opportunistes et sont alors responsables d'infections urinaires, d'infections abdominales d'origine intestinale, de septicémies ou d'endocardites à porte d'entrée urinaire, génitale ou intestinale.

D'autres particularités concernent les points suivants

- . Leur croissance en milieux de culture ordinaires (non enrichis), et même en milieux hostiles, explique leur persistance dans l'environnement.
- . Ils sont moins sensibles aux antibiotiques que les streptocoques :

Les CMI de la Pénicilline G (1 µg/mL) pour les souches de *Enterococcus faecalis*, peuvent être beaucoup plus élevées pour celles de *E. faecium*.

Ils sont tolérants, c'est-à-dire non tués par les pénicillines, même à fortes concentrations (CMB/CMI > 32).

Les entérocoques sont naturellement résistants aux céphalosporines et à plusieurs autres familles d'antibiotiques, ce qui favorise leur sélection dans le tube digestif des malades traités pendant plusieurs jours ou de façon répétitive par les antibiotiques inactifs sur les entérocoques.

L'émergence de souches ayant acquis des résistances à d'autres antibiotiques est favorisée par leur usage en thérapeutique médicale ou dans l'industrie agro-alimentaire (exemple: vancomycine et autres glycopeptides).

- . Leur habitat et leur résistance aux antibiotiques expliquent que les entérocoques soient responsables de plus de 10% des infections nosocomiales. Ces infections surviennent chez les malades ayant des facteurs de risque de colonisation et justifient surveillance et prévention.

BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES

A - GÉNÉRALITÉS

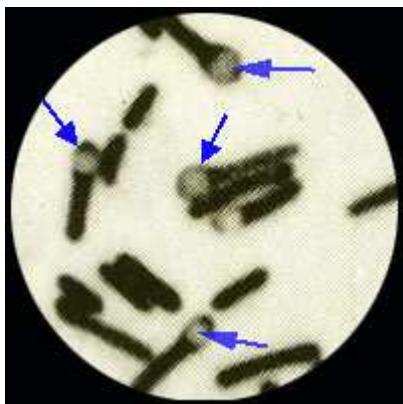
Il s'agit d'un ensemble très complexe de bactéries **ayant certaines caractéristiques écologiques, biochimiques et pathologiques.**

- germes commensaux très fréquents, en particulier au sein de diverses flores dont celle oropharyngée ou encore digestive comprenant de nombreuses espèces de bacilles appartenant aux groupes des *Clostridium* et *Bacteroides*.

Exemple: Présence de bacilles anaérobies stricts par microscopie à balayage au niveau de la paroi du rumen de bovin



- germes rencontrés encore au sein de flores telluriques (contamination fécale), et certains sont sporulés (*Clostridium*). Leur introduction chez l'homme s'effectue par effraction cutanée: taille de rosier, plaie souillée avec de la terre...



- peuvent produire de nombreux facteurs de virulence, certains étant toxinogènes.

- une autre caractéristique est leur pouvoir très gazogène (crépitation au niveau des tissus lors de multiplication):



Des études scientifiques très sérieuses ont évalué le rejet de gaz d'origine animale, participant ainsi à l'effet de serre.



- aussi cette production va s'accompagner d'une odeur nauséabonde ($H_2S + \dots$) lors de la putréfaction
- ne peuvent utiliser et vivre au contact de l'air en raison de leur déficience en certains transporteurs d'électrons (certains d'isolement difficile sont dits EOS, car extremely oxygen-sensitive. Leur culture ne pourra s'obtenir que dans certaines conditions d'incubation.

B - PRINCIPALE CARACTÉRISTIQUE DE CULTURE

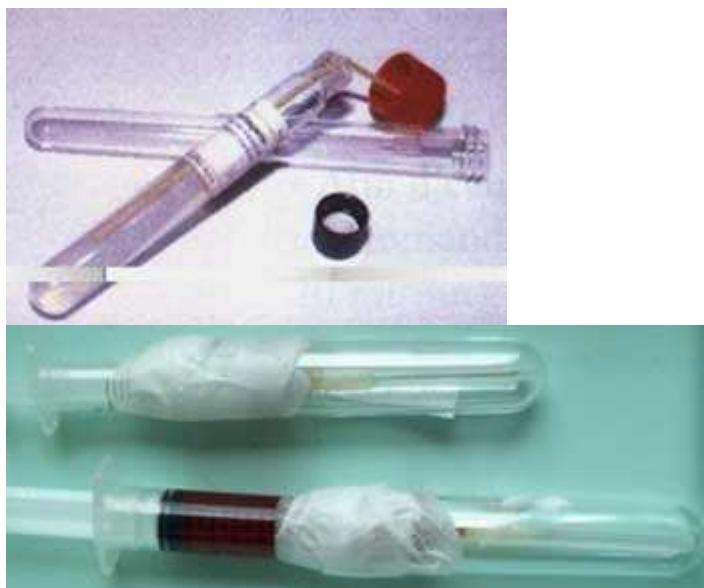
Les bactéries anaérobies strictes ne peuvent se cultiver qu'en l'absence de l'air ambiant ou de l'oxygène ce qui va nécessiter des techniques bactériologiques inhabituelles, en l'absence d'oxygène aussi bien lors du prélèvement, que de son transport puis ensuite de sa culture et/ou de son isolement. Ces contraintes techniques peuvent expliquer leur faible fréquence d'isolement dans de nombreux laboratoires

Prélèvements - transport :

hémoculture: **Lors d'hémoculture, un flacon avec et un sans oxygène est systématiquementensemencé**

autres: **Certains prélèvements seront rapidement effectués sur un écouvillon avec**

ensuite ensemencement au sein d'un milieu gélosé permettant le transport (TGV®) ou encore il convient d'éviter tout apport d'air dans la seringue. Puis leur acheminement sera le plus rapide possible au laboratoire.



Culture - Isolement :

Les contraintes déjà évoquées s'appliqueront encore en évitant le contact avec l'oxygène:

soit en travaillant en chambre spéciale (chambre dite de Freiter) avec mélange gazeux divers (C02, N2...)



soit plus habituellement en mini-chambre (jarre ou poche plastique) et utilisation d'un catalyseur chimique (sachet) en ensemencant des milieux solides tel gélose au sang frais.....

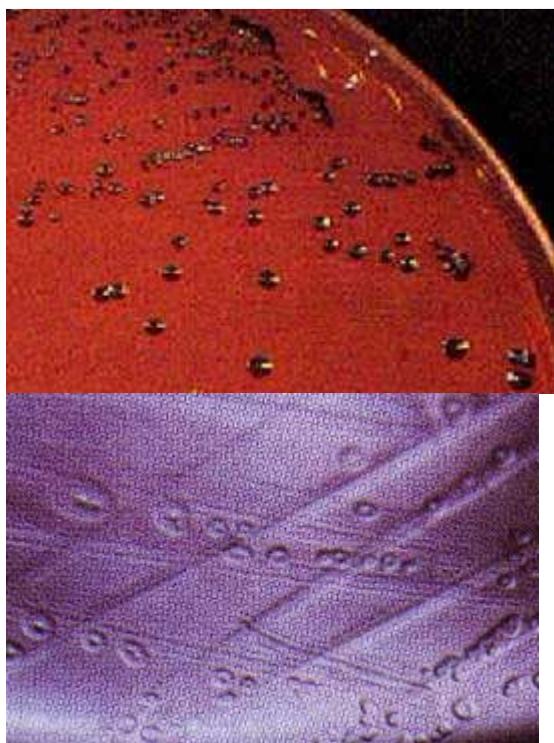


L'incubation est normalement effectuée dans une étuve en "air ambiant" à 37°C.



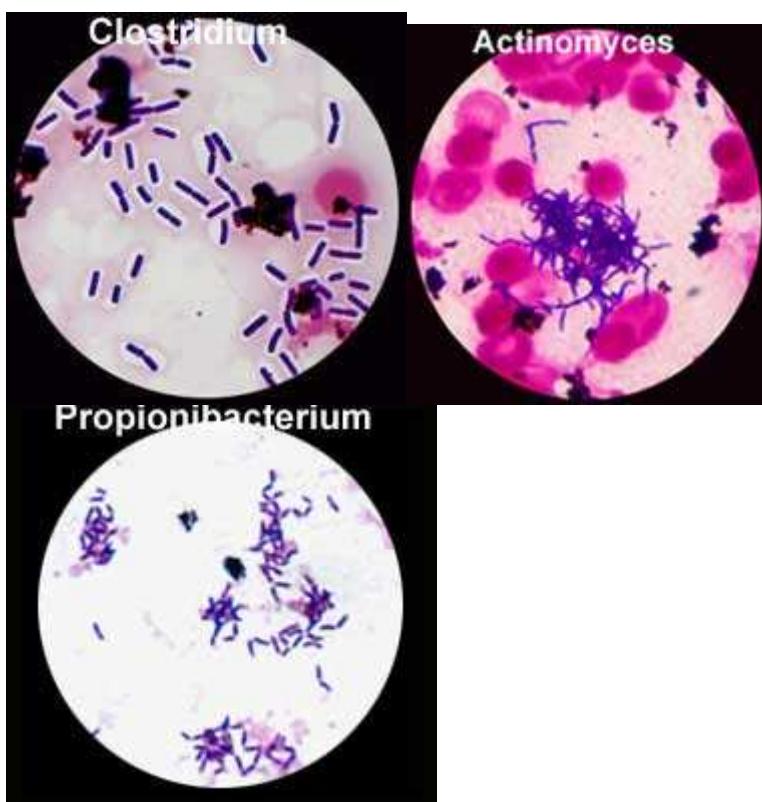
Leur culture est, en général, difficile et lente (plusieurs jours), le plus souvent obtenue sur des milieux gélosés au sang avec quelquefois des aspects caractéristiques tels pigmentation noire (*Prevotella melanogenica*) ou colonies inscrustées (*Bacteroides ureolyticus*):

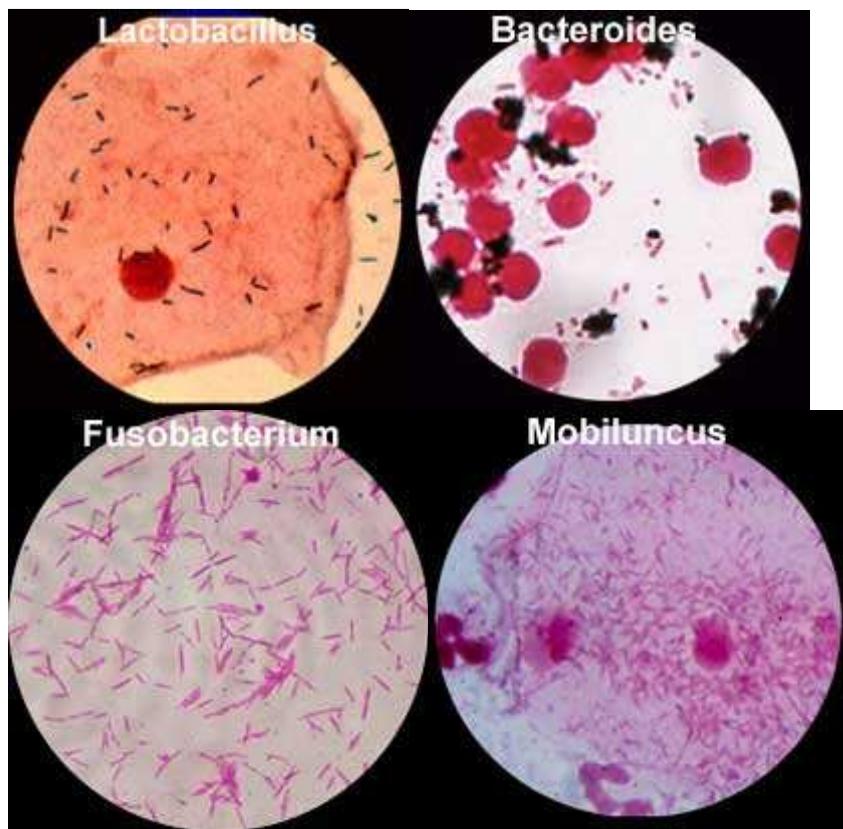




L'examen direct après coloration de Gram peut orienter pour certaines étiologies (coque ou bacille à Gram + ou à Gram -).

Quelques exemples:





L'identification est le plus souvent biochimique: Exemple d'une galerie d'identification (Rapid ID 32A).



L'antibiogramme montrera une sensibilité spécifique aux imidazolés (métronidazole ou MTR) et une résistance naturelle aux aminoglycosides.



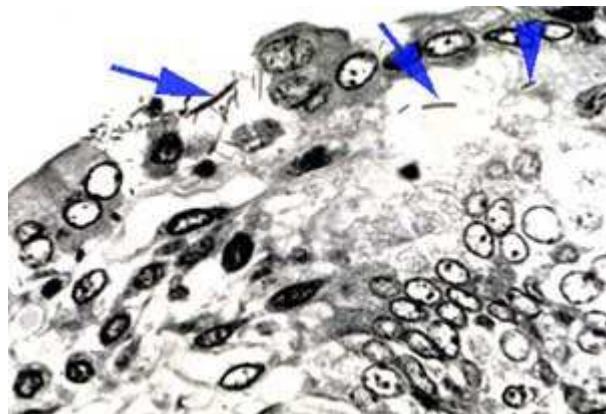
C - HABITAT

Les bactéries anaérobies strictes malgré leur instabilité à l'oxygène sont des germes commensaux fréquemment rencontrés aussi bien chez l'homme que

l'animal:

anaérobies de la flore exogène: **bacilles (*Clostridium*) sporulés telluriques toxinogènes qui peuvent pénétrer avec la terre par effraction (plaie, escarre) ou plus rarement par ingestion.**

anaérobies de la flore endogène (Flore de Veillon): **germes commensaux des cavités naturelles (bouche, tube digestif.....)(cf flores). Ils sont des germes commensaux dominants au sein de la flore digestive, en particulier colique, de l'ordre de 10^{10} germes/gramme de selles. Leur rôle est important dans le cadre de l'effet de barrière, par exemple. Aussi lors de fragilisation des défenses immunitaires, il peut y avoir translocation, suivie d' infections putrides, voire de septicémies.**

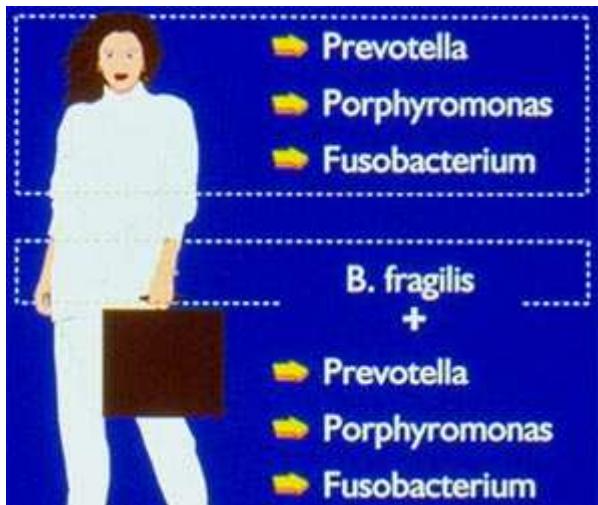


D - CLASSIFICATION

De très nombreuses genres et espèces ont été identifiées dont certaines sont souvent isolées comme pathogènes chez l'homme ou l'animal. Une classification simplifiée en fonction de la coloration de Gram et de la morphologie est rapportée ci-dessous:

<i>Peptostreptococcus</i>	●	<i>Veillonella</i>	●
<i>Clostridium - Eubacterium</i>	●	<i>Bacteroides fragilis</i>	●
<i>Actinomyces</i>		<i>Bacteroides ureolyticus</i>	
<i>Propionibacterium</i>		<i>Prevotella</i>	
<i>Bifidobacterium</i>		<i>Porphyromonas</i>	
<i>Lactobacillus - Atopobium</i>		<i>Fusobacterium</i>	
		<i>Bilophila</i>	

Leur distribution chez l'homme est variable selon la localisation:



E - POUVOIR PATHOGÈNE

Variable avec divers tableaux cliniques pouvant être quelquefois très évocateurs et on aura la notion d'absence de maladie contagieuse ou épidémique, à l'exception du botulisme (même source contaminante = aliment)

Quelques exemples:

Infections de la sphère ORL				
	A	B	C	D
<i>B. groupe fragilis</i>		+	+	
<i>Prevotella</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Porphyromonas</i>				
<i>Fusobacterium</i>	++*	+++	+++	+++
<i>Clostridium</i>			+	
<i>Eubacterium</i>		+	+	+
<i>Actinomyces</i>	++		+++	
<i>Peptostreptococcus</i>	+++	+++	+++	+++

A, angine de Ludwig; **B**, sinusites chroniques;
C, otites chroniques ; **D**, Infections odontologiques
* angine de Vincent: association de *F. nucleatum* et d'un spirochète

Infections pulmonaires			
	A	B	C
<i>B. groupe fragilis</i>		+	
<i>Prevotella</i>	++	+++	++
<i>Porphyromonas</i>			+
<i>Fusobacterium</i>	++	+++	
<i>Clostridium</i>			+
<i>Eubacterium</i>		+	+
<i>Actinomyces</i>	++		+++
<i>Peptostreptococcus</i>	+++	+++	+++

A, pneumopathies suppuratives;
B, abcès du poumon; **C**, actinomycoses

Infections gynécologiques			
	A	B	C
<i>B. groupe fragilis</i>	+		
<i>Prevotella</i>	+++	+++	++
<i>Porphyromonas</i>	+++		+
<i>Fusobacterium</i>			
<i>Clostridium</i>			
<i>Eubacterium</i>			
<i>Actinomyces</i>	+	+	
<i>Peptostreptococcus</i>		+++	+++

A, endométrites; **B**, salpingites;
C, vaginoses (+ *Mobiluncus*)

1 - INFECTIONS À BACTÉRIES SPORULÉES (*CLOSTRIDIUM*)

1 - 1 *Clostridium botulinum* et Botulisme

Habitat : bactérie tellurique, rare (intestin des animaux) dont les spores contaminent les légumes et les fruits..... Mauvaise stérilisation de conserves familiales ou autres préparations: jambon, saucisson (abattage dans de mauvaises conditions sans diète et stress). Grande thermorésistance de la spore: 3-5 h à 100°C. Donc chauffer 10 min à 120°C (règle appliquée dans les conserves industrielles). En France, 567 cas entre 1971 et 1978.

Pouvoir pathogène naturel : Rare mais maladie à déclaration obligatoire. Il s'agit d'une Intoxication ou intoxication, car la toxine est préformée dans l'aliment après germination des spores. L'incubation est courte (18 à 96 h) selon la quantité de toxine ingérée. Les signes neurologiques sont dominants avec des paralysies bilatérales et symétriques entraînant:

trouble de l'accommodation et muscles intrinsèques de l'œil : mydriase



trouble de l'accommodation et muscles intrinsèques de l'œil : mydriase



atteinte des muscles bucco-pharyngés (dysphagie) avec paralysie de la déglutition, difficultés d'élocution

Il peut être retrouvé des signes digestifs **dont nausées, vomissements et constipation**

Diagnostic : essentiellement clinique **avec un signe d'atteinte du SNC. Rechercher d'autres cas dans l'entourage immédiat ou non (>70%).**

Diagnostic biologique : compte tenu de l'existence d'un aliment contaminé et de la possibilité d'observer plusieurs cas, il convient de rechercher la toxine dans le sang des malades, dans l'aliment incriminé, voire les selles (épreuve de séro-neutralisation chez la souris). Recherche de toxine quelquefois négative mais la clinique est très évocatrice. Toxine libérée au cours de l'autolyse du germe, 6 variétés antigéniques (A, B, C, D, E, F) mais surtout A, B, E chez l'homme. Toxines puissantes (1 mg contient 20.106 doses minimes mortelles ,DDM pour la souris) qui inhibent la synthèse d'acétylcholine au niveau des synapses ou des plaques neuro-musculaires. De nature protéique (détruites par chauffage de 20 min à 100°C), sont antigéniques, donc transformables en anatoxine et neutralisables par anti-toxines (anticorps) = sérum. Pas d'antibiogramme

Traitements curatifs : sérothérapie + anatoxine et anti-cholinestérasique

Traitements préventifs : mesures légales pour abattage des animaux, préparation des conserves industrielles. Règles de salaison et de conservation des aliments.....

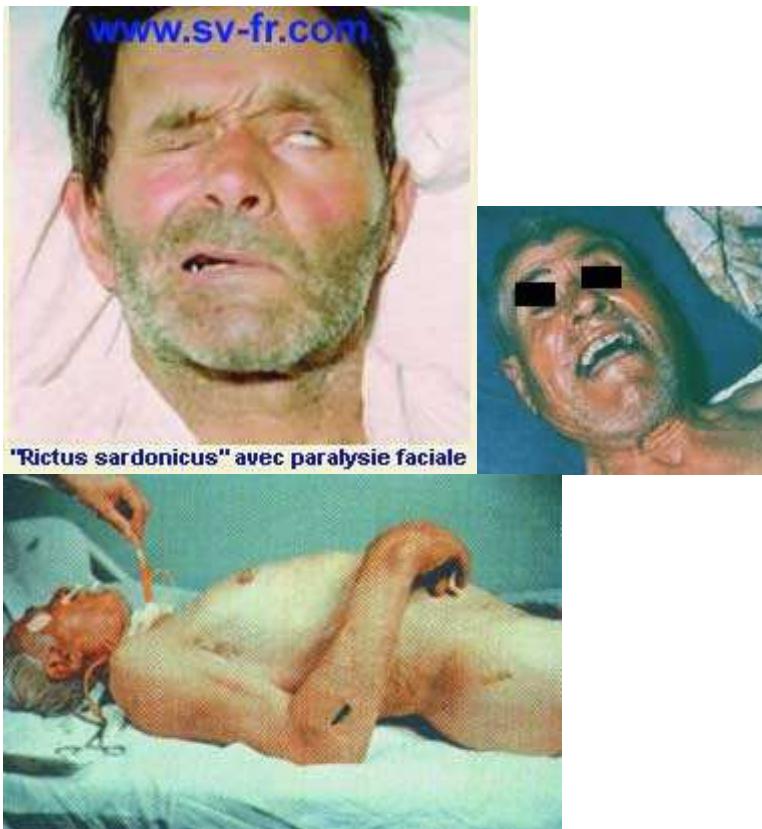
1 - 2 *Clostridium tetani* et tétanos

Habitat : Le bacille de Nicolaer est un commensal du tube digestif d'espèces animales, mais peut être rencontré dans le sol (spore). Donc abondant dans les zones de stabulation, pacage...

Pouvoir pathogène : vaccination obligatoire en France mais près de 400 cas/an avec une mortalité de 25-50%. Germe non invasif, infection strictement limitée dans les tissus dévitalisés après introduction de spores: blessure, brûlure, cordon ombilical ligaturé, suture chirurgicale.... maladie = toxémie

Après germination de la spore, toxine excrétée dans des conditions favorisantes = anaérobiose (nécrose tissulaire), sels de calcium, germes pyogènes potentiel oxydo-réduction bas

Incubation de 4-5 jours à plusieurs semaines, la toxine gagne le SNC par voie rétrograde (tissu périneural), lymphatique ou sanguine. Par fixation sur les glangliosides de la moelle épinière et du cerveau, elle empêche la libération d'un inhibiteur des synapses des neurones moteurs, entraînant des réactions exagérées et des spasmes violents des muscles en réponse à toute stimulation. La maladie clinique commence par des spasmes musculaires et des contractures douloureuses des massettes (trismus ou rire sardonique), le sujet ne peut ouvrir la bouche.

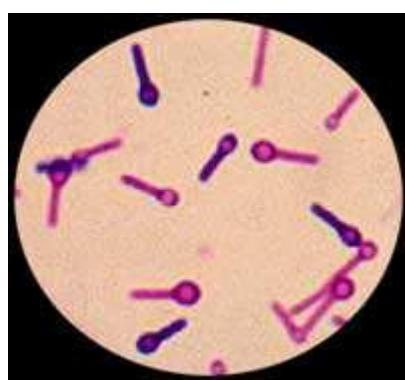


Puis les autres muscles de la musculation volontaire sont touchés. Des contractures douloureuses plus ou moins généralisées se produisent avec un état caractéristique (opistotonos). Le malade est conscient avec une température élevée, puis il y a mort par spasme laryngé.

Diagnostic: Il est surtout clinique : **contractures avec notion de blessure antérieure**

Diagnostic bactériologique: **recherche éventuelle du germe dans la blessure, intérêt limité. Pas d'antibiogramme**

Aspect caractéristique de la bactérie sporulée



Traitements curatifs: sérum antitétanique, **anatoxine, pénicilline G et mesures non spécifiques (myorelaxants, sédatifs, respiration assistée).**

Traitements préventifs: vaccination obligatoire **chez l'enfant avec anatoxine couplée**

avec autres vaccinations. Rappels. Nettoyage soigneux de plaies souillées de terre, débridement chirurgical lors de nécrose. Emploi préventif de la sérothérapie, légal pour toute plaie souillée avec une injection de rappel (séro-anatoxinoprévention)

1 - 3 CLOSTRIDIA DE GANGRÈNES GAZEUSES

Définition: **affection grave consécutive le plus souvent à l'introduction de terre ou de matières fécales souillées de spores de *Clostridium* dans la plaie: *C. perfringens* le plus fréquent, mais aussi *C. novyi*, *C. septicum* ... L'origine peut être endogène en raison de la présence de divers *Clostridium* au sein de la flore digestive.**

Pouvoir pathogène naturel: Plaie contaminée (**fracture ouverte, plaie utérine, escarre.....**). Infection rapide en 1-3 jours avec gangrène gazeuse **comprenant un phlegmon gazeux avec crépitation et nécrose, fièvre, hémolyse, syndrome toxique, choc, puis la mort survient rapidement. L'amputation est quelquefois rapidement nécessaire.**



Autres infections: **appendicites, entérites, syndrome septicémique d'origine puerpérale (avortement clandestin) avec ictere hémolytique et anurie.....**

Diagnostic bactériologique: **Il est facile et rapide à partir de prélèvements de tissus, de pus, de sérosité au niveau de la plaie, ou encore de sang, il y a de résence de grands bacilles à Gram-positif, rarement sporulés. La culture est aisée sur une gélose au sang en anaérobiose après 24 h d'incubation à 37°C. Ce germe est hémolytique, protéolytique et très gazogène.**

Hémoculture anaérobie positive à *C. perfringens*



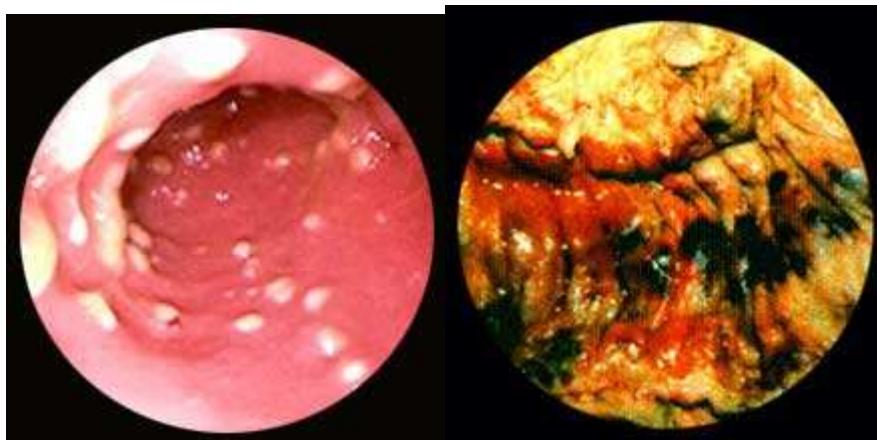
Toxine: exotoxine protéique (lécithinase) qui décompose la lécithine, constituant des membranes cellulaires.

Autres facteurs: désoxyribonucléase, hyluronidase, collagénase favorisant l'extension de l'infection.

Traitements - antibiogramme: débridement des plaies souillées, excision des tissus nécrosés; pénicillines et imidazoles+ Réanimation

1 - 4 AUTRE CLOSTRIDIUM : *Clostridium difficile*

Après administration prolongée d'antibiotique **dont la clindamycine, les céphalosporines, le cotrimoxazole....., la sélection dans les selles d'une espèce naturellement présente (*C. difficile*) ayant une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les β-lactamines et les aminoglycosides peut être suivie de signes de colite pseudomembraneuse par prolifération dans le colon et production de toxines (entérotoxine et cytotoxine). L'évolution peut être mortelle. Sa découverte chez des malades chirurgicaux ainsi que chez le sujet séropositif pour le VIH en fait un opportuniste, quelquefois responsable d' infections nosocomiales. La transmission est assurée par les mains du personnel soignant ou enocre un thermomètre insuffisamment décontaminé.**



Le diagnostic bactériologique s'effectue à partir de selles soit sur la recherche de la

bactérie (milieu sélectif), soit sur la recherche d'un effet cytopathogène (toxines) en culture cellulaire ou par un moyen immunologique.

Le traitement fait appel aux imidazolés (métronidazole) ou aux glycopeptides (vancomycine per os).

2 - INFECTIONS A BACTÉRIES ANAÉROBIES NON SPORULÉES OU ENDOGÈNES

De nombreuses autres groupes ou espèces sont des germes commensaux des flores (bucco-pharyngée, digestive), qui peut être pathogènes dans certaines circonstances. Ces bactéries de type bacille fusiforme ou non, coque ou spirochète, à Gram-positif et à Gram-négatif non sporulées sont pathogènes uniquement par leur virulence. Les circonstances favorisées sont liées à un traumatisme, un trouble nutritionnel, un déficit immunitaire ou une infection conjointe. Types d'infections sont ainsi individualisées:

2 - 1 Angine fuso-spirochétique de Vincent ou Angine ulcéro-nécrotique accompagnée d'une fièvre élevée et d'une réaction ganglionnaire de voisinage. Le diagnostic est bactérioscopique avec la présence d'une bactérie de type *Fusobacterium* et d'une bactérie de type spirochète. Le traitement de cette angine est simple à base de pénicilline G.

Examen de gorge et examen direct après coloration de Gram (X 1000)



2 - 2 Supurations diverses

. Supurations bucco-dentaires: les abcès dentaires sont douloureux, car polymicrobiens et distendus par la production de gaz.



. Suppurations pulmonaires: consécutives à l'inondation du poumon, suite à des régurgitations gastriques avec l'acide chlorhydrique et une flore bactérienne mixte, notamment de *Bacteroides*, fusiformes, spirochètes etc ... La multiplication est favorisée par la nécrose, donc l'anaérobiose, provoquée par l'acide chlorhydrique. Parmi les complications, à noter les pleurésies purulentes.

. Suppurations digestives: consécutives à des perforations spontanées ou à des traumatismes accidentels ou chirurgicaux introduisant alors des bactéries intestinales dans la cavité péritonéale ou dans les tissus pelviens. Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* prédominent, car représentant 80 à 90 % de la flore digestive et naturellement résistant à de nombreux antibiotiques dont les pénicillines. A noter les infections biliaires, les abcès hépatiques, les appendicites

. Septicémies dans le cadre d'une complication

Leur diagnostic est d'abord clinique, quelquefois bactérioscopique, voire bactériologique: Le prélèvement selon le type d'infection peut présenter une odeur fétide caractéristique montrant à la coloration de Gram, un aspect protéiforme à Gram-positif et à Gram-négatif (flore de type anaérobiose dite flore endogène de Veillon).

Exemple : Aspect macroscopique d'un liquide pleural



La culture en anaérobiose est positive après plusieurs jours d'incubation à 37°C. Elle est d'un intérêt limité, car ne seront isolées que les espèces de culture facile (hors EOS). L'identification est biochimique par utilisation de galeries commerciales. Les espèces ou genres habituellement identifiés sont : *Clostridium*

perfringens, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Bacteroides* du groupe *fragilis*, *Fusobacterium* ou encore *Prevotella* et *Porphyromonas*...

Le traitement sera débuté sans attendre en ayant recours aux antibiotiques des familles suivantes:

β-lactamines avec inhibiteur de β-lactamase tel amoxicilline-acide clavulanique

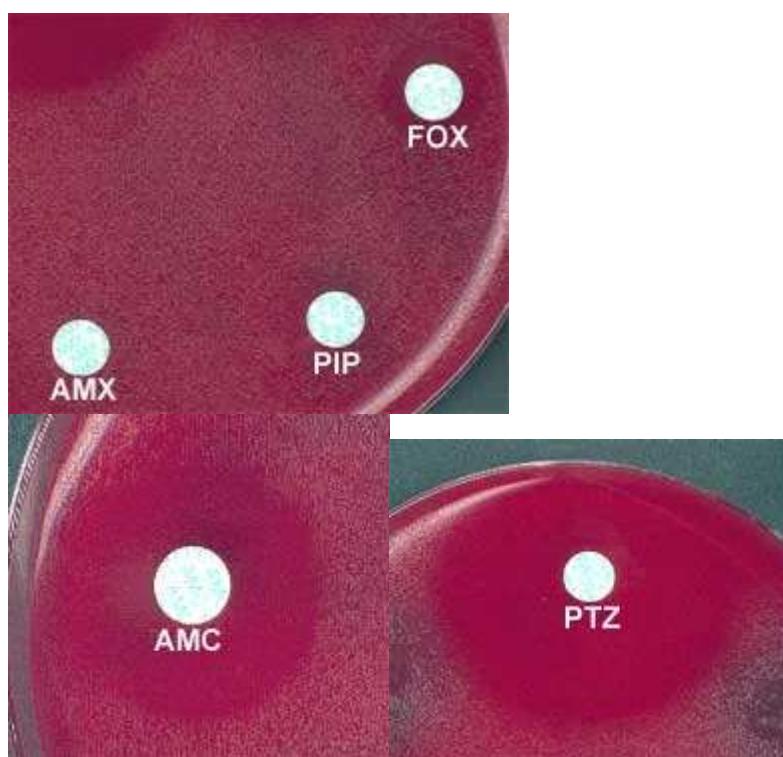
imidazolés dont le métronidazole

glycocoptides : vancomycine par exemple (*C. difficile*)

lincosamides avec la lincomycine ou la clindamycine

co-trimoxazole (*Actinomyces israelii*)

La sensibilité aux antibiotiques varie beaucoup selon l'espèce ou le groupe bactérien tel les *Fusobacterium* très sensibles aux β-lactamines dont la pénicilline G et les *Bacteroides* du groupe *fragilis* résistants à diverses β-lactamines en l'absence d'association avec des inhibiteurs de β-lactamase : amoxicilline seule (AMX), + ac.clavulanique (AMC), pipéracilline seule (PIP) + tazobactam (PTZ), céfoxidine (FOX).



. Il conviendra de retenir la résistance naturelle à certains antibiotiques dont les aminoglycosides ou encore les céphalosporines (*C. difficile*).

LES STAPHYLOCOQUES

Très fréquemment isolés en pathologie humaine, particulièrement au cours des suppurations, les staphylocoques sont des germes ubiquitaires : on les trouve en effet dans l'air, les sols et les eaux et ils appartiennent à la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux.

TAXONOMIE

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococcaceae* qui comprend quatre genres : *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* et *Planococcus*.

1° Le genre *Micrococcus*

comprend les microcoques qui sont également des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et par conséquent souvent présents dans les prélèvements. Ce sont presque toujours des contaminants qu'il importe de distinguer des staphylocoques.

2° Le genre *Staphylococcus*

comprend une trentaine d'espèces : certaines sont des hôtes de l'homme, d'autres des animaux, d'autres sont rencontrées à la fois chez l'homme et l'animal.

Chez l'homme, les espèces les plus couramment isolées sont :

Staphylococcus aureus, le plus pathogène,

Staphylococcus epidermidis, souvent considéré comme un opportuniste,

Staphylococcus saprophyticus, responsable d'infections urinaires chez la femme jeune,

et à une fréquence moindre, *St haemolyticus*, *St. hominis*, *St. capitis* et *St. auricularis*.

Il faut se garder d'assimiler *St. aureus* à un pathogène obligatoire et *St. epidermidis* à un commensal certain ; l'un comme l'autre sont des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme pouvant, de ce fait, contaminer les prélèvements mais l'un et l'autre peuvent aussi être à l'origine d'infections graves. *St. aureus* a néanmoins un potentiel pathogène plus important.

St. aureus exprime des caractères qui le différencient des autres staphylocoques : il possède notamment une coagulase. En pratique bactériologique courante ce caractère permet de faire la distinction entre *Staphylococcus aureus* d'une part et les Staphylocoques coagulase négatifs (SCN) d'autre part.

3° Le genre *Stomatococcus*

comprend *Stomatococcus mucilaginosus* qui fait partie de la flore buccale.

4° Le genre *Planococcus*

comprend des bactéries du milieu marin.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

■ Morphologie

Staphylococcus aureus est, comme tous les staphylocoques, un coque à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 micromètre apparaissant en amas à l'examen microscopique.

Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique.

■ Caractères de culture

Il cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose comme en anaérobiose en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène.

Il n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de 37° C et un pH de 7,5, de grandes variations sont tolérées. Comme tous les *Micrococacceae*, il se multiplie dans des milieux contenant une forte concentration de NaCl (5 à 10 g pour cent).

Il est capable de transformer de nombreux substrats, notamment les sucres, ce qui n'a guère d'intérêt pratique sauf en ce qui concerne le mannitol (un polyalcool) que *St. aureus* peut fermenter contrairement à la plupart des SCN.

■ Équipement enzymatique

Outre ceux nécessaires aux fonctions métaboliques décrites ci-dessus, diverses enzymes peuvent être mis en évidence chez *Staphylococcus aureus* : catalase qui existe chez tous les *Micrococacceae*, coagulase, désoxyribonucléase, phosphatase, hyaluronidase, fibrinolysine, lipase et protéolysines qui caractérisent *St. aureus*.

La présence d'une coagulase identifie, en pratique courante l'espèce *aureus*. Il existe une coagulase libre et une coagulase liée. La coagulase libre est une protéine diffusible, réagissant comme la prothrombine et coagulant, en quelques heures, le plasma citraté de l'homme ou du lapin. La forme liée, ou clumping factor réagit directement avec le fibrinogène, entraînant l'agglutination des staphylocoques quand on les mélange à un plasma.

L'activité de toutes ces enzymes explique, en partie, la physiopathologie de l'infection staphylococcique ; leur recherche est, par ailleurs, utile pour la classification et le typage des souches.

■ Autres substances élaborées

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* tient également à la production

d'un grand nombre de substances diffusibles.

Hémolysines

L'hémolysine a ou staphylolysine a est cytotoxique et cytolytique. Elle a un effet nécrotique sur la peau lié à son effet vasoconstricteur. C'est une hémolysine active surtout sur les hématies de lapin.

La staphylolysine a entraîne la production d'anticorps appelés anti-staphylolysines a (ASTA) recherchés dans le sérodiagnostic.

Il existe d'autres hémolysines, β, γ et δ dont le pouvoir toxique est incertain.

Leucocidine

Cette toxine agit sur les granulocytes, les macrophages et les basophiles et provoque leur immobilisation puis leur dégranulation et leur lyse.

Entérotoxines

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent des toxines protéiques responsables de toxi-infections alimentaires : les entérotoxines staphylococciques, au nombre de cinq : A, B, C, D, E. C'est leur activité de superantigène qui explique les effets toxiques.

La toxine du syndrome de choc toxique

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent une toxine pyrogène et létale : la toxine du syndrome de choc toxique ou TSST (toxic-shock syndrome toxin). Elle se comporte aussi comme un superantigène.

Exfoliatines ou épidermolysines

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent des toxines protéiques A ou B. Elles sont responsables de staphylococcies cutanées bulleuses dues à des lésions histologiques caractérisées par un décollement intra-épidermique donnant lieu au syndrome de la "peau ébouillantée" ou syndrome de Ritter.

ANTIGÈNES

Il existe des antigènes capsulaires, de nature polysaccharidique et des antigènes pariétaux constitués par le peptidoglycane et les acides teichoïques. La plupart de ces antigènes permettent le sérotypage des souches.

Une protéine de paroi, la protéine A, a la propriété de fixer les immunoglobulines de classe G par leur fragment Fc. Cette propriété est mise à profit, au laboratoire, dans des réactions de "co-agglutination".

Rappelons également la staphylolysine a décrite plus haut.

POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ L'HOMME

Staphylococcus aureus est d'abord un germe pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses ; il "surinfecte" souvent les plaies négligées.

Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration des germes au niveau des annexes de la peau (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie, même minime. Elles donnent lieu à des folliculites, furoncles, sycosis, anthrax, orgelets, hydrosadénites, panaris, onyxis périonyxis, impétigo, et abcès à localisations variées (sein, fesse, marge de l'anus , aisselle, aine) Plus rares sont les conjonctivites, angines, phlegmons de l'amygdale, otites ou sinusites.

Ces infections cutanéo-muqueuses sont parfois le point de départ de suppurations profondes ou d'infections générales.

Les infections générales, septicémiques ou septicopyohémiques, donnent lieu à de fréquentes localisations métastatiques génératrices d'infections profondes.

Les infections profondes sont pleuro-pulmonaires (pneumopathies, abcès, pleurésies, pneumonies "bulleuses"), génito-urinaires (abcès rénal, phlegmon périnéphrétique, abcès de la prostate), ostéo-articulaires (ostéomyélite aiguë des adolescents, abcès osseux) cardiaques ou cérébro-méningées.

Staphylococcus aureus est fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales. L'incidence élevée est expliquée par l'emploi intensif d'antibiotiques qui sélectionnent, dans l'écosystème hospitalier, des souches résistantes, par la fragilité des malades et par les soins ou traitements de plus en plus hardis mais de plus en plus agressifs qu'ils subissent. Les voies d'entrée sont iatrogènes (aiguilles, sondes, canules, cathéters, perfuseurs, drains ...)

Staphylococcus aureus est aussi un pathogène à cause des toxines qu'il fabrique.

Le syndrome de Ritter, ou SSSS (staphylococcal scalded skin syndrom), improprement appelé syndrome de Lyell (qui est d'origine toxique), plus fréquent chez l'enfant, est caractérisé par une érythrodermie bulleuse avec fièvre évoquant une brûlure du second degré. Il est occasionné par des staphylocoques producteurs d'exfoliatines. L'impétigo et le pemphigus sont des formes mineures, localisées, du syndrome.

Le syndrome de choc toxique staphylococcique (SCTS) associe hypotension, choc et fièvre à une érythrodermie généralisée desquamante. Il est occasionné par des staphylocoques producteurs de TSST. Sa survenue serait favorisée par l'utilisation de tampons périodiques.

Les manifestations intestinales provoquées par les staphylocoques entérotoxinogène se présentent sous deux formes :

■ les toxi-infections alimentaires sont les plus fréquentes : il s'agit de troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine préformée, d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre.

■ l'entérocolite aiguë pseudomembraneuse, plus rare, survenant chez des sujets ayant reçu une antibiothérapie qui a sélectionné une souche intestinale de *St. aureus* résistante au traitement et sécrétrice d'entérotoxine.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Le principal "réservoir de virus" est la peau et les muqueuses de l'homme, qu'il soit malade ou bien-portant puisqu'on trouve, parmi les sujets indemnes de toute infection, 30 à 50% de porteurs sains. On le trouve en particulier dans les narines. C'est une affinité du germe pour l'épithélium narinaire et le pouvoir d'y adhérer durablement qui explique sa prévalence dans le nez. La transmission manuportée est le mode essentiel de transmission et le réservoir nasal recontaminant rapidement les mains assure la pérennité de la transmission. Le portage intestinal est assez fréquent et n'a pas beaucoup de signification pathologique.

IMMUNITÉ

La fréquence du portage sain chez l'homme implique l'existence d'une immunité naturelle dont le support n'est pas encore bien établi. Puisque les staphylocoques sont des bactéries à multiplication extracellulaire (BME), la phagocytose est probablement le mécanisme le plus efficace. Une diminution des capacités phagocytaires des granulocytes se traduit par des infections staphylococciques fréquentes et récidivantes (granulomatose septique). Des anticorps apparaissent au cours des infections staphylococciques mais leur rôle protecteur est incertain.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

■ Isolement et identification

La morphologie (cocci Gram + en amas) est très évocatrice dès l'examen microscopique.

Pour isoler *St. aureus* des prélèvements plurimicrobiens, on peut utiliser des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman qui contient du mannitol et une forte concentration de NaCl.

Staphylococcus aureus peut être facilement cultivé sur des milieux ordinaires.

Des épreuves enzymatiques simples (oxydase - , catalase +) permettent de reconnaître le genre ; d'autres tests définissent l'espèce (présence d'une coagulase libre ou liée).

■ Diagnostic sérologique

Le taux sérique normal des antistaphylolysines a étant de 0,5 à 2 Unités par millilitre, un taux supérieur à 2 U est donc significatif. Ce dosage est rarement demandé.

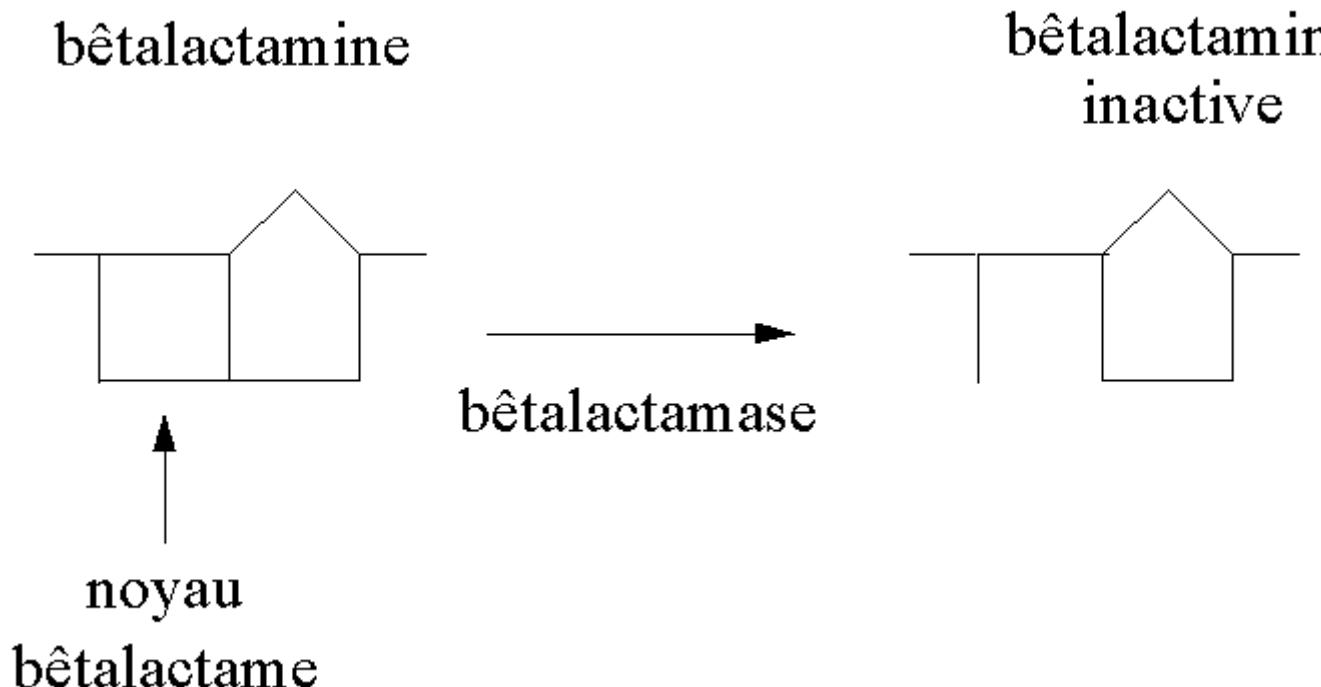
■ Typage des souches

Il permet un diagnostic épidémiologique dans les collectivités, au cours d'une enquête entreprise à la suite d'une intoxication alimentaire et dans la surveillance et le contrôle des infections nosocomiales. On peut typer les souches par séro-agglutination ou par lysotypie et mettre en évidence les toxines mais il s'agit de recherches particulières réservées aux laboratoires de référence.

RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

bêtalactamines

La résistance de *Staphylococcus aureus* aux bêtalactamines relève de plusieurs mécanismes :



La production, d'origine plasmidique, de bêtalactamases,

Les bêtalactamases sont des enzymes inactivant l'antibiotique par ouverture du cycle bêtalactame. La bêtalactamase du staphylocoque est une pénicillinase qui induit une résistance aux pénicillines G et A (Ampicilline, Amoxicilline), aux carboxypénicillines (Ticarcilline) et aux acyluréidopénicillines (Mezlocilline, Azlocilline et Pipéracilline) mais n'a pas d'effet sur les pénicillines M (Méticilline, Oxacilline, Cloxacilline), les céphalosporines et les pénèmes (Imipenem). Cette pénicillinase staphylococcique est inactivée par des produits dénommés "inhibiteurs de bêtalactamases" (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam) qui, associés aux bêtalactamines, restaurent leur efficacité. En milieu hospitalier, 80% au moins des staphylocoques sont producteurs de bêtalactamase.

La modification de la cible, d'origine chromosomal

La cible des bêtalactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaires à la formation du peptidoglycane de la paroi. Les bêtalactamines se fixent d'une manière irréversible à l'une ou l'autre de ces enzymes appelées, pour cette raison, "P.L.P." (protéine liant la pénicilline, en

anglais : "P.B.P." pour protein binding penicillin). En présence d'une bétalactamine, les bactéries ont de ce fait une paroi fragilisée et sont incapables de résister aux chocs osmotiques.

Les souches résistantes élaborent une "P.L.P. 2a" pour laquelle les bétalactamines n'ont pas d'affinité ou une affinité réduite. La résistance, ainsi induite, ne concerne parfois qu'une partie de la population d'une souche ; elle est, pour cette raison, dénommée "résistance hétérogène".

On la détecte en testant l'activité de l'oxacilline (une pénicilline M) dans des conditions de culture particulières (milieu hypertonique ou incubation à 30°C).

Les souches possédant ce type de résistance, sont dites "méti-R" et désignées par le sigle "SAMR" (pour *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant - appellation qui n'est pas très indiquée puisque la méticilline n'est plus commercialisée). Les souches méti-R sont résistantes à toutes les bétalactamines et généralement résistantes aux autres familles d'antibiotiques (souches polyrésistantes). Toutes ces souches produisent la pénicillinase staphylococcique.

Elles sont surtout isolées en milieu hospitalier (20% des souches hospitalières, moins de 1% des souches "de ville").

Autres mécanismes de résistance à la méticilline

par diminution de la synthèse et/ou de l'affinité d'une des P.L.P.,

par hyperproduction de bétalactamase,

par production de méticillinase.

Ce sont des mécanismes beaucoup plus rares et occasionnant des résistances de moindre niveau.

■ aminosides

Staphylococcus aureus est normalement sensible aux aminosides mais des résistances sont fréquemment détectées surtout parmi les souches méti-R. Elles sont dues à une inactivation de l'antibiotique par diverses enzymes bactériennes.

Parmi les aminosides, la molécule la plus active est la gentamicine et toute souche résistante à cet antibiotique résiste aux autres aminosides (phénotype KGT). Certaines souches opposent une double résistance à l'amikacine et à la tobramycine (phénotype KT), et d'autres, une résistance limitée à l'amikacine et à la néomycine (phénotype KNm).

■ macrolides et apparentés : MLS (Macrolides, Lincosamines, Synergistines)

Les macrolides vrais (Erythromycine, Josamycine) et les lincosamines (Lincomycine, Clindamycine) sont efficaces mais on observe des résistances par modification de la cible ribosomale.

Les synergistines (Pristinamycine) sont presque toujours actives et constituent d'excellents antistaphylococciques.

Tous ces produits sont utilisables comme une alternative aux bétalactamines en cas d'allergie à ces dernières.

■ autres antibiotiques

Fosfomycine, acide Fusidique, Rifampicine et Quinolones fluorées (Péfloxacine, Ofloxacine, Ciprofloxacine) sont presque toujours actifs. Ils ne sont utilisés qu'en association pour éviter la sélection de mutants résistants.

Les glycopeptides (Vancomycine, Teicoplanine) sont très efficaces - il n'existe pas de souche résistante - mais doivent être réservés aux infections sévères.

Au total :

Pour un *Staphylococcus aureus* "méti-S", les pénicillines M constituent le traitement de choix , associées à un aminoside dans les infections graves. Les céphalosporines de 1ère génération (C1G) et la Pristinamycine peuvent être utilisés en deuxième intention. Sont également utiles les macrolides, les lincosamines, l'acide Fusidique, la Rifampicine et l'association Amoxicilline-acide clavulanique. Les aminosides peuvent être prescrits en association.

Pour un *Staphylococcus aureus* "méti-R", les glycopeptides, et particulièrement la Vancomycine, s'imposent en monothérapie ou, selon la localisation, en association avec d'autres molécules actives telles que Fosfomycine, Rifampicine, Quinolones systémiques ou acide Fusidique.

En milieu hospitalier, la prévention des staphylococcies sévères et difficiles à traiter nécessite la détection des souches polyrésistantes, des mesures d'hygiène rigoureuses pour éviter leur diffusion avec éventuellement l'isolement des porteurs et une tentative d'éradication par l'usage raisonnable d'antibiotiques appropriés.

STAPHYLOCOQUES coagulase-négatifs

Longtemps opposés aux "staphylocoques dorés" réputés dangereux, les "staphylocoques blancs" étaient considérés comme de simples commensaux de la peau et des muqueuses car ils sont omniprésents. D'indéniables infections nosocomiales causées par ces staphylocoques "non pathogènes" ont suscité des travaux visant à les identifier et à les classer.

On les désigne sous le nom de "staphylocoques coagulase-négatifs" (SCN) car, contrairement aux *Staphylococcus aureus*, la plupart d'entre eux sont dépourvus de cette enzyme.

CLASSIFICATION et HABITAT

Vingt neuf espèces de SCN sont répertoriées ; certaines sont des hôtes de l'homme, d'autres de l'animal et d'autres de l'homme et de l'animal.

Chez l'homme, *Staphylococcus epidermidis* domine largement en particulier sur la peau mais sur certains sites on trouve aussi d'autres espèces : *St. capitis* sur le cuir chevelu, *St auricularis* dans le conduit auditif externe, *St hominis* ou *haemolyticus* sur les zones sèches... Sur les muqueuses intestinales ou nasales on isole surtout *St.*

epidermidis. et sur la muqueuse vaginale, *St. epidermidis* et *St. saprophyticus*.

Cette répartition varie légèrement selon l'âge, les habitudes, le mode de vie et une éventuelle antibiothérapie.

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Les SCN sont évidemment reconnus, d'une manière plus pragmatique que scientifique, par l'absence de coagulase ce qui les différencie de *Staphylococcus aureus* (quelques espèces de SCN, animales surtout, possèdent toutefois l'enzyme). De plus , la majorité d'entre eux sont incapables de fermenter le mannitol.

Leur identification plus complète repose sur des caractères bactériologiques classiques (nitratase, phosphatase, ornithine décarboxylase, fermentations sucrées ...). Comme cela a déjà été signalé à propos de *St. aureus*, il importe de les distinguer des microcoques. Il existe des galeries miniaturisées spécialement conçues à cette fin. La démarche est cependant longue et assez coûteuse et n'a d'intérêt que dans des circonstances épidémiologiques particulières.

POUVOIR PATHOGÈNE

Les SCN sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales et iatrogènes. Leur virulence est en rapport avec leur capacité d'adhésion aux matériels étrangers car ils élaborent une substance polysaccharidique dénommée "slime" qui facilite cette adhérence.

Cathéters, voies veineuses centrales, sondes, prothèses valvulaires cardiaques ou prothèses osseuses, valves sont les portes d'entrée ou le siège de ces infections qui occasionnent des septicémies, bactériémies, endocardites, médiastinites après chirurgie cardiaque, infections urinaires ou prostatiques après chirurgie ou endoscopie, infections sur valves de dérivation pour traiter l'hydrocéphalie.

Signalons le cas particulier des infections urinaires dues à *Staphylococcus saprophyticus* frappant surtout les femmes jeunes.

SENSIBILITÉ DES SCN AUX ANTIBIOTIQUES

Les SCN forment un groupe hétérogène et leur comportement vis-à-vis des antibiotiques varie selon les espèces. A l'exception de *St. saprophyticus*, ils sont généralement plus résistants aux antibiotiques que *St. aureus*.

Certains opposent des résistances naturelles utiles pour les identifier : *saprophyticus* résistant à la novobiocine et à la fosfomycine, *epidermidis* (et *aureus*) résistant à la polymyxine, *haemolyticus* résistant à la bacitracine etc...

Les mécanismes de résistance aux bétalactamines sont identiques à ceux décrits pour *aureus* : production de pénicillinase et modification des PLP. Une souche "méti-R" est résistante à toutes les bétalactamines.

Quatre vingt dix pour cent des souches "méti-R" sont résistantes aux aminosides ; cette proportion tombe à 15% pour les souches "méti-S". Il existe des souches présentant une résistance isolée à l'amikacine parfois associée à une résistance à la tobramycine.

Les résistances aux macrolides et apparentés sont fréquentes chez les souches "méti-R".

Les autres antistaphylococciques (acide Fusidique, Fosfomycine, Rifampicine) sont efficaces.

Les glycopeptides sont actifs, même sur les souches polyrésistantes "méti-R".

STAPHYLOCOCCUS SAPROPHYTICUS

Il s'agit d'un staphylocoque dépourvu de coagulase (SCN) mais qui fermente le mannitol comme *St. aureus*. Contrairement à la plupart des staphylocoques isolés chez l'homme il est résistant à la novobiocine (la zone d'inhibition de la culture autour d'un disque chargé à 5 mg de novobiocine est inférieure à 16 mm).

***Staphylococcus saprophyticus* est responsable d'infections urinaires chez la femme jeune. Il est la cause de 3 à 4 % des cystites banales de la femme. On l'isole plus souvent en ville qu'à l'hôpital. Les tests de dépistage des infections urinaires (bandelettes) sont souvent en défaut car le test au nitrite est négatif. Il faut pratiquer un examen cyto-bactériologique complet des urines pour reconnaître une cystite à *St. saprophyticus*.**

Il est sensible à la plupart des antibiotiques à visée urinaire sauf à la fosfomycine (résistance naturelle).

STOMATOCOCCUS MUCILAGINOSUS

***Stomatococcus mucilinosus* est un saprophyte de la gorge et de la bouche parfois responsable d'infections opportunistes.**

C'est un coque à Gram positif capsulé dont l'activité catalasique est faible ou nulle. Il se multiplie sur des milieux enrichis au sang en donnant des colonies très adhérentes mais ne se développe pas en milieu hypersalé.

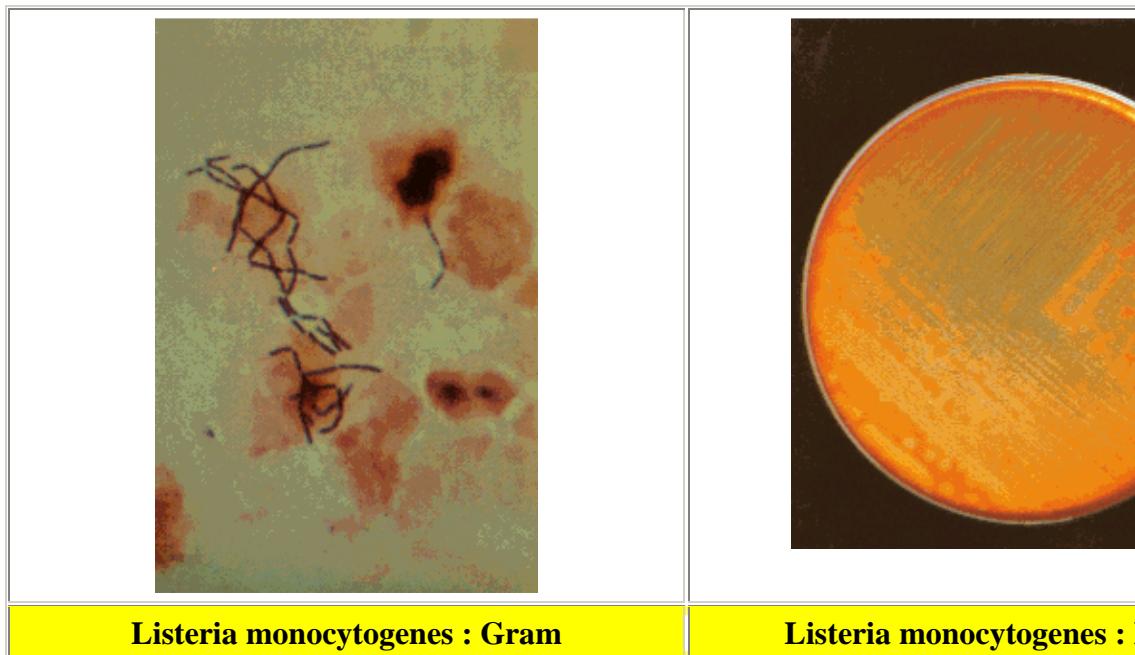
LISTERIA MONOCYTOGENES

Décrise pour la première fois en 1926, *Listeria monocytogenes* a été considérée, jusque dans les années 50, comme une curiosité bactériologique. Depuis, on s'est rendu compte que, si les infections qu'elle occasionnait n'étaient pas très fréquentes, elles étaient par contre graves, donnant souvent lieu à des atteintes neuro-méningées en particulier chez les nouveau-nés ou chez les sujets âgés. En France, une importante épidémie observée en 1992 avec 300 cas répertoriés et 50 décès a placé la bactérie au premier rang des préoccupations des autorités sanitaires.

BACTERIOLOGIE

***Listeria monocytogenes* est un bacille à Gram positif, non capsulé, non sporulé, mobile à 20°C mais immobile à 37°C qui se développe facilement sur milieux usuels ou sur gélose au sang où les colonies s'entourent d'une zone de β hémolyse. Il est aéro-anaérobiose facultatif. Il est capable de se multiplier à de très basses températures (jusqu'à 2°C).**

Il possède une catalase mais pas d'oxydase ; il fermente le glucose sans dégager de gaz, produit de l'acétyl-méthyl-carbinol (réaction de Voges-Proskauer +). Il ne possède pas d'uréase, ne produit ni indole ni H₂S mais hydrolyse rapidement l'esculine. Le camp-test, en présence de Staphylocoques, est positif.



Listeria monocytogenes : Gram

Listeria monocytogenes :]

ANTIGENES

Les antigènes somatiques sont des acides téichoïques de la paroi. Ils sont au nombre de 15 (I à XV) et les antigènes flagellaires, protéiques, au nombre de 5 (A, B, C, D, E). La combinaison des deux types d'antigènes détermine 17 sérovars différents mais en France, le sérovar 4b domine largement avec les sérovars 1/2a et 1/2b.

Listeria monocytogenes produit une listériolysine suscitant la formation d'antilistériolysines.

LYSOTYPES

On dénombre 25 lysotypes parmi les souches des sérovars 1 et 119 pour celles des sérovars 4.

POUVOIR PATHOGENE

Listeria est souvent décrite comme une bactérie opportuniste occasionnant des troubles chez les sujets fragiles ou immunodéprimés. En fait, elle peut très bien se comporter comme une bactérie virulente frappant les sujets en parfaite santé.

- **chez le nouveau-né**

Les infections néonatales représentent 60% des cas de listériose humaine.

Contaminé par voie transplacentaire, l'enfant est atteint dès les premières heures de vie d'infection généralisée septicémique avec multiples localisations et souvent atteinte neuro-ménigée (*granulomatosis infantis septica*).

Si la contamination est plus tardive, pendant l'accouchement, l'infection n'est patente qu'après une dizaine de jours et se manifeste par une méningite.

La mortalité est importante ou les séquelles fréquentes.

- **chez la femme enceinte**

L'infection est souvent cliniquement muette, parfois responsable d'un syndrome grippal ou d'une fièvre inexplicable avec, plus rarement, des troubles urinaires, digestifs ou même un ictère transitoire. C'est souvent lors de la naissance d'un enfant infecté que le diagnostic est rétrospectivement évoqué.

La listériose maternelle peut aussi être cause d'avortement ou d'accouchement prématué d'un enfant contaminé.

- **chez le grand enfant et l'adulte**

La listériose de l'adulte donne lieu à une méningo-encéphalite ou plus rarement à une septicémie. Elle est grevée d'une lourde mortalité.

- **chez l'animal**

Presque tous les animaux peuvent être atteints ; septicémies, encéphalites, avortements sont les manifestations le plus souvent observées.

PHYSIOPATHOLOGIE

Le rhino-pharynx et surtout le tube digestif constituent les portes d'entrée des *Listeria*.

Les bactéries pénètrent dans les cellules et passent dans le sang ; elles sont captées par les cellules phagocytaires du foie et de la rate où elles se multiplient et envahissent le parenchyme environnant jusqu'aux capillaires sanguins. Une deuxième décharge dans le sang conduit les bactéries jusqu'au système nerveux central provoquant encéphalite et méningite.

Listeria monocytogenes est une bactérie à développement intracellulaire. Elle pénètre dans la cellule par phagocytose. Inclue alors dans le phagolysosome, elle échappe à la destruction grâce à la production de listériolysine qui détruit la membrane vacuolaire et se trouve alors libre dans le cytoplasme où elle se multiplie activement. Elle provoque la polymérisation de l'actine cellulaire et s'en trouve mobilisée jusqu'à la membrane cytoplasmique formant des évaginations et poussant des pseudopodes à l'intérieur des cellules voisines qui sont donc infestées de proche en proche.

IMMUNITE

Listeria monocytogenes déclenche une réponse immunitaire à médiation cellulaire qui, sous l'effet de cytokines, provoque l'afflux de macrophages vers les sites infectieux constituant des granulomes inflammatoires où les bactéries sont détruites. Les lymphocytes T mémoire perpétuent un état de résistance à l'infection.

Les anticorps n'ont guère d'effets protecteurs.

HABITAT - EPIDEMIOLOGIE

Les *Listeria* sont présentes partout, dans l'environnement, chez les animaux et chez l'homme. Elles sont très résistantes.

L'homme est contaminé principalement par voie digestive ; la contamination directe est très rare sauf en cas de transmission foeto-maternelle.

La présence fréquente de *Listeria* dans les aliments est sans doute facilitée par la possibilité qu'a la bactérie de se développer aux basses températures des chambres froides. Les sources de contamination sont les produits laitiers, les fromages au lait cru à pâte molle, les pâtés, rillettes, viande hachée et les légumes crus ou vendus sous vide.

L'évolution des habitudes alimentaires n'est sans doute pas étrangère à l'accentuation du mode épidémique de l'infection.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

On isole les *Listeria* des produits pathologiques (ou des aliments) par culture essentiellement.

Le développement est possible sur milieux usuels mais on préfère utiliser une gélose au sang pour détecter l'hémolyse. L'adjonction d'acide nalidixique (NégramR) fait de la gélose un milieu sélectif utile en cas de prélèvement multimicrobien.

L'identification se fonde sur la morphologie et les propriétés biochimiques (Gram +, catalase +, VP +, esculine+...). Un sérotypage de la souche est possible en utilisant des antisérum agglutinants (les sérum anti 1 et 4b sont commercialisés).

Le sérodiagnostic a peu d'intérêt. On utilise des suspensions antigéniques tuées de sérovares 1 et 4b pour une réaction d'agglutination en tube. Les titres doivent être supérieurs à 320 pour être considérés comme significatifs. La recherche dans le sérum de la mère d'anticorps spécifiques de la souche isolée chez un nouveau-né permet de démontrer rétrospectivement l'infection maternelle.

Le dosage d'antilistériolysine a fait l'objet de publications mais aucun réactif n'est commercialisé à ce jour.

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Listeria monocytogenes est sensible à la plupart des antibiotiques. Les lincosamides

sont toutefois naturellement sans effet, les céphalosporines et nouvelles quinolones sont peu actives.

Le traitement préconisé le plus souvent est une association ampicilline et gentamicine. Il doit être maintenu pendant plusieurs semaines.

AUTRES ESPECES

Le genre *Listeria* comprend sept espèces.

- *Listeria monocytogenes*,
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria innocua*
- *Listeria welchimeri*
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria grayi*
- *Listeria murrayi*

On les distingue par leurs caractères biochimiques.

Seuls *L. monocytogenes* (homme, animal) et *L. ivanovii* (animal) sont pathogènes.

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE

La diphtérie est connue depuis longtemps :

- Klebs, en 1883, en décrit l'agent responsable, que Loeffler réussit à cultiver en 1884.
- En 1888, Roux et Yersin démontrent le rôle de la toxine.
- En 1890, Behring découvre l'antitoxine et en 1923, Ramon produit l'anatoxine.
- En 1970 enfin, est précisé le mécanisme moléculaire d'action de la toxine.

BACTÉRIOLOGIE

Corynebacterium diphtheriae est un bacille à Gram positif, non ramifié, non sporulé, non capsulé et immobile. Les bactéries se présentent souvent en forme de massue et groupées en amas donnant des images en palissade, en paquets d'épingles ou en lettres de l'alphabet. Certaines techniques de coloration (Del Vecchio ou Ernst-Neisser) mettent en évidence des granulations métachromatiques à l'intérieur des corps bactériens. Ces aspects morphologiques sont assez caractéristiques et différent de ceux des corynebactéries dites commensales, qui apparaissent plus courtes et plus trapues.

Des caractères biochimiques (catalase +, urée - , glucose +, saccharose - , dextrine +, nitrate réductase +, H₂S +) distinguent le bacille diphtérique des autres corynebactéries.

La culture, en atmosphère aérobie ou anaérobiose, exige la présence de nombreux facteurs de croissance (du fer en particulier) et par conséquent nécessite des milieux

riches.

- Le **milieu de Loeffler** au sérum coagulé est le milieu classique utilisé pour l'isolement de *Corynebacterium diphtheriae*, qui est sérophile.
- Le **milieu GHT** (gélose, hémoglobine, tellurite) est rendu sélectif par l'adjonction de tellurite de potassium, dont la présence inhibe le développement de la plupart des bactéries habituellement présentes dans le rhino-pharynx. Sur ce milieu, les colonies de *C. diphtheriae* sont noires à cause de la réduction du tellurite. Selon l'aspect des colonies, on distingue différentes variétés dénommées *gravis*, *mitis* ou *intermedius*.
- Le **milieu de Tinsdale**, également sélectif, contient du sang laqué, de la cystéine et du tellurite. La production d'H₂S (à partir de la cystéine) donne au milieu une coloration noire autour des colonies de *C. diphtheriae* qui sont elles-mêmes également noires à cause de la réduction du tellurite.

CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES

C. diphtheriae possède des antigènes O polyosidiques, communs à toutes les souches, et des antigènes protéiques de surface K, définissant des types sérologiques (mais le sérotypage n'est pas standardisé et est peu utilisé). Les anticorps éventuellement produits ne permettent pas d'envisager de reconnaître l'infection en pratiquant un sérodiagnostic.

BACTÉRIOCINES

C. diphtheriae produit des bactériocines qui permettent le typage des souches.

TOXINE

Corynebacterium diphtheriae élabore une puissante toxine protéique (exotoxine) constituée d'une chaîne polypeptidique de 62 kD contenant 2 ponts disulfures dont la séquence des acides aminés est connue. On lui distingue 2 fragments A et B :

- le fragment B (38 kD) permet la fixation sur un récepteur cellulaire
- et le fragment A (24 kD) est le support de l'activité toxique.

Après fixation de la toxine, le fragment A, clivé par des enzymes membranaires, libère dans le cytoplasme une activité enzymatique (ADP riboxylase) qui, en présence de NAD cellulaire, inhibe le facteur d'elongation EF2 nécessaire à la constitution des chaînes polypeptidiques : les synthèses protéiques de la cellule s'en trouvent donc bloquées.

La toxine n'est produite que par les souches possédant le gène "tox+" qui est fourni par un bactériophage β. Ce gène est inhibé par un répresseur chromosomal qui est actif en présence de fer. La toxine n'est donc produite que si la concentration du milieu en fer est inférieure à 100 µg/l (à noter : la croissance optimale de la bactérie nécessite cependant des concentrations en fer plus élevées).

Les effets pathogènes de la toxine peuvent être mis en évidence par injection sous-cutanée au cobaye d'une suspension de bacilles diphtériques. L'animal meurt en 48 à 72

heures porteur :

- au point d'inoculation d'un oedème blanc, mou, gélatineux avec adénopathie satellite
- et à distance d'une hypertrophie avec congestion hémorragique des capsules surrénales.

L'injection de toxine seule ne provoque que les lésions à distance mais est également létale.

Le dosage de la toxine est possible par une méthode biologique qui évalue la **Dose Minima Mortelle (DMM)** ou la **DM50**, dose qui tue la moitié d'un lot de cobaye. Un milligramme de toxine titre 14.000 DMM. Une méthode indirecte se fonde sur la neutralisation de l'effet létal par un sérum antitoxique titré qui est plus stable. On peut surtout doser la toxine *in vitro* par la méthode de "floculation initiale" de Ramon.

La toxine formolée et chauffée perd son pouvoir toxique mais conserve son pouvoir antigénique : elle devient ainsi l'**anatoxine** qui, purifiée, est utilisée comme vaccin antidiptérique.

LA DIPHTÉRIE (D.O n°6)

L'infection se manifeste par des lésions locales dues à une colonisation des tissus par la bactérie et à des manifestations générales à distance dues à l'action de la toxine.

La forme typique est une **angine pseudomembraneuse** caractérisée par la formation sur l'amygdale et la luette d'un enduit blanchâtre, extensif, cohérent et adhérent avec adénopathies satellites. Dans les formes sévères, il existe en outre des signes d'intoxication donnant lieu précocement ou secondairement à des paralysies vélo-palatines avec troubles de la phonation, à des polynévrites des membres et à une myocardite avec troubles du rythme, hypotension et collapsus. Peuvent aussi survenir des troubles rénaux et digestifs ainsi que des hémorragies.

Il existe d'autres localisations de la diphtérie dont la plus connue est la diphtérie laryngée ou **croup** avec le risque d'asphyxie par obstruction des voies respiratoires nécessitant une trachéotomie. Les localisations nasales (plus fréquentes chez le nourrisson), oculaires, auriculaires ou cutanées sont généralement moins sévères.

Maladie à déclaration obligatoire (n°6).

IMMUNITÉ

La maladie immunise mal et il est recommandé de vacciner les convalescents. Il apparaît cependant des anticorps antibactériens étroitement spécifiques de la souche incriminée mais, comme il existe de nombreux variants sérotypiques, l'immunité ne peut pas être totale.

C'est surtout une immunité antitoxique qui est protectrice mais elle n'est suffisante que si le titre des anticorps atteint 1/30e d'unité antitoxique/ml (une unité antitoxique est la dose d'antitoxine capable de neutraliser 1 DMM de toxine). On peut évaluer l'état

immunitaire par la **réaction de Schick** qui consiste à injecter en intradermique 1/50e de DMM de toxine : chez les sujets protégés, on n'observe aucune réaction tandis que, chez les sujets sensibles, survient une réaction papulo-erythémateuse.

ÉPIDÉMIOLOGIE

La diphtérie est une maladie strictement humaine. On ne trouve les bactéries responsables ni dans l'environnement, ni chez l'animal, et la contagion est donc exclusivement interhumaine.

La maladie a pratiquement disparu dans les pays développés mais sévit encore dans les pays du tiers monde où la mortalité est de 5 à 10%. Il faut cependant noter qu'on a observé en France durant ces dernières années de rares cas d'infections systémiques, septicémiques, broncho-pulmonaires, ostéo-articulaires, vaginales ou cutanées à *Corynebacterium diphtheriae*.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le diagnostic biologique de la diphtérie nécessite la mise en évidence d'une souche toxinogène de *Corynebacterium diphtheriae*.

Le prélèvement pharyngé, nasal, cutané ou autre se fait par écouvillonnage des lésions. On ensemence le plus rapidement possible sur milieu de Loeffler et on pratique des frottis.

L'examen microscopique direct de ces frottis est rarement concluant mais permet un diagnostic de suspicion s'il montre la présence de bacilles à Gram positif dont la morphologie et la disposition sont évocatrices.

Le bacille diptérique se développe rapidement sur milieu de Loeffler, en tout cas plus vite que les bactéries hôtes du naso-pharynx et il importe donc d'examiner les cultures après 6, 12 et 18 heures d'étauve. On procède à un raclage de la surface du milieu qu'on étale sur lame. Après fixation, on colore par la technique de Gram sans recolorer par la fuchsine et on examine pour détecter la présence de bacilles "diphtérimorphes", qui constitue une forte présomption de diphtérie.

On procède alors à un isolement sur milieu riche contenant du tellurite pour inhiber la culture des germes commensaux (milieu de Tinsdale ou milieu GHT). Les colonies suspectes apparaissent grises ou noires selon les types. On les repique sur milieux d'identification pour étudier les caractères biochimiques.

Il faut aussi mettre en évidence la production de toxine : pour cela, on inocule un cobaye avec une suspension de la souche isolée pour observer à l'autopsie les lésions caractéristiques. On peut aussi effectuer la recherche de la toxine par une réaction d'immunoprécipitation en milieu gélosé en présence d'un sérum antitoxique spécifique (**test d'Elek**).

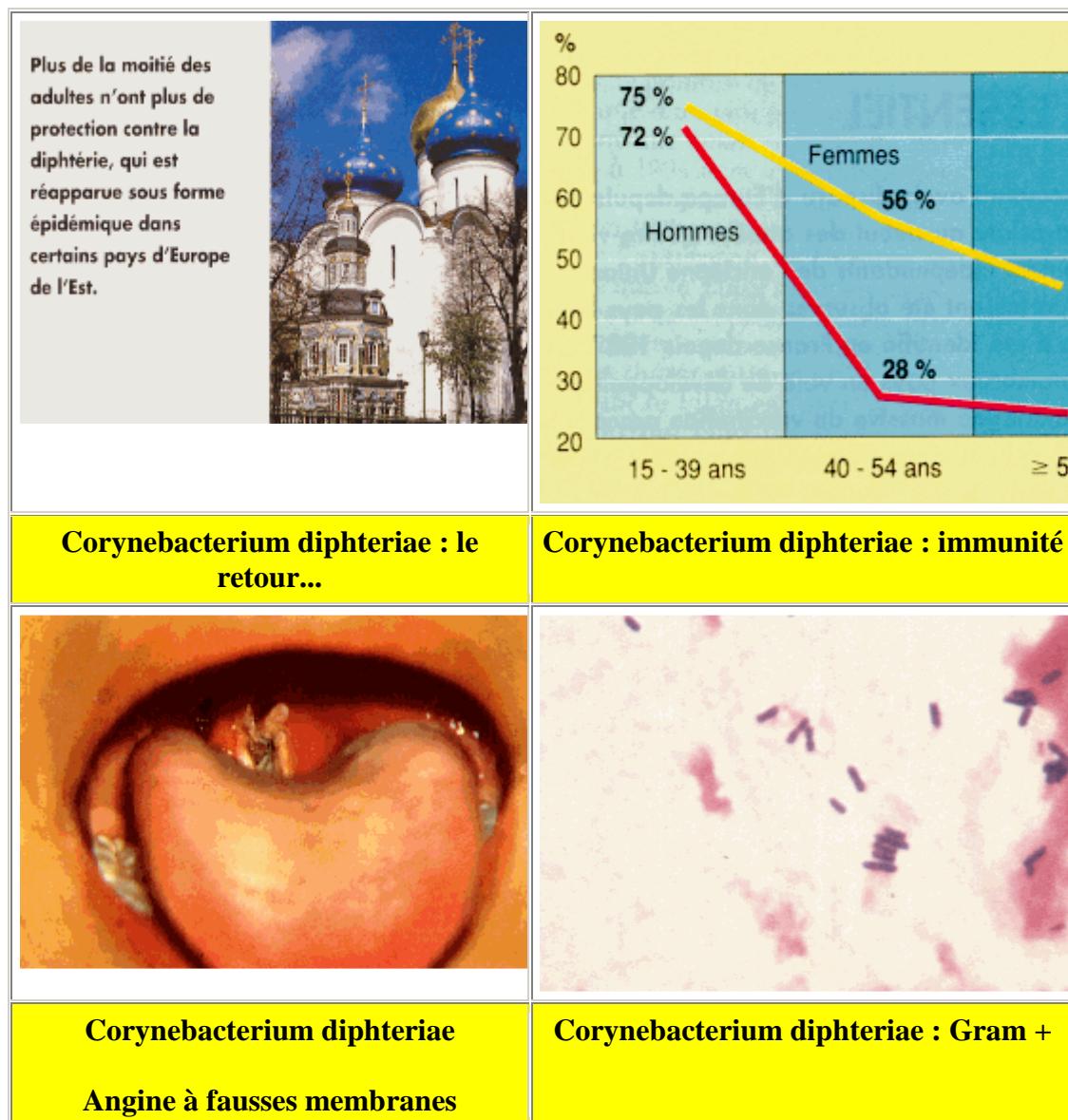
TRAITEMENT

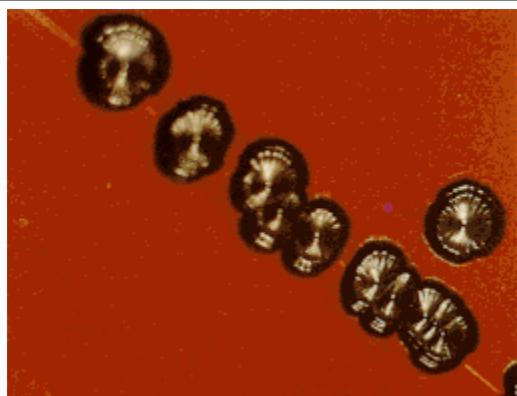
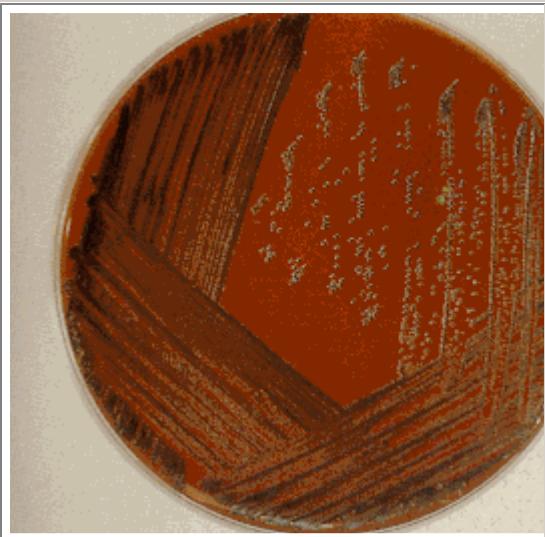
Le diagnostic biologique de certitude demande plusieurs jours et il est préférable de

commencer le traitement dès que le diagnostic est suspecté.

Le traitement curatif repose sur la sérothérapie antidiphérique qui doit être instituée rapidement car l'antitoxine n'a plus d'effets quand la toxine s'est fixée sur les cellules. On utilise des doses de 40.000 à 100.000 UI injectées selon le classique protocole de Besredka. On y adjoint une antibiothérapie par pénicilline ou érythromycine pour détruire la source de toxine.

Le traitement préventif repose sur la vaccination par l'anatoxine, obligatoire en France dans le courant de la première année. Elle nécessite 3 injections sous cutanées avec rappel après un an puis tous les cinq ans. Elle est presque toujours associée (vaccinations antitétanique, antipoliomyélitique, anticoquelucheuse...).





Corynebacterium diphtheriae : culture sur gélose au sang + tellurite

BACILLUS

Le genre *Bacillus* est très hétérogène et comprend au moins 36 espèces. Ce sont des bacilles à Gram positif, formant des spores, mobiles sauf *Bacillus anthracis*.

La classification la plus utilisée se fonde sur la forme de la spore et distingue 3 groupes :

- *bacillus* à spore ovale non déformante,
- *bacilles* à spore ovale déformante,
- *bacilles* à spore ronde déformante.

HABITAT

Les *Bacillus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes. On en trouve également dans les aliments, et même dans les produits "stérilisés" alimentaires ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores.

POUVOIR PATHOGENE

Bacillus anthracis est l'espèce la plus pathogène, responsable du "charbon" qui atteint les animaux, mammifères (ovins, caprins), certains oiseaux (autruches, canards), des insectes et leurs larves et occasionnellement l'homme.

Bacillus cereus occasionne des intoxications alimentaires mais aussi, et surtout chez les sujets fragiles, des septicémies, méningites, infections respiratoires et des myonécroses.

Bacillus subtilis, *licheniformis*, *sphaericus* sont également impliqués au cours

d'intoxications alimentaires.

Certaines espèces, entomopathogènes (*B. thuringiensis, larvae*) sont utilisées à l'état de spores sous forme de poudre répandue à la surface des eaux stagnantes pour détruire les larves de moustiques.

BACILLUS ANTHRACIS

Le "charbon" est une maladie connue depuis l'antiquité (plaies d'Egypte). Les troupeaux de moutons sont ravagés mais la maladie frappe les bovidés ainsi que les chèvres.

- Dès 1780, **Chabert** décrit la maladie animale et insiste sur la coloration noire des organes des animaux charbonneux.
- En 1785, **Chaussier** observe chez l'homme la survenue de la pustule maligne.
- En 1825, **Barthelemy** réussit à transmettre la maladie à des animaux sains en inoculant du sang de malades.
- Vers 1850, l'ampleur des épidémies incite les autorités à prendre des mesures et une commission est créée dont fait partie **Davaïne** qui découvre dans le sang des animaux atteints des petits bâtonnets mais c'est seulement treize ans plus tard, en 1863, qu'il établit que ces bâtonnets, dénommés bactéries charbonneuses, sont la cause de la maladie.
- En 1876, **Koch** réussit la culture de la bactéridie et observe les spores.
- En 1881, la célèbre expérience de Pouilly-le-Fort donne à **Pasteur** la possibilité de démontrer la responsabilité de la bactérie dans la maladie et l'efficacité d'un vaccin constitué d'une souche de virulence atténuee par vieillissement.

La bactérie

Bacillus anthracis est un grand bacille (5/1 µm) à Gram positif. Il forme une spore centrale, ovalaire et non déformante qui n'est toutefois pas toujours perceptible car la sporulation n'est effective que dans des circonstances particulières.

La culture est facile sur milieux usuels. La bactérie est aéro-anaérobiose facultative. Les colonies obtenues sur milieux enrichis par du sérum et en atmosphère contenant 10% de CO₂ sont lisses parce que **capsulées**. Contrairement aux autres espèces du genre, *Bacillus anthracis* est **immobile**.

Il est protéolytique, liquéfie la gélatine mais ne possède pas d'uréase. Il fermenter certains sucres (glucose, maltose, saccharose) et produit de l'acétyl-méthyl-carbinol (VP+) qui est un caractère utilisé pour la classification des *Bacillus*.

Il élabore une toxine comprenant trois facteurs qui agissent en synergie :

- I, oedématogène
- II, immunogène et
- III létal.

Il possède divers antigènes : outre la toxine (facteur II), il existe un antigène capsulaire

polypeptidique et un antigène somatique polysaccharidique responsable d'une réaction de précipitation en présence d'anticorps spécifiques (réaction d'Ascoli).

La maladie charbonneuse

- **chez l'animal**, le charbon frappe surtout les mammifères herbivores et certains oiseaux, occasionnant une infection septicémique rapidement mortelle avec oedème hémorragique des muqueuses et exsudation de sang noir par les orifices naturels
- **chez l'homme** :
 - **la forme cutanée**, la plus fréquente, se manifeste par une lésion siégeant au point de pénétration du bacille constituée d'une pustule noirâtre entourée de petites vésicules et rapidement transformée en escarre nécrotique. L'infection évolue le plus souvent sans fièvre ni douleur ni altération de l'état général et guérit spontanément en peu de temps. Il existe cependant des formes graves avec oedème malin.
 - **la forme pulmonaire** due à l'inhalation de spores est exceptionnelle et donne lieu à une pneumopathie aiguë souvent mortelle
 - **la forme gastro-intestinale** due à l'ingestion de viande contaminée ne se voit que dans les régions déshéritées et occasionne une diarrhée sévère avec déshydratation et constitution d'escarres intestinales.
 - **la forme septicémique** fréquemment accompagnée d'une atteinte méningée est primitive ou complique l'une des formes précédentes ; elle est souvent mortelle d'autant plus qu'elle frappe essentiellement les sujets fragilisés.

Physiopathologie

La virulence des souches pathogènes est due d'une part à la capsule qui protège la bactérie de la phagocytose et d'autre part à la production de la toxine responsable des oedèmes hémorragiques.

C'est la **spore** qui pénètre dans l'organisme en traversant la peau ou les muqueuses lésées et donne naissance dans les tissus aux formes végétatives. Une réaction inflammatoire avec nécrose et thromboses vasculaires se développe et suffit souvent pour contrôler l'infection. Dans les formes graves, se succèdent envahissement ganglionnaire, dissémination par voie sanguine et propagation dans tous les tissus tandis que la toxine charbonneuse produite en grande quantité occasionne un choc toxique souvent mortel.

Epidémiologie

La maladie animale, rarement observée en Europe, sévit surtout aux Indes et en Afrique ainsi qu'au Moyen Orient et en Amérique du Sud. Les spores persistent dans les sols et les animaux se contaminent en broutant mais la maladie n'est pas directement transmissible d'animal contaminé à animal sain.

Hors contexte de bioterrorisme (comme fin 2001, aux USA), les contaminations humaines sont presque toujours professionnelles et sont la cause de 20 à 100.000 cas

annuels dans le monde. Ce sont en majorité des formes cutanées ; les formes graves sont exceptionnelles.

Diagnostic biologique

On met en évidence la bactérie dans la sérosité des vésicules par culture ou dans le sang par hémoculture. Dans les prélèvements plurimicrobiens, selles ou expectorations, la recherche est plus difficile et il est recommandé d'éliminer la flore non sporulée par chauffage à 80°C.

La culture est facile sur milieux ordinaires et la morphologie, l'aspect des colonies et les caractères biochimiques permettent l'identification.

Contrairement aux autres espèces du genre, les souches virulentes de *Bacillus anthracis*, même à faible concentration, tuent le cobaye ou la souris en 24 à 48 heures.

La classique réaction d'Ascoli; qui est une réaction de précipitation entre l'antigène polysaccharidique de la souche et un sérum anticharbonneux, est peu sensible mais assez spécifique.

Un sérodiagnostic est possible mais n'est utile que pour vérifier l'efficacité de la vaccination chez l'animal.

Sensibilité aux antibiotiques

Bacillus anthracis est sensible aux antibiotiques et à la pénicilline G en particulier mais il faut s'assurer que la souche n'est pas productrice de β lactamase.

Le traitement recommandé fait appel en 1e intention aux **fluoroquinolones** (ciprofloxacine, ofloxacine ou levofloxacine). En 2e intention, après isolement et détermination de la sensibilité de la souche aux antibiotiques, on peut utiliser la doxycycline ou l'amoxicilline. Le traitement dure au total 8 semaines.

Prophylaxie

En France, une prophylaxie animale est possible par vaccination (on ne sait pas si ce vaccin peut être utilisé chez l'homme). Les cadavres d'animaux morts de charbon doivent être enfouis sous chaux vive ou, mieux, incinérés.

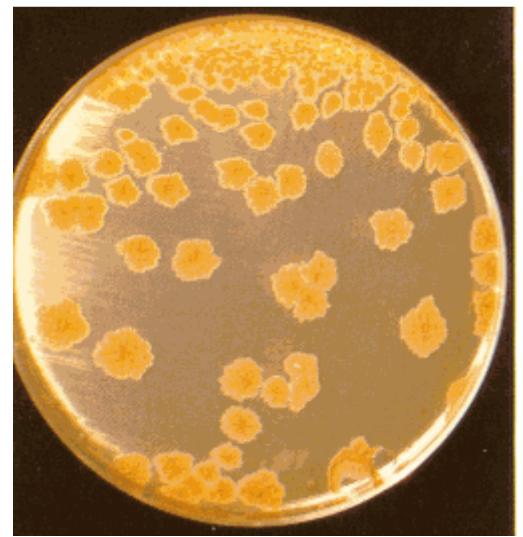
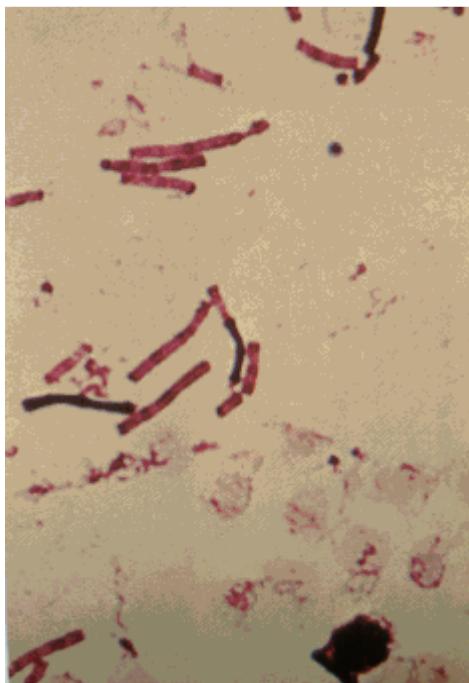
A l'hôpital, les seules mesures préconisées sont les précautions standards (il n'y a pas de transmission interhumaine du charbon). En cas de décès, il est recommandé d'interdire les soins de conservation et de procéder à une mise en bière immédiate.

Un vaccin humain inactivé est disponible aux USA : il nécessite 6 injections, la protection n'étant obtenue qu'après les 3 premières injections (faites à 0, 2 et 4 semaines). Il est produit en petites quantités et reste limité aux militaires (pour lesquels il est obligatoire).



Bacillus anthracis : maladie charbonneuse

Bacillus anthracis : maladie charbonneuse



Bacillus anthracis : Gram +

Bacillus anthracis : culture

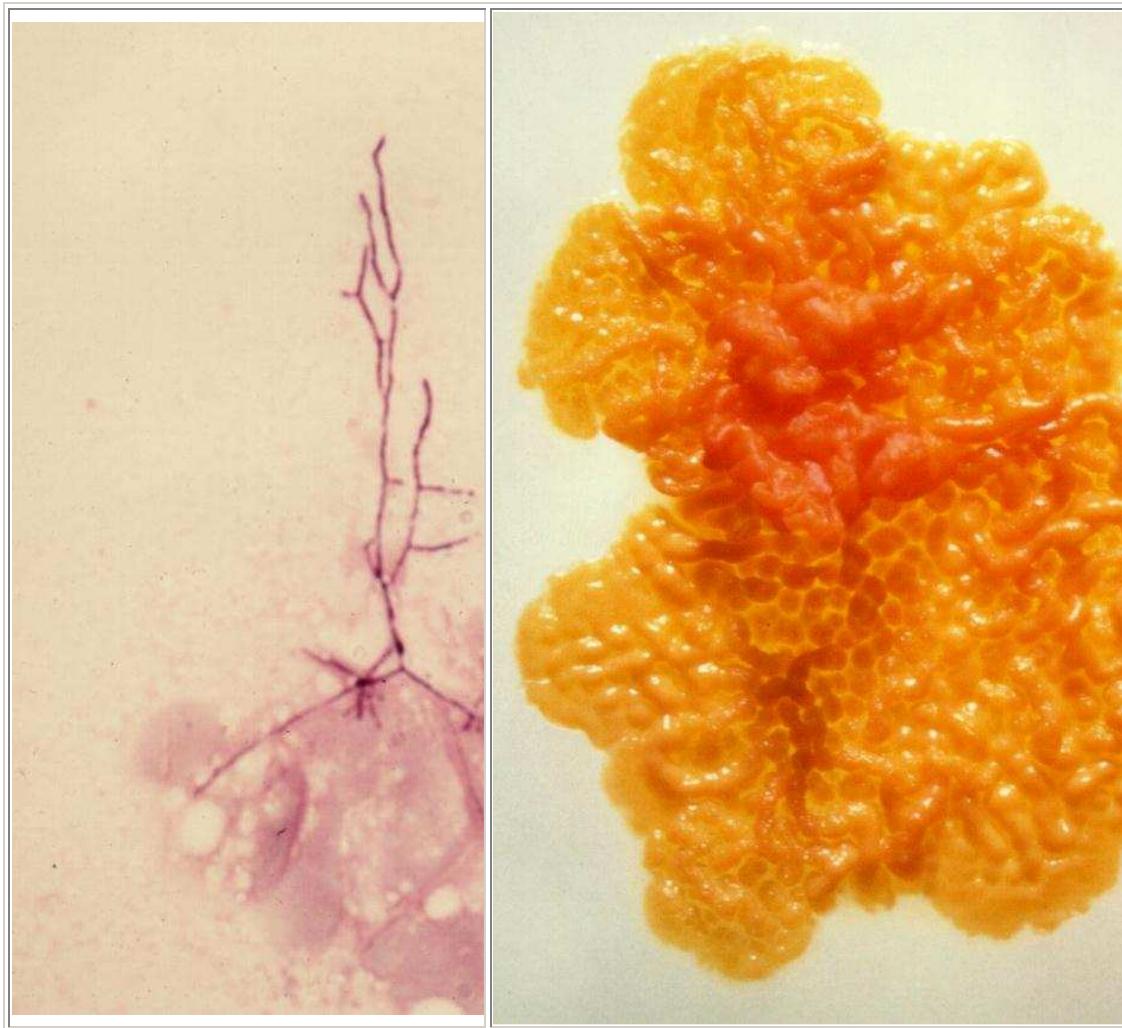
LACTOBACILLUS

Les *Lactobacillus* sont des bacilles à Gram positif habituellement fins et allongés mais pouvant se présenter sous des formes variées. Ils ne forment pas de spores et la plupart sont immobiles. Leur sensibilité à l'oxygène est variable et ils ne possèdent pas de catalase. En culture, ils se développent lentement et la présence de divers facteurs de croissance leur est nécessaire.

On les trouve dans les produits laitiers et ils sont largement utilisés pour leur pouvoir fermentaire dans l'industrie agro-alimentaire. Certains font partie de la flore normale de la bouche, de l'intestin ou du vagin (bacille de Doderlein). Rarement pathogènes, ils ont été mis en cause dans des endocardites et des suppurations buccales ou pulmonaires.

NOCARDIA

Les *Nocardia* sont des bactéries filamenteuses et ramifiées. Partiellement alcoolo-acido résistantes, elles peuvent être colorées par la technique de Ziehl à condition de ne pas trop insister sur le temps de décoloration. Elles cultivent lentement sur gélose au sang, sur milieux de Sabouraud ou de Loewenstein. L'espèce-type est *Nocardia asteroides*. On en trouve dans la nature, dans les sols et les eaux et elles peuvent être responsables de suppurations pulmonaires (nocardioses) ou cutanées (mycétomes).



GARDNERELLA VAGINALIS

Gardnerella vaginalis est un petit bacille à Gram positif facilement décolorable. Hôte normal de la flore vaginale, il peut occasionner des infections locales se manifestant par d'abondantes leucorrhées (vaginites).

L'examen microscopique des sécrétions suffit pour le diagnostic car la culture est très difficile. Il montre l'absence de polynucléaires, la disparition de la flore normale de Doderlein, la présence d'amas caractéristiques de *Gardnerella* recouvrant les cellules épithéliale (les "clue cells"). Dans cette flore pathologique, des *Mobiluncus* et des anaérobies stricts sont souvent associés aux *Gardnerella*.

On traite ces infections par le **métronidazole**.

MOBILUNCUS

Les *Mobiluncus* sont des bacilles **anaérobies stricts**, mobiles, incurvés, paraissant souvent négatifs à la coloration de Gram bien que leur paroi ait la structure des

bactéries à Gram positif.

Ils sont responsables de vaginites, souvent en association à d'autres anaérobies et à *Gardnerella*.

Le **métronidazole** est parfois sans effet mais **ampicilline ou érythromycine** sont efficaces.

AEROMONAS et PLESIOMONAS

Après avoir longtemps été reliés à la famille des Vibrionaceae du fait de leurs caractères phénotypiques, les genres *Aeromonas* et *Plesiomonas* sont actuellement classés respectivement dans la famille des *Aeromonadaceae* et des *Enterobacteriaceae* sur la foi d'études génotypiques. Compte-tenu de leurs particularités phénotypiques (bacilles à Gram négatif fermentatifs oxydase +), ils font l'objet d'un chapitre à part.

AEROMONAS

HABITAT

Eaux stagnantes, eaux douces, eaux de mer recevant un apport d'eau douce, eaux d'égouts.

Sol, aliments contaminés : huîtres, moules, coquillages, viandes (boeuf, porc, poulet), légumes.

POUVOIR PATHOGENE

Surtout chez les amphibiens, reptiles et poissons.

Chez l'homme :

- .pathogènes opportunistes infectant les plaies souillées par de l'eau contaminée ou de la terre.
- .diarrhées aiguës en été et automne (contacts hydriques) chez les enfants
- .septicémies chez les immunodéprimés ou chez les sujets présentant des atteintes de l'appareil digestif (contamination endogène)
- .cellulite ou ecthyma gangréneux à la suite d'une blessure lors d'une baignade.

FACTEURS DE PATHOGENICITE

Production d'endotoxine, d'entérotoxines, d'hémolysines, de cytotoxines et de protéases.

Capacité d'adhérer aux cellules.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Aeromonas est surtout retrouvé dans les pus de surinfection de plaies, les hémocultures et les selles mais peut être éventuellement recherché dans d'autres produits pathologiques..

.L'examen microscopique montre à l'état frais des bacilles mobiles, après coloration des bacilles Gram négatif courts, trapus et isolés, sans capsule ni spore.

.La culture est facile : les souches rencontrées en clinique se développent sur les milieux d'isolement habituels, à 30°C comme à 37°C. Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, bombées, lisses, régulières, opaques, d'aspect similaire à celui des entérobactéries. Sur bouillon nutritif, la culture est abondante en 24 heures et le trouble homogène.

.Les colonies suspectes sont testées pour leur capacité à élaborer une oxydase (+ pour *Aeromonas*, - pour les entérobactéries).

.L'étude des autres caractères biochimiques (esculine, gaz en glucose, VP, ...) permet ensuite d'identifier l'une des trois principales espèces d'*Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*).

ANTIBIOGRAMME

.La résistance à la pénicilline est de règle et un plasmide de résistance à 8 antibiotiques (ampicilline, kanamycine, streptomycine, spectinomycine, sulfisoxazole, ticarcilline,

tobramycine, triméthoprime) a été mis en évidence.

.Les souches sont cependant en général sensibles aux aminosides, au chloramphénicol, à la tétracycline, à l'acide nalidixique, au sulfaméthoxazole-triméthoprime, à la rifampicine et aux C3G.

PLESIOMONAS

HABITAT

P. shigelloides, l'unique espèce du genre, se rencontre dans les eaux douces, d'où on l'isole cependant moins souvent qu'*Aeromonas*. Elle est présente dans l'intestin de nombreux poissons, batraciens et autres animaux à sang froid ainsi que dans celui d'animaux sauvages et domestiques (singe, chien, chat, chèvre, bovin, porc, mouton, volailles, vautours. Bien que cette bactérie ne semble pas pouvoir survivre plus de 24 heures dans l'eau salée, on la rencontre chez les animaux marins (poissons, crustacés, coquillages et surtout huitres).

POUVOIR PATHOGENE

La pathogénicité de *P. shigelloides* se manifeste sous 3 aspects principaux :

- gastro-entérites
- septicémies
- méningites

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

.On peut retrouver *P. shigelloides* dans les selles, les hémocultures, le liquide céphalo-rachidien, exceptionnellement dans d'autres types de prélèvements.

.L'examen microscopique direct montre des bacilles mobiles et, après coloration, des bacilles Gram négatif, rectilignes, aux extrémités arrondies, sans capsule ni spore.

.La culture est facile à 30°C comme à 37°C sur les milieux nutritifs habituels.

.Les colonies suspectes sont testées pour leur capacité à élaborer une oxydase et, en cas de positivité, les tests biochimiques sont poursuivis pour affirmer le diagnostic (bactérie AAf, fermentant le glucose sans gaz, possédant une arginine dihydrolase, une lysine décarboxylase et une ornithine décarboxylase, fermentant l'inositol, indole +...)

.Sérotypage : théoriquement possible (50 antigènes O et 17 antigènes H déterminent 107 sérovars)

ANTIBIOTIQUE

.Résistance habituelle à la pénicilline G, à l'ampicilline et à la carbénicilline (production d'une beta-lactamase) et à l'érythromycine.

.Sensibilité habituelle au chloramphénicol, aux tétracyclines, au sulfaméthoxazole-

triméthoprime, aux nitrofuranes, à l'acide nalidixique, aux nouvelles quinolones, aux polymyxines, à la céfalotine, aux C2G et C3G, à l'imipenem et à l'aztreonam.

.L'activité des aminosides est irrégulière.

AEROMONAS et PLESIOMONAS

Après avoir longtemps été reliés à la famille des *Vibrionaceae* du fait de leurs caractères phénotypiques, les genres *Aeromonas* et *Plesiomonas* sont actuellement classés respectivement dans la famille des *Aeromonadaceae* et des *Enterobacteriaceae* sur la foi d'études génotypiques. Compte-tenu de leurs particularités phénotypiques (bacilles à Gram négatif fermentatifs oxydase +), ils font l'objet d'un chapitre à part.

AEROMONAS

HABITAT

.Eaux stagnantes, eaux douces, eaux de mer recevant un apport d'eau douce, eaux d'égouts.

.Sol, aliments contaminés : huîtres, moules, coquillages, viandes (boeuf, porc, poulet), légumes.

POUVOIR PATHOGENE

Surtout chez les amphibiens, reptiles et poissons.

Chez l'homme :

.pathogènes opportunistes infectant les plaies souillées par de l'eau contaminée ou de la terre.

.diarrhées aiguës en été et automne (contacts hydriques) chez les enfants

.septicémies chez les immunodéprimés ou chez les sujets présentant des atteintes de l'appareil digestif (contamination endogène)

.cellulite ou ecthyma gangréneux à la suite d'une blessure lors d'une baignade.

FACTEURS DE PATHOGENICITE

Production d'endotoxine, d'entérotoxines, d'hémolysines, de cytotoxines et de protéases.

Capacité d'adhérer aux cellules.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Aeromonas est surtout retrouvé dans les pus de surinfection de plaies, les hémocultures et les selles mais peut être éventuellement recherché dans d'autres produits pathologiques..

.L'examen microscopique montre à l'état frais des bacilles mobiles, après coloration des bacilles Gram négatif courts, trapus et isolés, sans capsule ni spore.

.La culture est facile : les souches rencontrées en clinique se développent sur les milieux d'isolement habituels, à 30°C comme à 37°C. Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, bombées, lisses, régulières, opaques, d'aspect similaire à celui des entérobactéries. Sur bouillon nutritif, la culture est abondante en 24 heures et le trouble homogène.

.Les colonies suspectes sont testées pour leur capacité à élaborer une oxydase (+ pour *Aeromonas*, - pour les entérobactéries).

.L'étude des autres caractères biochimiques (esculine, gaz en glucose, VP, ...) permet ensuite d'identifier l'une des trois principales espèces d'*Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*).

ANTIBIOGRAMME

.La résistance à la pénicilline est de règle et un plasmide de résistance à 8 antibiotiques (ampicilline, kanamycine, streptomycine, spectinomycine, sulfisoxazole, ticarcilline, tobramycine, triméthoprime) a été mis en évidence.

.Les souches sont cependant en général sensibles aux aminosides, au chloramphénicol, à la tétracycline, à l'acide nalidixique, au sulfaméthoxazole-triméthoprime, à la rifampicine et aux C3G.

CAMPYLOBACTER

CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

Les bacilles du genre *Campylobacter* sont microaérophiles et Gram -. Leur forme en bâtonnets incurvés en virgule ou en S ainsi que leur mobilité grâce à un cil polaire les avaient fait classer dans le genre *Vibrio*.

Trois espèces de *Campylobacter* ont un pouvoir pathogène pour l'homme : *C. fetus*, *C. jejuni/coli* et *C. pylori* (voir plus loin).

La culture des *Campylobacter* au laboratoire est délicate. Pour les isoler d'une flore polymicrobienne (selles), il faut utiliser des milieux sélectifs contenant de nombreux antibiotiques et les incuber dans l'atmosphère pauvre en oxygène qui convient à ces germes microaérophiles.

HABITAT

L'origine des infections à *Campylobacter* n'est pas bien connue. Certains animaux (chiens, volailles,...) seraient responsables de la contamination. Dans d'autres cas, le lait et l'eau ont été incriminés. Il existe chez l'homme des porteurs sains.

POUVOIR PATHOGENE

Campylobacter jejuni/coli a un pouvoir entéropathogène important. Il est responsable d'entérites avec une fréquence au moins égale à celle des *Salmonella*. Tous les âges sont concernés, mais la maladie est plus fréquente chez les enfants vivant dans des conditions d'hygiène défectiveuse. La maladie est rarement grave et guérit spontanément en quelques jours.

Les formes septicémiques de campylobactériose sont dues à *Campylobacter fetus*. Elles touchent surtout des sujets affaiblis ou des terrains particuliers : cirrhotiques, diabétiques, cardiaques, femmes enceintes...

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

L'ERYTHROMYCINE est l'antibiotique de choix pour traiter les campylobactérioses digestives. Les *Campylobacter* disparaissent des selles en quelques jours (contre quelques semaines pour les sujets non traités).

Parmi les autres antibiotiques, les **TETRACYCLINES**, les **AMINOSIDES**, le **CHLORAMPHENICOL** et l'**AMPICILLINE** ont souvent une bonne activité.

HELICOBACTER PYLORI

CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

Il se distingue des autres *Campylobacter* par trois particularités morphologiques : sa taille est plus grande (3 à 5 µm x 0,5 µm), sa ciliature peut être lophotrichie et sa forme est en corne de boeuf ou en U.

Comme pour les autres *Campylobacter*, sa croissance se fait en microaérophilie. En atmosphère humide et à 37°C, des colonies apparaissent en 3-4 jours sur les milieux solides suivants : gélose chocolat, TSA, Mueller-Hinton et Brucella-Agar. La croissance est

difficile ou nulle à 30°C, 40°C et en bouillon. Il possède une **uréase** très active, qui peut être mise en évidence à partir des produits pathologiques (biopsie de la muqueuse gastrique). La présence de la bactérie dans l'estomac peut également être recherchée par une méthode non invasive, un test respiratoire à l'urée marquée. Ce test, acheté en pharmacie par le patient (*Helicobacter test Infai*, Laboratoires Janssen-Cilag, AMM 1998), est effectué dans un laboratoire d'analyses médicales selon le protocole suivant : insufflation à jeun d'air dans un tube, puis ingestion d'une briquette de jus d'orange (qui retarde la vidange gastrique) et de 75 mg d'urée marquée au 13C (isotope stable non radioactif) puis insufflation après 30 mn dans un autre tube. Une différence élevée du taux de 13CO₂ entre les 2 tubes, mesuré par spectrométrie de masse, signe la présence d'*Helicobacter pylori* car ce germe transforme, grâce à son uréase, l'urée en gaz carbonique et en ammoniac. Inoffensif, sensible et spécifique, ce test est actuellement considéré comme le meilleur moyen de suivi après traitement pour contrôler l'éradication du germe.

POUVOIR PATHOGENE

Les mécanismes du pouvoir pathogène de *Helicobacter pylori* sont encore peu connus.

Helicobacter pylori s'est sélectionné une niche écologique, la muqueuse gastrique, où il n'y a pas de concurrence bactérienne. Sa morphologie spiralée et sa grande mobilité lui donnent un avantage dans l'environnement visqueux du mucus digestif.

Helicobacter pylori est mis en cause dans la genèse des gastrites, des ulcères et du cancer de l'estomac.

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Helicobacter pylori est sensible à la **PENICILLINE**, l'**AMPICILLINE**, la **GENTAMYCINE**.

Il est peu sensible au **METRONIDAZOLE** et résistant à l'**ACIDE NALIDIXIQUE** et au **COTRIMOXAZOLE**.

Le traitement actuellement préconisé en France pour éradiquer *Helicobacter pylori* est une trithérapie associant l'amoxicilline (2 x 1000 mg/j) et la clarythromycine (2 x 500 mg/j) à un inhibiteur de la pompe à protons (oméprazole 2 x 20 mg/j) pendant 14 jours.

PSEUDOMONAS

Le genre ***Pseudomonas*** de la famille des *Pseudomonaceae* comprend une soixantaine d'espèces pouvant répondre à la définition suivante :

- bacilles à Gram négatif
- aérobies stricts
- capables de se multiplier sur milieux usuels
- mobiles par ciliature polaire (sauf *Pseudomonas mallei*)
- possédant une oxydase
- incapables de fermenter le glucose
- pouvant produire des pigments

HABITAT

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces et marines. De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souches psychrophiles) contaminent les denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur.

On peut occasionnellement les isoler de la flore intestinale de l'homme ou de l'animal mais leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier. Ils se comportent comme des **pathogènes opportunistes** souvent à l'origine d'**infections nosocomiales**.

TAXONOMIE (Stanier, Palleroni, De Vos, De Tey)

Les espèces sont reconnues selon différents critères :

- les caractères biochimiques
- les possibilités d'assimilation de substrats carbonés (auxanogramme)
- les besoins en facteurs de croissance
- l'analyse des profils de restriction des gènes ARNr (ARN ribosomal) permettant un classement en 5 groupes (I à IV) et en non groupables.

PRINCIPALES ESPECES

- *Pseudomonas aeruginosa* (espèce type)
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas stutzeri*
- *Pseudomonas mendocina*
- *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
- *Pseudomonas cepacia*
- *Pseudomonas pseudomallei*
- *Pseudomonas mallei*
- *Pseudomonas pickettii*
- *Pseudomonas solanacearum*
- *Comamonas acidovorans*
- *Comamonas testosteroni*
- *Pseudomonas diminuta*
- *Pseudomonas vesicularis*
- *Pseudomonas paucimobilis*
- *Pseudomonas fragi*
- *Pseudomonas mesophilica*

Pseudomonas nautica

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa (Ps.a) ou bacille pyocyanique (bacille du "pus bleu") est de loin, dans le genre Pseudomonas, l'espèce la plus fréquemment isolée en bactériologie médicale. Commensal du tube digestif mais peu abondant chez le sujet sain, il occasionne de nombreuses infections chez les sujets fragilisés. Il est à l'origine de 10% des infections nosocomiales.

CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

Morphologie

Ps.a est un bacille à Gram négatif, non sporulé, très mobile grâce à un cil polaire.

La membrane externe contient des porines dont le nombre et la taille, susceptibles de varier, conditionnent la perméabilité aux antibiotiques. La structure du LPS (lipopolysaccharide) de cette membrane est également très hétérogène.

Culture

La culture est facile sur milieux ordinaires. Elle se fait strictement en aérobiose. La température optimale de croissance est 30°C mais les souches d'origine humaine, réputées pathogènes, supportent des températures plus élevées et se développent jusqu'à 41°C, contrairement aux souches de l'environnement. Une odeur caractéristique de fleur de seringa s'exhale des cultures.

Un milieu sélectif contenant un dérivé d'ammonium quaternaire : le cétrimide ou CétavlonR (bromure de N-cetyl-N-N-N trimethylammonium) et de l'acide nalidixique permet l'isolement de Ps.a de prélèvements plurimicrobiens.

Pigments

Ps.a produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture : la pyocyanine, bleu vert, soluble dans le chloroforme et la pyoverdine, jaune vert, fluorescent et soluble dans l'eau. Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir ou rouge) mais surtout 10% de souches sont non pigmentées. La production de pigments est favorisée sur les milieux de King "A" pour la pyocyanine et "B" pour la pyoverdine.

Caractères biochimiques

Ps.a n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Les milieux MEVAG (Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) ou de Hugh et Leifson sont spécialement destinés à mettre cette propriété en évidence.

Comme la plupart des Pseudomonas, Ps.a possède une oxydase.

D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce :

Indole -, urée -, TDA - (tryptophane-désaminase), H₂S -, gélatine +

ONPG - (orthonitrophényl-galactose)

Nitrate-réductase +

LDC - (Lysine-décarboxylase), ODC - (Ornithine-décarboxylase), ADH + (Arginine-deshydrogénase).

Ps.a est capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie : glucose, acide lactique, acide acétique, arginine, mannitol, citrate, malonate ... La réalisation d'un test d'assimilation des substrats carbonés ou auxanogramme est utile pour reconnaître l'espèce et différencier les biotypes..

Génétique

Ps.a possède de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction et la plupart des souches sont multilysogènes ; ceci explique les nombreuses variations génétiques qu'on observe dans l'espèce avec pour conséquence, en particulier, la fréquence des souches polyrésistantes aux antibiotiques.

Facteurs de virulence : Enzymes, Toxines

Ps.a produit de nombreuses substances diffusibles dont la plupart ont des effets toxiques.

- *l'exotoxine A, composé protéique le plus毒ique, produit en quantité très variable selon les souches. Elle présente des similitudes de structure et de mode d'action avec la toxine diphtérique mais ne peut être transformée en anatoxine*
- *l'exotoxine S, moins毒ique, surtout présente dans les souches responsables de pneumopathie*
- *des protéases (protéase, élastase, collagénase) d'assez faible toxicité mais occasionnant néanmoins des dégâts tissulaires*
- *des hémolysines, glycolipide et phospholipase C agissant en synergie*
- *une cytotoxine, de structure protéique, altérant les leucocytes*

Toxines, enzymes, endotoxine du LPS, pili mais aussi sidérophores et slime constituent des facteurs de virulence.

Marqueurs épidémiologiques

Quand plusieurs infections dues à une même espèce bactérienne surviennent dans

*un service hospitalier, il faut vérifier s'il s'agit d'une épidémie ; dans ce cas la même souche est à l'origine de toutes les infections et toutes les bactéries isolées possèdent les mêmes caractéristiques. Certains éléments phénotypiques, suffisamment discriminants, peuvent, dans ce but, être utilisés comme "marqueurs épidémiologiques". En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa*, ces marqueurs sont nombreux.*

- *sérotypie :*

*Il existe chez *Ps.a* un antigène somatique O thermostable dont on connaît actuellement 20 variants. Ces antigènes sont la base d'une classification sérologique (Habs). On ne dispose, en pratique courante, que de 16 antisérums spécifiques anti O:1 à O:16. Ces sérum sont également présentés sous forme de pool contenant chacun 4 antisérums et désignés A, C, E, F.*

Il existe des souches non sérotypables parce qu'elles sont de type R, muqueuses, non agglutinables ou poly- agglutinables.

Les sérotypes O:6 et O:11 sont les plus fréquemment isolés en bactériologie médicale. Le sérotype O:12 est souvent très résistant aux antibiotiques.

- *lysotypie :*

**Ps.a* est très facilement lysé par des bactériophages et la sensibilité des souches à l'effet lytique d'une batterie de ces phages permet de distinguer des lysotypes.*

- *bactériocinotypie :*

**Ps.a* produit des bactériocines (pyocine ou aérguinocine) douées d'un effet bactériostatique à l'égard d'autres souches . On peut tester les pyocines produites par la souche étudiée vis à vis de souches de référence ou au contraire tester l'effet des pyocines d'une souche connue sur une souche inconnue.*

- *biotypie.*

Pigmentation, hydrolyse de la gélatine, test ONPG, assimilation de l'arginine sont des caractères qui permettent de distinguer des biotypes au sein de l'espèce.

- *antibiotypie.*

La similitude des résultats de l'antibiogramme est un bon argument pour suspecter l'identité de plusieurs souches isolées.

HABITAT

Ps.a est une bactérie aquaphile. On l'isole des eaux de toutes provenances : eaux de rivière, d'égouts, de piscine, de mer, eau potable, eaux minérales ou thermales, eaux déminéralisées ...

On la trouve également sur les végétaux, légumes, salades, fruits ou fleurs.

Elle peut enfin contaminer le matériel hospitalier, hôtelier (robinetterie), médical (sondes, trocarts, cathéters) ou chirurgical (instruments, matériels de prothèse), les solutions antiseptiques, les solutés injectables, des produits médicamenteux ou cosmétiques.

POUVOIR PATHOGENE

Ps.a a toutes les caractéristiques d'un germe opportuniste : il est peu virulent pour les sujets en bonne santé mais très pathogène pour les sujets immuno-déprimés.

En pratique médicale, on l'isole de prélèvements variés : urines, selles, expectorations, suppurations diverses, lésions cutanées, sang

Infections cutanées

Folliculites, périonyxie, intertrigo, pyodermitie, otites externes, sont des conséquences possibles de bains en eau souillée.

En milieu hospitalier, les surinfections de plaies chirurgicales, traumatiques, ulcéreuses, d'escarres ou les surinfections de lésions de brûlures sont particulièrement redoutables.

Infections iatrogènes

Diverses infections à Ps.a sont secondaires à des soins infirmiers ou à des manœuvres instrumentales : otites moyennes ou externes, méningites chez les porteurs de valves de dérivation du LCR, endocardites après chirurgie cardiaque, ostéoarthrites après injections intraarticulaires ou chirurgie orthopédique, infections urinaires après interventions urologiques ou sur sonde à demeure.

Bronchopneumopathies

Elles sont fréquentes chez les malades atteints de mucoviscidose, cancer, leucémie, pneumopathie chronique, diabète et chez les trachéotomisés.

Infections oculaires

Elles sont particulièrement graves et peuvent évoluer vers la panophthalmie qui donne lieu à une fonte purulente de l'oeil. Elles sont consécutives à des interventions ophtalmologiques ou à l'usage de collyres ou liquides de nettoyage de lentilles de contact souillés par le germe.

Infections digestives

Ce sont des entérites aiguës après usage prolongé d'antibiotiques par voie orale ou après absorption d'eaux contaminées.

EPIDEMIOLOGIE

Le milieu naturel de Ps.a est l'eau, les sols humides et les végétaux. Dans les habitations et à l'hôpital, on peut trouver la bactérie dans tous les réservoirs et conduites d'eau.

Chez l'homme en bonne santé, on trouve assez peu de Pseudomonas (de 2 à 10% de porteurs selon les sites de l'organisme) tandis que chez les hospitalisés ce taux peut atteindre 50% sur certains sites et 60% sur les plaies de brûlures ou d'escarres. Bien entendu, ce sont essentiellement les sujets immuno-déprimés qui auront à pâtir de cette colonisation.

A l'hôpital, Ps.a est un germe dangereux parce qu'il s'y trouve en grande quantité et qu'il y rencontre beaucoup de sujets sensibles. La forte densité de ce germe est due à la pression de sélection exercée par les antibiotiques. Les Pseudomonas sont avec les staphylocoques et les entérobactéries les bactéries les plus souvent responsables d'infections nosocomiales. Les marqueurs épidémiologiques (sérotypes, biotypes, antibiotypes et autres) sont évidemment très utiles pour mener à bien les enquêtes à la recherche d'une source de contamination hospitalière.

La principale source de contamination est la flore endogène des malades eux-mêmes mais l'environnement est également incriminé. L'eau des vases de fleurs, les plantes en pot, les fruits et légumes consommés crus, les eaux des éviers, des siphons, les aérosols à visée thérapeutique ou créés par des manipulations de récipients contenant des liquides, les humidificateurs, les solutions "antiseptiques" sont des sources potentielles.

La transmission d'un malade à un autre est souvent manuportée ou iatrogène, surtout par les cathéters, sondes, canules, masques ou lunettes pour oxygénothérapie.

PATHOGENIE - IMMUNITE

Ps.a est un germe opportuniste responsable de pathologie nosocomiale chez les sujets fragiles surtout (insuffisants rénaux, insuffisants respiratoires, diabétiques, cancéreux, leucémiques, paraplégiques, sujets âgés, opérés, brûlés, porteurs d'escarres, malade des services de réanimation ou de soins intensifs et immunodéprimés...).

Colonisation, invasion, dissémination et diffusion des toxines sont les étapes de la pathogenèse de l'infection.

Adhésines, fimbriae et slime favorisent la colonisation des cellules épithéliales de la peau et des muqueuses facilitée encore par la cytotoxine, facteur leucopéniant, qui s'oppose à la phagocytose.

Protéase, élastase, hémolysine (phospholipase C), exotoxine A altèrent les tissus et

détruisent le complément, les immunoglobulines et la fibronectine (protéine qui protège normalement les cellules épithéliales de l'adhérence bactérienne). Dans le poumon, la phospholipase C détruit le surfactant (substance de revêtement endoalvéolaire qui facilite la réplétion gazeuse et s'oppose à la transsudation des fluides capillaires). Toutes ces actions conduisent à une nécrose tissulaire et facilitent l'invasion de l'organisme par la bactérie.

Lors de la phase de dissémination, l'exotoxine A et l'endotoxine du LPS sont responsables de la survenue d'un état de choc parfois très grave.

Les sujets sains se défendent bien contre une colonisation faible grâce aux moyens l'immunité non spécifique (phagocytose et complément) mais ils peuvent être accidentellement infectés par inoculation ou ingestion massive. Si la souche est virulente, à forte capacité d'adhérence aux cellules de la peau et des muqueuses, les moyens de défense naturels sont débordés, l'infection se développe et se généralise avant qu'une immunité spécifique (anticorps opsonisants et antitoxines) puisse s'installer.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

- culture

Ps.a se développe facilement sur milieux ordinaires en aérobiose stricte. La culture est possible à 41°C. Il est mobile grâce à un cil polaire. Pour les prélèvements plurimicrobiens ou surtout pour les isolements à partir des liquides en hygiène hospitalière ou pour le contrôle des eaux, il est bon d'utiliser le milieu sélectif au cétrimide.

Sur les milieux électifs pour entérobactéries, il forme des colonies "lactose -". Le milieu de Kligler en particulier apparaît rouge en surface (lactose -) et inchangé en profondeur (pas de culture en anaérobiose et pas de production d'H₂S). En surface, la culture présente des reflets métalliques assez évocateurs.

La production de pigment (pyocyanine et pyoverdine) facilite grandement le diagnostic. La production de pyocyanine suffit même à identifier l'espèce mais rappelons que 5 à 10% de *Ps.a* sont non pigmentés et 1% produisent un pigment rouge ou noir.

L'odeur de seringa des cultures est également caractéristique.

- caractères biochimiques

La production d'oxydase est un caractère d'orientation important. Les autres caractères biochimiques, signalés page 3 apportent une confirmation au diagnostic. Au besoin, l'auxanogramme permet de différencier l'espèce dans le genre.

Aérobiose stricte, mobilité, pigment vert, oxydase +
et non fermentation de sucres sont des éléments
d'identification importants

- **sérotypage**

Le sérotypage des souches par les antisérum O:1 à O:16 doit être entrepris mais 5 à 10% des souches ne sont pas typables par cette technique.

- **sérodiagnostic**

Il n'a guère d'intérêt dans les infections aiguës car l'isolement de la souche est facile mais peut être intéressant pour différencier une infection chronique d'une colonisation occasionnelle, en particulier pour les malades atteints de mucoviscidose. On cherche les anticorps par électrosynthèse, par technique ELISA ou par western-blot en présence d'une "soupe" antigénique, constituée d'un ultrasonat d'un mélange de cultures de plusieurs sérotypes.

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Ps.a est réputé pour sa résistance aux antibiotiques qui pose de sérieux problèmes thérapeutiques et favorise sa dissémination en milieu hospitalier. La résistance naturelle du bacille pyocyanique relève d'une mauvaise perméabilité de la membrane externe et de la production constante d'une bétalactamase inductible.

Constantement inactifs	Très souvent inactifs	Actif <i>in vitro</i> mais inactif <i>in vivo</i>	Parfois actifs <i>in vitro</i> mais décevants <i>in vivo</i>	phéno
Aminopénicillines C1G et C2G Kanamycine	Tétracyclines Chloramphénicol Acide nalidixique Nitrofuranes Cotrimoxazole	Colistine	Aminosides en monothérapie Carbénicilline	Ti Acyluréido pip C3G "antipyocy: cefsulodi C Carbapén Mc Ai Quinolones flu Fo:

Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe (modification des porines) ou à la production d'enzymes inactivantes. Ces deux mécanismes peuvent coexister et conjuguer ainsi leurs effets.

- résistance acquise aux bétalactamines

Elles sont fréquentes par production de pénicillinase inactivant la ticarcilline, les acyluréidopénicillines, la cefsulodine et le céfopérazone ou par dérépression de la céphalosporinase naturelle, ce qui inactive toutes les bétalactamines sauf l'imipénem ou encore par imperméabilité, soit sélective pour l'imipénem soit étendue à d'autres bétalactamines

. résistance acquise aux aminosides

L'amikacine (A) est la plus active (95% des souches) suivie de la netilmicine (N) puis de la tobramycine (T) et de la gentamicine (G). Les phénotypes de résistance possibles sont G, GT, GTN, GTNA et rarement TNA.

Pratiquement, on peut presque prendre pour vrai (98% des cas) que toute souche sensible à la gentamicine est sensible à tous les aminosides (sauf la kanamycine) et que toute souche résistante à l'amikacine est résistante à tous les aminosides.

. résistance acquise aux quinolones

C'est la ciprofloxacine qui est la plus efficace. Une résistance par mutation de la cible (ADN gyrase) ou par imperméabilité se manifeste dans 15% des cas.

. résistance acquise à la fosfomycine

La fosfomycine est un bon antibiotique antipyocyanique de deuxième intention. Les résistances sont dues à une diminution de la perméabilité. Il ne faut jamais l'utiliser seul pour éviter l'émergence rapide de mutants résistants.

PRINCIPES DE TRAITEMENT - PREVENTION

Une infection à Ps.a ne doit jamais être traitée en monothérapie. On recommande d'associer en première intention l'amikacine à un antipyocyanique majeur (ceftazidime, céfémipe, imipénem, aztréonam, ciprofloxacine ou fosfomycine) et de n'utiliser d'autres molécules que si l'antibiogramme confirme leur activité : ticarcilline (associée à un inhibiteur de bétalactamase si la souche est productrice de pénicillinase), acyluréidopénicilline, cefsulodine ou céfopérazone.

Une sérothérapie utilisant des IgG hyperimmunes ou des anticorps monoclonaux a été proposée (Pennington, 1990) de même qu'une vaccination antipyocyanique parfois couplée à une vaccination antistaphylococcique pour tenter de prévenir les redoutables surinfections et septicémies chez les grands brûlés ou les malades soumis à des traitements immunsupresseurs. Les vaccins, cellulaires ou acellulaires, utilisent le LPS et l'antigène O qui sont immunogènes. Ils ne sont plus utilisés.

Le P.s.a étant l'un des premiers responsables d'infections nosocomiales en France,

une prévention indispensable s'impose en outre pour tous les services hospitaliers et comprend des mesures d'hygiène générale et individuelle, la désinfection des locaux, l'isolement de malades fragiles et une asepsie rigoureuse dans la pratique des soins.

AUTRES PSEUDOMONAS

Un bacille à Gram négatif qui se développe facilement sur milieux usuels, aérobiose strict, mobile et incapable de fermenter les sucres peut appartenir au genre *Pseudomonas*. La production, presque constante, d'oxydase, l'odeur caractéristique des cultures et la présence de pigments sont aussi des critères d'orientation très probants.

Les résultats des tests biochimiques et de l'auxanogramme qui étudie l'assimilation de divers substrats comme source de carbone et d'énergie précisent le diagnostic d'espèce. Des galeries miniaturisées, parfois automatisables, facilitent grandement la démarche diagnostique au laboratoire.

HABITAT ET POUVOIR PATHOGENE

Les différentes espèces du genre *Pseudomonas* sont des saprophytes des eaux et des sols. On les rencontre dans l'environnement hospitalier à des fréquences variables selon les lieux. Chez les malades, ils se comportent comme des contaminants ou des pathogènes opportunistes quand ils sont introduits en grande quantité dans l'organisme et ceci d'autant plus facilement que les défenses de l'hôte sont diminuées. Ils sont souvent en cause dans de petites épidémies d'infections nosocomiales localisées à un service ou à un hôpital.

Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Pseudomonas fluorescens*, *putida*, *cepacia*, *Xanthomonas maltophilia* et à un moindre degré, *Pseudomonas stutzeri*, *pseudoalcaligenes* et *acidovorans*.

Certaines espèces ont un pouvoir pathogène ou des caractères particuliers (voir ci-dessous).

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Pseudomonas* sont réputés assez résistants aux antibiotiques avec toutefois de grandes disparités selon les espèces.

- Sont assez sensibles : *Ps. stutzeri*, *pseudoalcaligenes*, *testostroni*, *diminuta*, *vesicularis*,
- Sont polyrésistants : *Ps. fluorescens*, *putida*, *cepacia*, *pickettii*, *acidovorans*, *diminuta*.

L'antibiotype constitue une aide au diagnostic d'espèce.

PSEUDOMONAS MALLEI

C'est le bacille de la **morve**. La morve est une maladie, devenue très rare, qui atteint les solipèdes (cheval, âne, mulet) et accidentellement l'homme par contact direct avec les animaux. Elle se manifeste par des lésions cutanées et muqueuses (muqueuse pituitaire surtout) sous forme d'abcès. Chez l'homme, on observe des formes septicémiques, parfois foudroyantes et des formes respiratoires avec abcès.

La bactérie est **immobile**, réputée sensible aux antibiotiques et aux sulfamides.. C'est un parasite strict de l'animal et occasionnellement de l'homme qui ne se rencontre pas dans la nature.

PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI

Appelé aussi **bacille de Whitmore**, *Pseudomonas pseudomallei* est responsable de la **mélioïdose** ou pseudomorve.

La maladie frappe de nombreuses espèces animales: chevaux, bovins, ovins, caprins, porcins et petits rongeurs sauvages. Elle peut occasionnellement toucher l'homme. Son expression clinique est très variable : formes foudroyantes septicémiques, formes septicopyohémiques avec bactériémie et localisations viscérales dans les poumons, les reins ou le foie, formes chroniques avec abcès cutanés, osseux, pulmonaires ou hépatiques et même formes inapparentes. Avant 1950, on n'isolait le germe que dans l'Asie du sud-est, sa niche écologique étant l'eau des rizières. Entre les années 1950 et 1970, sans que l'on sache pourquoi, (guerre du Viêt-nam ou meilleures connaissances bactériologiques ?) on l'a trouvé dans les sols humides (zoos, porcheries, écuries, manèges, fumiers, points d'eau et même piscines) de différents continents. En France, une épidémie a éclaté en 1976 chez les animaux du jardin des Plantes à Paris puis en 1978 chez les chevaux d'une écurie en Mayenne. En 1992, 4 souches ont été isolées en France (chez une femme cambodgienne rescapée d'un camp de réfugiés, chez un singe importé frauduleusement de Java, chez un cavalier victime d'une fracture ouverte après une chute de cheval et chez un nouveau-né hospitalisé à l'hôpital Saint Antoine à Lille...). Le germe paraît donc beaucoup plus ubiquitaire qu'on ne le pensait classiquement.

La bactérie est mobile, capsulée, non pigmentée. Les cultures exhalent une forte odeur de truffe. Ses activités métaboliques sont nombreuses. Il possède des antigènes O (LPS) et des antigènes H et de surface permettant un sérodiagnostic. L'inoculation à la souris permet d'évaluer le pouvoir pathogène de la souche.

Les antibiotiques actifs sont les cyclines, le chloramphénicol, les aminosides mais les bétalactamines sont peu efficaces.

STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA

Stenotrophomonas maltophilia, (ex *Xanthomonas maltophilia*) est un bacille à Gram négatif, aérobio strict, à ciliature polaire multitrice ne fermentant pas les sucres mais attaquant par voie oxydative certains d'entre eux et en particulier le maltose. La présence de méthionine dans les milieux de culture est indispensable à sa croissance. Absence d'oxydase, présence de lysine-décarboxylase, liquéfaction de la gélatine et hydrolyse de l'esculine sont les caractères les plus utiles à son identification.

C'est une bactérie ubiquitaire que l'on trouve dans les eaux, les sols et sur les plantes. A l'hôpital, elle peut contaminer les points d'eaux (robinets, siphons), les matériels médicaux ou liquides antiseptiques. Difficile à éradiquer à cause de sa **multirésistance aux antibiotiques** (notamment aux carbapénems), elle est souvent responsable d'infections nosocomiales.

ALTEROMONAS ou SCHEWANELLA

Les bactéries du genre *Alteromonas* sont des bactéries marines qui ne se développent qu'en présence de fortes concentrations salines (bactéries halophiles) ... sauf *Alteromonas putrefaciens* qui est halotolérante : elle supporte mais n'exige pas la présence de NaCl.

De nombreux caractères distinguant l'espèce *putrefaciens* des autres *Alteromonas* et des *Pseudomonas*, on a créé un nouveau genre : *Schewanella* : *Schewanella putrefaciens* est une bactérie ubiquitaire assez sensible aux antibiotiques, présente dans l'environnement et pouvant occasionner, chez l'homme, des abcès, otites, ostéites et bactériémies. Elle est mobile, aérobiose préférentielle, donc capable d'une faible croissance en anaérobiose. En culture, elle répand une forte odeur de pourriture (d'où son nom). Elle est non fermentante, possède une oxydase, une ornithine-décarboxylase (ODC+) mais surtout une thiosulfatase très active (H₂S+) donnant des colonies noires sur milieu de Kligler et pigmentées en rose-saumon sur gélose ordinaire.

Dotée d'un fort pouvoir protéolytique et lipolytique, *Schewanella putrefaciens* est un agent d'altération des denrées alimentaires.

AGROBACTERIUM

Ce sont des bactéries phytotropes, formant des tumeurs chez les plantes (*Agrobacterium tumefaciens*) dont un pathovar dénommé *Agrobacterium radiobacter* peut être isolé chez l'homme.

ALCALIGENES

Le genre *Alcaligenes* comprend de nombreuses espèces saprophytes de l'eau qu'on trouve dans l'environnement et qu'on peut isoler chez l'homme. Ce sont des bactéries aérobies strictes, mobiles par cils péritrices, oxydase +.

■ALCALIGENES FAECALIS

Occupe la même niche écologique que les *Pseudomonas*. Sensible aux antibiotiques, *Alcaligenes* n'a pas de pouvoir pathogène particulier mais est parfois isolée de prélèvements humains à l'hôpital.

■ALCALIGENES DENITRIFICANS *subsp* DENITRIFICANS et XYLOSOXIDANS

Ces espèces sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques, surtout la sous-espèce *xylosoxidans*. Elles sont isolées comme *faecalis* en milieu hospitalier. La sous-espèce *xylosoxidans* est plus souvent responsable d'infections nosocomiales que *faecalis*.

■ ALCALIGENES PIECHAUDII

Cette espèce est rarement isolée.

FLAVOBACTERIUM

Les *Flavobacterium* sont ainsi appelés parce que certaines souches sont pigmentées en jaune pâle. Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, **immobiles**. On les trouve dans l'environnement, dans les eaux, les sols, dans les aliments et dans l'environnement hospitalier. Ils sont non fermentants, attaquent le glucose par voie oxydative et possèdent une oxydase. Ils produisent de l'indole et possèdent des enzymes protéolytiques (gélatinase).

Ils sont généralement très résistants aux antibiotiques mais, paradoxalement, sont sensibles aux macrolides et à la rifampicine.

Flavobacterium breve, pathogène opportuniste, est parfois isolé des urines, des sécrétions vaginales, de suppurations diverses et exceptionnellement d'hémocultures.

Flavobacterium meningosepticum est redoutable car il est responsable de méningites et septicémies gravissimes en néonatalogie.

ACINETOBACTER

Séparé du genre ancien et confus des *Achromobacter* en 1954 (Brisou et Prévot) et défini en 1983 (Bouvet et Grimont), le genre *Acinetobacter* comprend actuellement 12 espèces dont :

- *Acinetobacter calcoaceticus*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Acinetobacter haemolyticus*
- *Acinetobacter junii*
- *Acinetobacter johnsonii*
- *Acinetobacter lwoffii*

Ce sont des bactéries ubiquitaires avec cependant certaines particularités : *baumannii* est l'espèce " hospitalière " type, *calcoaceticus* est souvent isolée des sols, *johnsonii* fait partie de la flore cutanée normale de l'homme.

La morphologie des *Acinetobacter* est très caractéristique, mélangeant diplobacilles principalement, diplocoques et rares formes longues, à Gram négatif (avec parfois quelques difficultés de décoloration), toutes ces formes sont **immobiles**.

La culture est facile sur les milieux courants et sur milieux spéciaux pour entérobactéries. Les caractères biochimiques sont lactose - , nitrate - , oxydase - (ce qui les différencie des *Neisseria* et des *Moraxella* qui ont une morphologie identique), catalase +. Pour l'identification des espèces, on se réfère à différentes propriétés : possibilité de culture à 37, 41 et 44°C (seul *baumannii* se développe à 44°C), oxydation du glucose, hydrolyse de la gélatine et résultat de l'auxanogramme.

Les marqueurs épidémiologiques utiles sont les biotypes, les lysotypes, les sérotypes, les antibiotypes et les profils électrophorétiques des protéines traitées par le dodécylate de sodium.

Acinetobacter baumannii et, à un moindre degré, les autres *Acinetobacter*, sont des bactéries qu'on isole en milieu hospitalier de prélèvements effectués chez des malades des services de réanimation ou de soins intensifs.

C'est la bactérie "médicale" la plus résistante aux antibiotiques.

HAEMOPHILUS

Les *Haemophilus* sont des coccobacilles à Gram négatif, apparaissant souvent polymorphes dans les produits pathologiques, immobiles, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, exigeant pour se multiplier des facteurs de croissance présents dans le sang.

FACTEURS DE CROISSANCE

- **le facteur V**

Le facteur V, thermolabile, est constitué par :

- . soit du **NAD** (nicotinamide adénine dinucléotide) ou **DPN** (diphosphonucléotide) ou **coenzyme I**,
- . soit du **NADP** (NAD-phosphate) ou **TPN** (triphasponucléotide) ou **coenzyme II**,

Ce sont des coenzymes des deshydrogénases qui sont présentes dans les globules rouges, dans les tissus animaux et végétaux et chez la plupart des bactéries

- **le facteur X**

Le facteur X, thermostable, est constitué par l'hémine (ou hématine) qui est un composé tétrapyrrolique contenant du fer, dérivé de l'hémoglobine et des enzymes de la chaîne respiratoire (cytochrome, catalase, peroxydase). En présence de fer, l'hémine peut être remplacée par la protoporphyrine

MILIEUX DE CULTURE

Les milieux convenant pour l'isolement des *Haemophilus* doivent contenir, selon les espèces, soit le facteur X, soit le facteur V soit encore les deux facteurs. La base des milieux est donc constituée d'un bouillon ou d'une gélose ordinaires enrichis par les facteurs de croissance.

Le sang frais ne convient pas car le facteur V, intraglobulaire, ne diffuse pas dans le milieu et surtout parce que le sang contient une NADase.

Le sang chauffé à 75°C, ou " sang cuit " apporte les facteurs X et V : l'hémine est thermostable et la NADase est détruite à cette température. Le chauffage doit cependant être modéré car le NAD ne résiste pas au delà de 100°C.

La **gélose au sang cuit** est aussi appelée **gélose chocolat** ("chocolate agar") à cause de la couleur que lui donne le sang dénaturé.

" **L'extrait Fildes** " est une digestion peptique de sang de mouton contenant les facteurs X et V. Il permet d'obtenir des milieux transparents.

Certaines bactéries (comme *Staphylococcus aureus*) produisent une grande quantité de NAD : la culture des *Haemophilus* exigeant les facteurs X et V est possible sur gélose au sang frais (qui fournit le facteur X) le long d'une strie de culture de *Staphylococcus aureus* (qui fournit le facteur V) : c'est le **phénomène du satellitisme**.

L'extrait de levure contenant du NAD ou du NADP est source de facteur V.

Les concentrations finales en facteurs X et V nécessaires dans les milieux varient, selon les espèces, de 0,5 à 25 mg par millilitre.

On peut utiliser, pour l'isolement, des milieux sélectifs contenant des antibiotiques (bacitracine, vancomycine).

CLASSIFICATION

Le classement des différentes espèces d'*Haemophilus* repose sur les exigences en facteurs de croissance et sur des caractères biochimiques (tableau I).

Tableau I

	Besoin en facteur X	Besoin en facteur V	Oxydase	Catalase	Uréase	In
<i>fluenzae</i>	+	+	+	+	(+)	(+)
<i>hemolyticus</i>	+	+	+	+	(+)	(+)
<i>rainfluenzae</i>	□	+	+	V	(□)	(+)
<i>raphophilus</i>	□	+	+	□	□	(+)

<i>H. segnis</i>	□	+	□	□	□	□
<i>H. aphrophilus</i>	+	□	□	+	□	□
<i>H. haemoglobinophilus</i>	+	□	+	(+)	□	+
<i>H. ducreyi</i>	+	□	□	□	□	□

□ ou ○ : caractère positif ou négatif chez toutes les souches, (+) ou (○) : caractère positif ou négatif chez la majorité des souches, V : caractère variable

HABITAT

Les *Haemophilus* font partie de la flore des muqueuses de l'homme et de nombreux mammifères et oiseaux. On n'en trouve pas dans la nature.

Chez l'homme, quatre écosystèmes les accueillent : le pharynx, la bouche, la plaque dentaire et, à un degré moindre, l'intestin et l'appareil urogénital.

Pouvoir pathogène

Haemophilus influenzae est, de loin, l'espèce du genre la plus souvent impliquée au cours des infections humaines, en particulier chez l'enfant.

Les autres espèces rencontrées chez l'homme (*parainfluenzae*, *haemolyticus*, *paraphrophilus*, *aphrophilus*, *haemoglobinophilus*, *segnis*) sont des commensales opportunistes pouvant occasionner des infections de la sphère oto-rhino-laryngologique et, surtout chez l'immunodéprimé, une septicémie avec métastases infectieuses, ou une endocardite.

Haemophilus ducreyi est l'agent responsable d'une affection vénérienne : le chancre mou.

Haemophilus aegyptius ou bacille de Weeks (variété d'*Haemophilus influenzae* III) est classiquement responsable de conjonctivites.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Aussi appelé **bacille de Pfeiffer**, *Haemophilus influenzae* a été ainsi dénommé car, jusqu'à la mise en évidence du virus grippal en 1933, on l'a cru responsable de la grippe (ou influenza).

BACTÉRIOLOGIE

C'est un coccobacille polymorphe, à Gram négatif, immobile, non sporulé, parfois capsulé, ne se multipliant qu'en présence de facteurs X et V.

Caractères biochimiques

Haemophilus influenzae possède une catalase et une oxydase. Il fermente glucose, maltose, ribose et xylose mais pas le lactose ni le saccharose. Des tests biochimiques permettent de séparer **8 biotypes numérotés de I à VIII**. Le biotype I est le plus fréquemment isolé.

Antigènes

Les souches capsulées possèdent un **antigène polysaccharidique** lié à la capsule dont il existe six variants déterminant **6 sérovars : a, b, c, d, e, f**. Le sérovar b est le plus fréquemment rencontré. Ces polysaccharides capsulaires, dont la structure chimique est connue, peuvent être identifiés par des réactions immunologiques en présence d'anticorps spécifiques.

D'autres structures de surface présentes chez *Haemophilus influenzae* sont antigéniques et peuvent être utiles pour des études épidémiologiques. Ainsi, les pili, porteurs d'adhésines, les oligosaccharides du core central du LPS de la paroi et les protéines de surface déterminent des sous-types au sein des sérovars. A noter qu'il n'existe pas de chaînes latérales osidiques et donc pas de spécificités O chez les *Haemophilus*.

IgA protéases

Haemophilus influenzae produit une enzyme capable de cliver les IgA. On trouve cette enzyme chez d'autres *Haemophilus* et chez d'autres bactéries (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* et *gonorrhoeae*). Sa présence amoindrit les défenses locales des muqueuses infectées.

Facteurs de virulence

Les principaux facteurs de virulence sont, en premier lieu, le polysaccharide capsulaire et ensuite, les pili porteurs d'adhésines et les IgA protéases.

POUVOIR PATHOGÈNE

Haemophilus influenzae est une bactérie pyogène responsable d'infections variées, plus sévères chez l'enfant ou les sujets fragiles. Il convient de distinguer des infections aiguës avec bactériémie occasionnées par des souches invasives, capsulées, (du sérovar b, biotype I le plus souvent) et des infections aiguës ou chroniques, sans bactériémie, provoquées par des souches non capsulées.

- **chez l'enfant**

Les manifestations invasives sont presque toujours dues à des souches capsulées de sérotype b, biotype I.

Les **méningites** à *H. influenzae* sont très souvent précédées d'infections des voies respiratoires supérieures ou oto-rhino-laryngologiques et accompagnées

d'un état septicémique. Elles sont surtout observées chez le nourrisson âgé de 3 à 30 mois.

L'**épiglottite** frappe des enfants plus âgés de 2 à 7 ans. Elle donne lieu à un tableau clinique dramatique, de survenue brutale associant signes généraux de septicémie et graves difficultés respiratoires.

On observe aussi des **états septicémiques** fébriles accompagnés ou non de signes de localisations : arthrite, otite, ostéite, ostéomyélite, cellulite, péricardite, pneumonie, orchi-épididymite...

Les souches non capsulées, réputées non invasives, sont isolées au cours d'infections diverses :

- **otites moyennes aiguës** et autres infections de la sphère oto-rhino-laryngologique,
- **infections broncho-pulmonaires et conjonctivites.**

Une contamination pendant l'accouchement peut être l'origine d'une **infection néonatale généralisée** sévère.

- **chez l'adulte**

Ce sont surtout des souches non capsulées qui sont responsables d'infections chez l'adulte.

Les **manifestations respiratoires** sont les plus fréquentes et donnent lieu à des broncho-pneumonies compliquant une bronchite chronique ou à des pneumonies avec parfois bactériémie.

Les **méningites** à *Haemophilus* sont rares chez l'adulte et surviennent surtout chez les sujets âgés.

Plus rarement encore, on peut observer d'autres localisations, articulaires, osseuses, oto-rhino-laryngologiques, oculaires ou génito-urinaires.

Signalons la possibilité d'**infections puerpérales** où la localisation vaginale de la bactérie peut être la cause d'infections du nouveau-né.

ÉPIDÉMIOLOGIE - IMMUNITÉ - PHYSIOPATHOLOGIE

Haemophilus influenzae était la cause la plus fréquente de méningite chez l'enfant entre 3 et 36 mois avant qu'on dispose du vaccin mais elle est maintenant de plus en plus rare. Il vient au deuxième rang, après *Streptococcus pneumoniae*, dans l'étiologie des otites moyennes aiguës.

C'est un hôte exclusif de l'espèce humaine, la transmission est donc interhumaine. Les enfants sont presque obligatoirement contaminés après l'âge de 2 mois car le portage est très fréquent dans la population. Ce sont surtout des souches capsulées que l'on isole chez les nourrissons qui sont démunis d'anticorps anticapsulaires tandis que les

adultes et grands enfants ont des anticorps et sont porteurs de souches commensales non capsulées.

L'organisme ne peut pas empêcher le commensalisme des *Haemophilus* mais s'oppose à la généralisation de l'infection grâce à ces anticorps anticapsulaires à effet opsonisant et au système du complément. Les IgA sécrétaires protègent plus spécialement les muqueuses.

Les infections à *Haemophilus influenzae* commencent par une colonisation de la muqueuse pharyngée ou des voies respiratoires supérieures souvent favorisée par une infection virale intercurrente. Survient alors une extension locale avec réaction inflammatoire. Si les défenses sont efficaces et la souche peu virulente, l'infection reste localisée, sinon les ganglions lymphatiques sont envahis, entraînant une propagation bactériémique et systémique.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

L'examen direct du produit pathologique est souvent évocateur grâce à la morphologie particulière du germe.

La mise en culture doit être rapide car le germe est fragile et beaucoup d'échecs sont dus à de mauvaises conditions de prélèvement. On doitensemcer sur **gélose au sang cuit ou gélose chocolat**, parfois sur milieux d'isolement contenant des antibiotiques. On incube ensuite à 36°C. Les colonies, obtenues après 24 heures, sont petites, blanc grisâtres et luisantes si la souche est capsulée.

L'identification repose sur la morphologie et sur les exigences en facteur X et V qu'on met en évidence par exemple par le test du satellitisme ou par culture en présence de NAD et d'hémine. On emploie souvent des disques de papier-buvard imprégnés de substance X ou V ou X+V. *Haemophilus influenzae* ne se développe qu'autour du disque X+V.

L'étude des caractères biochimiques (uréase, ornithine décarboxylase et production d'indole) permet de reconnaître le biotype et des réactions d'agglutination sur lame en présence de sérum spécifiques permettent de reconnaître le sérotype si la souche est capsulée.

Un diagnostic rapide peut être obtenu grâce à la mise en évidence d'antigènes solubles dans les humeurs du malade (LCR, sérum, urines) à l'aide d'un réactif constitué de particules de latex recouvertes d'anticorps antipolysaccharidiques.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Le fait le plus marquant concernant l'effet des antibiotiques sur *Haemophilus influenzae* est l'**émergence de souches résistantes à l'ampicilline par production de bétalactamase**. Des résistances aux tétracyclines, chloramphénicol et kanamycine sont souvent associées et, en testant ces quatre antibiotiques, on détermine une douzaine de phénotypes de résistance.

La sensibilité est conservée pour les pénicillines A associées à un inhibiteur de β

lactamase, les céphalosporines de deuxième et troisième génération, les quinolones fluorées et la gentamicine. De rares souches résistent au cotrimoxazole. Les lincosamines sont généralement inactives et les macrolides irrégulièrement efficaces.

Les souches capsulées opposent une plus grande résistance que les souches non invasives mais il faut faire un antibiogramme et une recherche de bétalactamase sur toutes les souches isolées.

VACCIN

La détection dans le sérum d'anticorps anti-capsulaires, a incité les chercheurs à utiliser les polysaccharides capsulaires comme vaccin. Le **polyribosyl-ribitol-phosphate (PRP)** qui caractérise les souches du sérotype b s'étant montré peu immunogène (antigène T indépendant), on l'a associé à des protéines pour produire des vaccins conjugués.

On a ainsi associé le PRP à :

- l'anatoxine diphtérique (PRP-D),
- une protéine de la membrane externe du méningocoque (PRP-OMP)
- l'anatoxine téstanique (PRP-T)

En France, on dispose du vaccin PRP-T commercialisé sous les appellations : **HIBest** ou **Act-HIB**.

La vaccination doit être recommandée chez les nourrissons entre 3 et 12 mois. Elle nécessite trois injections à un mois d'intervalle avec rappel après un an. Elle peut être associée aux vaccinations antidiphétique, antitétanique, anticoquelucheuse et antipoliomyélitique (Pentacoq). Son utilisation a permis une diminution sensible de la fréquence des méningites à *Haemophilus* qui représente la forme la plus sévère des pathologies dues à cette bactérie.

BRUCELLA

Le genre *Brucella* comprend trois espèces principales : ***B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis*** et des espèces plus rarement isolées (*canis*, *neotomae* et *ovis*). Ce sont des agents responsables d'infections animales accidentellement transmissibles à l'homme.

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Ce sont de très petits coccobacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés et aérobies stricts.

Culture

La culture des *Brucella* nécessite, au moins au sortir de l'organisme, l'utilisation de

milieux enrichis par du sérum ou sang de mouton.

Les conditions physiques optimales pour leur croissance est un pH à 6,8 et une température de 34°C.

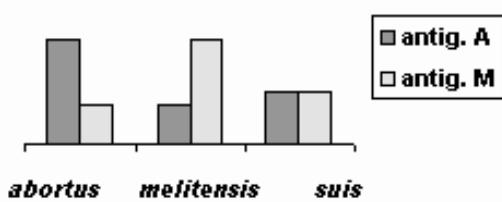
B. abortus se développe mieux, en primo-culture, dans une atmosphère enrichie en CO₂.

On a longtemps recommandé de conserver les hémocultures à l'étuve pendant plusieurs semaines pour avoir des chances d'y mettre en évidence des *Brucella* à cause de la lenteur de leur développement.. En fait, la qualité des bouillons d'hémoculture est aujourd'hui largement suffisante pour permettre leur culture dans des délais plus raisonnables. Une agitation de ces bouillons pour favoriser l'aérobiose est toutefois utile.

Caractères biochimiques

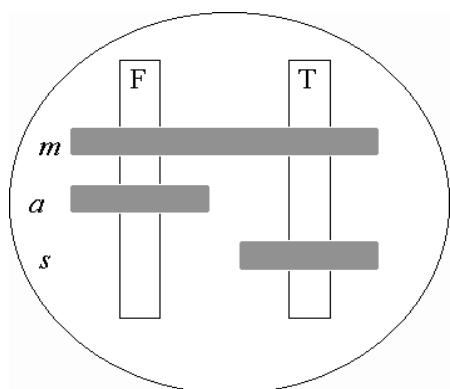
Les *Brucella* possèdent oxydase, catalase et uréase. Elles n'utilisent pas le citrate et ne produisent pas d'indole ni acétyl-méthyl-carbinol (réaction de Voges-Proskauer négative). L'utilisation des sucres est lente et n'est pas décelée sur les milieux usuels car l'acidification est masquée par la production d'ammoniaque.

Structure antigénique



Les *Brucella* possèdent des antigènes de structure lipopolycaccharidique appelés A et M inégalement répartis selon les espèces. L'antigène A domine chez *B. abortus*, M chez *melitensis* et existe en proportion intermédiaire et égale chez *suis*.. Les autres espèces sont dépourvues de ces antigènes. Les anticorps anti *Brucella* coagglutinent (ce sont des

réactions croisées) *Yersinia enterocolitica* O:9, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* et plus rarement *Escherichia coli* O:157 et certaines *Salmonella*.



Action des colorants

L'action bactériostatique de deux colorants, la fuchsine et la thionine est différente selon les espèces. La thionine inhibe la croissance de *B. abortus*, la fuchsine, celle de *B. suis* tandis que l'une et l'autre sont sans action sur *B. melitensis*. Le schéma ci-dessous résume ces propriétés.

Action des bactériophages : lysotypie

Le bactériophage "Tbilissi" provoque la lyse des cultures de *B. abortus* ; il est sans action sur les cultures de *B. melitensis* et n'agit qu'à très forte concentration (10.000 DCE) sur *B. suis*. (La DCE ou Dose Courante d'Épreuve correspond à la plus grande dilution du phage produisant une lyse confluante sur une souche étalon)

D'autres bactériophages ont des actions lytiques et permettent de lysotyper les différentes souches.

	DCE	10.000 DCE
<i>abortus</i>	+	+
<i>melitensis</i>	-	-
<i>suis</i>	-	+

Classification de Huddleson

Elle est fondée sur les résultats d'épreuves conventionnelles et permet de distinguer les différentes espèces et parmi elles les différents biotypes. Le tableau ci-dessous en fournit une version simplifiée qui intéresse les trois espèces principales.

	Besoin en CO ₂	Production H ₂ S	Uréase	Croissance sur		Agglutin:
				thionine	fuchsine	
<i>abortus</i>	+	+	+		+	+
<i>melitensis</i>	-	-	+	+	+	-
<i>suis</i>	-	++	+	+	-	±

toutefois

Les résultats d'hybridation ADN-ADN tendent à montrer que les *Brucella* ne constituent qu'un seul groupe génomique avec plus de 90% d'homologie. Ceci remet en cause la classification en 6 espèces qui ne constituerait en fait que des biovars au sein d'une seule espèce : *Brucella melitensis*.

POUVOIR PATHOGÈNE

la maladie animale

la brucellose animale est souvent cliniquement inapparente mais donne lieu à des atteintes de l'appareil génital avec avortements chez les femelles et lésions testiculaires chez le mâle. La maladie atteint les caprins, les ovins, les bovins et les porcins et peut donner lieu, chez d'autres animaux domestiques, à des manifestations moins caractérisées. Dans les formes latentes, les chèvres, brebis ou vaches excrètent la bactérie par le lait qui représente donc un facteur de diffusion et favorise la

contamination de l'homme par voies digestives.

Les conséquences économiques des épizooties sont désastreuses pour les éleveurs.

la brucellose humaine

La brucellose humaine est une maladie d'expression très polymorphe.

■ les formes inapparentes.

l'infection est totalement méconnue avant qu'un sérodiagnostic ne révèle l'existence d'anticorps spécifiques.

■ les formes septicémiques.

Après une incubation de 2 à 3 semaines et un début insidieux, la maladie est marquée par de la fièvre, des sueurs profuses, une asthénie, un amaigrissement, des arthralgies et myalgies : c'est la classique **fièvre ondulante sudoro-algique** accompagnée d'hépatosplénomégalie et d'adénopathies. On constate, malgré le tableau infectieux, une neutropénie. A ce stade et dans cette forme, l'hémoculture (ou la myéloculture) permet un isolement de la bactérie et les anticorps spécifiques apparaissent.

■ les formes localisées.

Elles surviennent après la forme septicémique ou après une forme inapparente et dans ce cas, paraissent primitives. Plusieurs localisations sont possibles mais ce sont surtout les os, les articulations qui sont atteints.

Les manifestations ostéo-articulaires sont les plus typiques : spondylodiscite lombo-sacrée, sacro-iléite ou arthrites.

Les autres troubles possibles sont des atteintes neuro-psychiques, méningo-encéphalitiques d'allure pseudo-tuberculeuse, uro-génitales (orchite), pulmonaires, hépatiques, spléniques ou cutanées. Des endocardites survenant sur valves lésées sont possibles.

■ les formes à rechute ou d'évolution prolongée.

Les signes généraux et les atteintes locales persistent plus d'un an. Les antibiotiques n'y font rien. Il est bien difficile de distinguer les rechutes des formes traînantes si le risque professionnel de contamination persiste. Les hémocultures ou le sérodiagnostic sont souvent positifs.

■ la brucellose chronique.

C'est la "patraquerie brucellienne" donnant lieu à des céphalées, des malaises, une asthénie d'allure psychosomatique. Les hémocultures et le sérodiagnostic sont négatifs mais l'intradérmoréaction à la mélitine est positive et témoigne de l'étiologie

brucellienne des troubles.

PHYSIOPATHOLOGIE et IMMUNITÉ

Les *Brucella* pénètrent dans l'organisme par voie cutanée, digestive ou respiratoire et gagnent par voie lymphatique le premier relais ganglionnaire. Elles se multiplient et disséminent dans tout l'organisme par voie sanguine et lymphatique. Elles sont phagocytées par les macrophages et y sont détruites en libérant antigène et endotoxine mais peuvent aussi s'y multiplier rapidement : les *Brucella* sont des bactéries "à développement intracellulaire facultatif".

L'immunité à médiation cellulaire est essentielle dans le défense de l'organisme contre l'infection brucellienne. Des lymphocytes T renforcent l'activité bactéricide des macrophages qui détruisent les bactéries au sein d'un granulome spécifique. Dans certains cas, les *Brucella* résistent et persistent à l'intérieur des macrophages avec risque de réactivations entretenant en outre un état d'hypersensibilité retardée responsable de la brucellose chronique.

La production d'anticorps est effective et permet le diagnostic de la maladie. Leur cinétique de production ne diffère pas de celle qu'on observe dans la plupart des infections bactériennes. Leur rôle protecteur semble réel mais secondaire par rapport à l'immunité cellulaire.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Brucella* sont responsables de zoonoses atteignant de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages avec une spécificité d'hôte qui n'est pas absolue. *B. melitensis* frappe surtout les ovins et les caprins, *abortus*, les bovins et *suis* les porcins et les léporidés.

La brucellose humaine se rencontre surtout dans les professions exposées (éleveurs, vétérinaires, personnel d'abattoirs, bouchers, personnel de laboratoire) mais peut également frapper des citadins contaminés par voie digestive en consommant du lait cru ou des fromages souillés par la bactérie. En France, l'incidence est en diminution, on en déclare environ 120 cas chaque année avec une répartition géographique inégale. Ce chiffre ne reflète sans doute pas le nombre réel de cas de maladie. Un tiers des personnes pour qui une déclaration est répertoriée exercent une profession à risque.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Diagnostic direct

On recherche les *Brucella* par hémoculture ou par culture dans les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, le LCR, le liquide de ponction articulaire ou le pus de foyers suppurrés. Il fautensemencer des milieux spéciaux. L'hémoculture est surtout positive pendant la phase aiguë (exceptionnellement pendant la phase chronique de la maladie).

Diagnostic indirect

Sérodiagnostic de la brucellose

Il faut prélever le sang nécessaire à la réalisation du sérodiagnostic avant de pratiquer l'IDR à la mélitine

Les différentes réactions utilisées ne décèlent pas les mêmes anticorps ; elles peuvent donc donner des résultats discordants.

■ SÉRODIAGNOSTIC DE WRIGHT

C'est une réaction d'agglutination en tubes qui met en évidence les IgG et les IgM agglutinantes

Elle est positive 10-15 j assez tôt durant la maladie (c'est la plus précoce) mais se négative vite (elle est positive surtout en phase aiguë). Un titre supérieur ou égal à 80 est significatif.

Des "faux positifs" sont possibles (réaction croisée avec *Yersinia enterocolitica* , *Vibrio cholerae* et *Francisella tularensis*) .

La possibilité de "faux négatifs" justifie la recherche systématique d'anticorps bloquants apparaissant chez certains malades, surtout en phase chronique ; ce sont des IgA ou IgG occupant les sites antigéniques sans provoquer d'agglutination. On ajoute au tube réactionnel une goutte de témoin positif : si l'agglutination ne se produit pas, c'est parce qu'elle est empêchée par les anticorps bloquants fixés sur les *Brucella*.

■ RÉACTION A L'ANTIGÈNE TAMPONNE (ROSE BENGALE)

ou Card test ou réaction à l'antigène tamponné

C'est une réaction simple et spécifique d'agglutination rapide sur lame en milieu acide utilisant une suspension de *Brucella* inactivées colorées par le Rose Bengale.

Elle met en évidence les IgG et se positive plus tardivement, elle est toutefois plus sensible et reste plus longtemps positive que l'agglutination de Wright.

■ RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

n'est plus guère utilisée car délicate à mettre en oeuvre.

■ IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Elle est positive plus tardivement que l'agglutination de Wright

Elle est très utile en cas de brucellose chronique car elle décèle encore des anticorps spécifiques alors que les autres réactions sérologiques se sont négativées.

IDR à la mélitine

La mélitine est un filtrat de culture de *B.melitensis*. On en injecte en intradermique 0,1 ml à la face antérieure de l'avant-bras (toujours faire un témoin négatif en injectant sur l'autre avant-bras du bouillon ayant servi à préparer la mélitine)

La lecture se fait après 24 à 48h. On observe, en cas de positivité, une réaction érythémateuse et un oedème local. L'IDR est positive au cours des atteintes chroniques et en est parfois le seul signe objectif.

L'apparition d'une HSR à la mélitine est plus tardive que celle des anticorps ; elle persiste très longtemps après la guérison et souvent même toute la vie.

UTILITÉ DES MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

EN FONCTION DU STADE DE LA MALADIE

Stade de la maladie	Hémoculture	Wright	Rose Bengale	RFC	IFI	IDR
AIGU	+++	+	+/-	+/-	+/-	-
SUBAIGU	+	+++	+++	+++	+++	+
CHRONIQUE	-	+/-	+/-	+/-	+	+++

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Brucella* sont des bactéries à développement intracellulaire facultatif ; il convient donc d'associer un antibiotique actif sur les *Brucella* et pénétrant dans les cellules. Les cyclines, la rifampicine, le cotrimoxazole et les phénicolés répondent à ces deux critères. On utilise souvent une association **doxycycline et rifampicine ou tétracycline et streptomycine** ou encore le cotrimoxazole.

Le traitement doit être prolongé durant plusieurs semaines pour éviter les rechutes.

PROPHYLAXIE

Elle repose sur la surveillance sanitaire des cheptels et l'abattage des tous les animaux

dans les troupeaux infectés. Ces mesures visent à éradiquer l'épidémie. La vaccination animale est aujourd'hui interdite car elle risque de fausser les investigations diagnostiques fondées sur le sérodiagnostic qui décelerait les anticorps vaccinaux.

Chez l'homme, les mesures de prophylaxie individuelle sont indispensables : protection contre les risques de contamination pour les professionnels par des mesures d'hygiène et consommation de produits laitiers pasteurisés.

Le vaccin antibrucellien à usage humain n'est plus fabriqué depuis fin 1992

BORDETELLA

Le genre *Bordetella* comprend :

- *Bordetella pertussis*, ou bacille de Bordet Gengou, agent étiologique de la coqueluche,
- *Bordetella parapertussis*, responsable de coqueluches atténuées,
- *Bordetella bronchiseptica*, occasionnant, chez l'animal, des rhinites, trachéo-bronchites et pneumonies et chez l'homme des syndromes paracoqueluchéens.
- *Bordetella avium* qui n'est isolée que chez les oiseaux.
- *Bordetella holmesii*, récemment isolée chez l'homme par hémocultures

B. pertussis et parapertussis sont des hôtes exclusifs de l'homme.

BORDETELLA PERTUSSIS

BACTÉRIOLOGIE

Bordetella pertussis est un coccobacille à Gram négatif se présentant isolément, en diplobacilles ou en courtes chaînettes. Il est souvent capsulé mais seulement au sortir de l'organisme.

Il est aérobie strict, possède une oxydase et son métabolisme est du type respiratoire.

Bactérie fragile et exigeante, sa culture n'est possible que sur milieux spéciaux contenant du sang frais (milieu de Bordet-Gengou). Les colonies apparaissent après plusieurs jours, elles sont petites, luisantes et bombées, "en gouttelettes de mercure". Cet aspect se modifie au cours des subcultures et devient de plus en plus rugueux, passant de la "phase I" à la "phase IV", ce qui correspond à la perte de la capsule.

FACTEURS DE VIRULENCE

Il s'agit de constituants antigéniques présents chez les souches en phase I.

■ la **toxine pertussique (PTX)**, thermolabile, de nature protéique et libérée du corps bactérien peut être qualifiée d'exotoxine. Elle est considérée comme l'antigène majeur déterminant l'immunité anticoquelucheuse. Ses effets biologiques sont désignés sous les noms de :

- **Facteur promoteur de lymphocytose (LPP)**
- **Facteur histamino-sensibilisant (HSF)**
- **Facteur activant les îlots de Langerhans (IAF)**

■ l'**hémagglutinine filamenteuse (FHA** pour filamentous hemagglutinine antigen)

portée par les fimbriae qui a un rôle important dans l'adhésion de *B. pertussis* aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire,

- des **agglutinogènes** protéiques de surface, qui permettent de classer les souches en sérotypes,
- la **pertactine**, protéine qui a un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte,
- l'**adénylate-cyclase-hémolysine**, enzyme excrétée perturbant le fonctionnement des cellules de l'hôte et altérant le pouvoir bactéricide des polynucléaires et macrophages,
- la **toxine dermo-nécrotique**, protéique, provoquant une nécrose au point d'injection,
- une **cytotoxine trachéale** qui est une glycoprotéine inhibant la synthèse de l'ADN,
- l'**endotoxine lipopolysaccharidique** aux effets immunogène et toxique faibles.

(*Nantie de ce riche équipement antigénique, Bordetella pertussis est un excellent adjuvant de l'immunité*).

LA COQUELUCHE

La coqueluche est affection aiguë des voies respiratoires supérieures commençant par une phase catarrhale avec toux sèche suivie de la période des quintes avec sa toux caractéristique ("chant du coq") évoluant sans fièvre et se terminant par une convalescence assez longue.

Chez l'adulte, il faut penser au diagnostic de coqueluche devant toute toux sèche persistante depuis plus de 21 jours.

PATHOGÉNIE

Le germe pénètre dans l'organisme par voie aérienne et se fixe par ses fimbriae (hémagglutinine FHA) à la surface des épithéliums ciliés de la trachée et des bronches. Sous l'effet de la toxine pertussique, de l'adénylatecyclase et la cytotoxine trachéale, les mouvements des cils vibratiles sont paralysés. La bactérie peut alors se multiplier en surface, sans pénétrer dans la muqueuse et sans jamais occasionner de bactériémie. Les produits toxiques sont cependant libérés et il s'en suit une réaction inflammatoire locale avec infiltrat lymphocytaire (LPF) aggravée par la production d'HSF, une perturbation du fonctionnement cellulaire (adénylate-cyclase), une hypersécrétion de mucus qui est éliminé par la toux avec les débris tissulaires et les bactéries (contagion).

La densité bactérienne diminue à la période des quintes car les bactéries sont lysées ou éliminées mais les toxines libérées entretiennent les perturbations pathologiques.

ÉPIDÉMIOLOGIE - IMMUNITÉ

*L'habitat de *Bordetella pertussis* est strictement humain et la transmission exclusivement interhumaine. La coqueluche existe à tout âge mais elle plus fréquemment observée chez les enfants de moins de six ans qui sont peu immunisés. La guérison est suivie d'une immunité.*

La coqueluche avait pratiquement disparu en France grâce au vaccin (introduit en 1959 et généralisé en 1966) mais elle resurgit actuellement, frappant les adolescents et les adultes qui contaminent les nourrissons non encore vaccinés. Cette situation est

sans doute en rapport avec l'abandon des rappels de vaccination.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

- **Le diagnostic direct est difficile à tous les stades**
 - les prélèvements doivent être faits à la période catarrhale, période où les signes cliniques n'ont rien de caractéristique. A la phase des quintes, on a peu de chances de démontrer la présence du germe. Ces prélèvements doivent être faits par écouvillonage appuyé du cavum (les bactéries adhèrent) ou, mieux, par aspiration des mucosités naso-pharyngées ou bronchiques.
 - la mise en culture doit être effectuée sans délai car le germe est fragile. On ensemente sur milieu de Bordet Gengou qui doit être préparé extemporanément. La culture est lente. Après trois à six jours, apparaissent de petites colonies "en gouttelettes de mercure".
 - l'identification se fonde sur les caractères culturaux car les tests biochimiques classiques, mis à part la présence d'une oxydase, sont négatifs pour la plupart.
 - on peut effectuer une recherche sur frottis par une réaction d'immunofluorescence directe si on dispose du conjugué spécifique.
 - la recherche directe de l'adénylate-cyclase dans les prélèvements nasopharyngés permet un diagnostic fiable et rapide de la coqueluche mais est peu utilisée car elle nécessite l'utilisation de radio-isotopes.
- **la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet de détecter les séquences d'ADN propres à *Bordetella pertussis***

Le diagnostic indirect, sérologique, se positive tardivement quand le diagnostic clinique devient évident.

- *La recherche des anticorps agglutinants est une technique facile mais peu sensible néanmoins utilisable pour détecter les anticorps vaccinaux.*
- *La technique ELISA utilisant comme antigène des suspensions bactériennes inactivées a l'inconvénient d'être peu spécifique.*
- *Le Western-Blot qui révèle la présence d'anticorps spécifiques est une méthode longue et coûteuse.*

Des préparations antigéniques purifiées utilisant l'adénylate-cyclase hémolysine ou la toxine pertussique sont utilisées pour des réactions sensibles et spécifiques par ELISA ou par Western-Blot mais les réactifs ne sont pas commercialisés.

Des signes biologiques non spécifiques confortent le diagnostic : hypoglycémie due à l'effet de l'IAF et hyperlymphocytose due à l'action du LPF.

TRAITEMENT

Bordetella pertussis est sensible aux macrolides, sulfamides, tétracyclines, aminosides ; il est résistant aux bétalactamines. Les antibiotiques n'ont guère d'effets sur la durée et l'intensité des quintes. On peut les utiliser si l'on craint une surinfection.

PROPHYLAXIE

Le premier vaccin anticoquelucheux utilisé est une suspension de bacilles tués

*(vaccin à germes entiers). On l'utilise souvent associé aux anatoxines antidiptérique, antitétanique et au vaccin antipoliomyélétique ainsi qu'aux vaccins anti *Haemophilus influenzae b* et anti-virus de l'hépatite B (vaccin hexavalent. Il doit être administré très tôt car la coqueluche est redoutable chez le nourrisson. Trois injections (à 2, 3 et 4 mois) et un rappel (à 16-18 mois) sont nécessaires. Ce vaccin reste recommandé de manière préférentielle pour la primo-vaccination du nourrisson.*

Ce vaccin a mauvaise réputation, des accidents (très rares) ont été observés. Des vaccins acellulaires (abactériens), utilisant la toxine ou l'hémagglutinine filamentuse, sont mieux tolérés mais confèrent une moindre immunité. Ils sont réservés aux rappels ultérieurs de vaccination (vers 11-13 ans) et peuvent être utilisés en alternative au vaccin à germes entiers pour le rappel à 16-18 mois.

La chimioprophylaxie par érythromycine ou josamycine est indiquée pour protéger les "sujets contacts".

PASTEURELLA

Le genre *Pasteurella* comprend des espèces responsables de maladies animales et occasionnellement humaines. Ces bactéries ont un passé historique passionnant, une taxonomie changeante et une pathogénie complexe (Mollaret).

HISTORIQUE

Dès 1879, Toussaint puis Pasteur réussissent la culture du "bacille du choléra des poules" et démontrent ainsi l'origine microbienne de la maladie. Poursuivant ce travail, Pasteur se rend compte des effets protecteurs d'une culture vieillie de la bactérie et perçoit ainsi le concept de vaccin vivant atténué.

TAXONOMIE

Le genre *Pasteurella* constitue avec les *Haemophilus* et les *Actinobacillus* la famille des *Pasteurellaceae*. Les espèces reconnues pathogènes pour l'homme sont : *Pasteurella multocida* (espèce type), *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella bettyae*.

PASTEURELLA MULTOCIDA

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Morphologie

Pasteurella multocida est un coccobacille à Gram négatif à coloration bipolaire, immobile, asporulé et capsulé.

Culture

La bactérie se développe à 37°C sur milieux ordinaires en aéro-anaérobiose mais supporte mal les fortes pressions partielles en oxygène : c'est un germe microaérophile. Les colonies sont petites, rondes, lisses, bombées et transparentes (colonies S) mais après repiquages peuvent devenir plus rugueuses (colonies R). Des souches d'origine humaine apparaissent parfois muqueuses (colonies M).

Comme toutes les *Pasteurella*, *P. multocida* est sensible au composé vibriostatique O/129 (ou 2,4 diamino-6,7 diisopropylptéridine, produit inhibant la croissance des vibrions et des pasteurelles).

Caractères biochimiques

Enzymes

P. multocida possède une oxydase (à condition d'utiliser pour la rechercher le tétraméthyl-para-phénylène diamine) ainsi qu'une catalase et une nitrate réductase mais pas de lysine décarboxylase ni d'arginine désaminase.

Métabolisme glucidique

Elle fermente régulièrement glucose, saccharose, xylose, arabinose et mannitol mais pas le maltose et l'action sur le lactose est variable selon les souches ; elle ne peut utiliser le citrate comme source unique de carbone.

Métabolisme protéique

La recherche de l'indole est positive mais la bactérie ne possède ni uréase ni gélatinase et ne produit pas d'H₂S.

Pouvoir pathogène expérimental

L'inoculation par voie intrapéritonéale à la souris entraîne la mort de l'animal en 48 heures par infection généralisée.

Antigènes

Il existe des polysaccharides capsulaires antigéniques déterminant des sérotypes A, B, D ou E. Les souches humaines appartiennent au sérotype A ou plus rarement D. Des variants M des sérotypes A et D, formant des colonies muqueuses, possèdent dans la capsule de l'acide hyaluronique qui masque les autres antigènes..

Le LPS constituant de la membrane externe se comporte comme une endotoxine comme chez tous les bacilles à Gram négatif,

Des protéines de paroi semblent avoir un rôle immunologique important en se liant aux haptènes polyosidiques du LPS.

Habitat

Les *Pasteurella* sont des hôtes obligatoires des animaux, des vertébrés surtout, chez qui ils se comportent comme des commensaux de la cavité buccale et qu'on isole de la salive. Elles peuvent survivre quelque temps dans le milieu extérieur mais ne s'y développent pas. Chez l'homme le portage latent, pharyngé, est possible chez des sujets professionnellement au contact des animaux.

POUVOIR PATHOGÈNE

Parmi les pasteurelloses humaines, il convient de distinguer, les pasteurelloses d'inoculation, secondaires à des agressions animales et les pasteurelloses systémiques se manifestant sous forme de septicémies ou d'atteintes viscérales.

Les pasteurelloses d'inoculation

Elles surviennent après morsure, griffure ou léchage sur plaie préexistante. La pénétration est donc cutanée, exceptionnellement oculaire. Les lésions siègent, par ordre de fréquence, au membre supérieur surtout - mains, poignets, avant bras -, aux extrémités inférieures ensuite, au cou et sur la tête enfin (chez les enfants principalement). Les animaux responsables sont le plus souvent le chat puis le chien.

L'inoculation indirecte, par contact avec des linges, végétaux ou déjections souillés sont très exceptionnelles.

Les **formes loco-régionales aiguës** des pasteurelloses d'inoculation donnent lieu, très rapidement, en moins de 24 heures après la blessure, à des manifestations inflammatoires locales intenses avec de très vives douleurs suivies de lymphangite et d'adénopathies épitrochléennes, axillaires, poplitées ou crurales selon le siège de la lésion. Généralement les signes locaux s'amendent en quelques jours, les adénopathies persistent quelques semaines mais la guérison se fait sans séquelles. En cas de morsures profondes, on peut observer des ostéites ou des arthrites suppurées.

Les **formes loco-régionales subaiguës** succèdent à des formes aiguës, souvent passées inaperçues. Elles se manifestent sous un masque trompeur, rhumatologique, neurologique ou dermatologique. Quelques jours ou quelques semaines, parfois plus, après la blessure qui paraît guérie, des douleurs réapparaissent accompagnées de signes inflammatoires sans suppuration, prenant le masque de téno-synovite, d'arthrite inflammatoire ou de d'algodystrophie.

Les pasteurelloses systémiques

On désigne sous cette appellation, les septicémies et les atteintes viscérales dues à des pasteurelles. Elles sont plus fréquemment sur un terrain fragilisé : cirrhose éthylique, insuffisance hépatique, leucémie, cancer, connectivites, immunodépression.

Les **septicémies** à *Pasteurella* sont presque toujours secondaires à une blessure occasionnée ou contaminée par un animal et sont parfois associées à une atteinte viscérale. Exceptionnellement, elles paraissent primitives, sans notion de porte d'entrée.

Les **infections respiratoires** - angines, rhino-pharyngites, otites, sinusites, bronchites, pleurésies, pneumopathies - sont fréquentes chez les sujets vivant au contact des

animaux.

Les **localisations neuro-méningées** - méningites ou des abcès cérébraux -, les atteintes **cardio-vasculaires, digestives, gynécologiques, obstétricales, urinaires ou ostéo-articulaires** sont plus rares.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

L'étape essentielle du diagnostic des pasteurelloses est la mise en évidence de la bactérie. On la cherche dans la sérosité de la plaie, dans le pus ganglionnaire, articulaire ou osseux, dans le sang par hémoculture ou dans l'expectoration.

On ensemence des milieux riches, solides et liquides. Les colonies se développent sur gélose en 24 à 48 heures. Elles sont petites, brillantes, parfois muqueuses. La culture est inhibée par le composé vibriostatique O/129.

L'identification se fonde sur la morphologie - coccobacilles à coloration bipolaire - et les caractères biochimiques.

Un sérodiagnostic par agglutination, immunoenzymologie est utilisable chez l'animal mais pas chez l'homme.

Une intradermo-réaction à la "pasteurelline" (filtrat de culture en bouillon) est un très bon test diagnostique dans les formes focales dès le 8ème jour et pendant plusieurs années parfois.

Les tests biochimiques et enzymatiques permettent de reconnaître les autres espèces du genre et les espèces voisines.

L'espèce la plus fréquemment isolée après morsure est **Pasteurella multocida**, (50 à 60 % des cas).

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les bactéries du genre *Pasteurella* sont sensibles *in vitro* à de nombreux antibiotiques : bétalactamines, cyclines, imidazolés, fluoroquinolones. Les macrolides et les aminosides ont une moins bonne activité.

Les espèces plus spécifiquement animales sont généralement plus résistantes.

Bétalactamines et cyclines, associés ou non aux imidazolés, macrolides ou aminosides sont les antibiotiques recommandés pour le traitement des pasteurelloses et des infections après morsure ou griffade.

Dans les infections systémiques, les fluoroquinolones sont souvent préconisées.

L'antigénothérapie par la pasteurelline a donné lieu à de beaux succès dans les formes chroniques. (Christol)

Francisella tularensis

Francisella tularensis, responsable de la tularémie, est une bactérie isolée en 1911 par Mac Coy et Chapin dans le comté de Tulare en Californie. En 1919, Francis décrit, aux USA, les premiers cas humains de tularémie. La maladie existe dans de nombreux pays de l'hémisphère nord exclusivement et a été reconnue en France en 1945 en Lorraine mais actuellement persiste en Alsace, en Touraine, dans la Vienne et dans le Périgord.

BACTERIOLOGIE

Francisella tularensis (*F. t*) est un tout petit coccobacille à Gram négatif (0,5 à 0,7 m m), à la limite de la visibilité au microscope optique, immobile, non sporulé apparaissant parfois entouré d'une fine capsule.

Il est aérobio strict.

La culture est lente et difficile et exige des milieux complexes comprenant du jaune d'oeuf, de la cystéine, du sang et du glucose. Le plus classique est le milieu de Francis.

La bactérie est tuée à la température de 45°C mais résiste au froid et à la congélation.

Il existe deux biovars A (ou *tularensis*) exclusivement rencontré en Amérique du Nord et B (ou *palaearctica*) moins virulent qui sévit en Europe, en Asie et en Amérique.

POUVOIR PATHOGENE

La tularémie est une maladie animale, occasionnellement transmissible à l'homme.

Epidémiologie

Elle frappe les léporidés (lièvres, lapins) et les petits rongeurs sauvages (mulots, campagnols). Les gros gibiers (chevreuils, sangliers) peuvent aussi être atteints. Les animaux domestiques (chiens, chats) sont des porteurs sains potentiels. La contamination entre animaux est assurée par les tiques, les insectes piqueurs et par le cannibalisme.

L'infection humaine est accidentelle, transmise essentiellement par manipulation d'un animal malade ou mort ; la bactérie peut en effet traverser la peau saine et *a fortiori* la peau lésée. C'est donc une maladie frappant les chasseurs, les forestiers et les cultivateurs ainsi que leur famille (la cuisinière qui dépèce les lièvres...). Elle sévit donc durant la saison de la chasse mais persiste en été ; cette situation paradoxale est peut-être explicable par un braconnage difficilement avoué ou par la manipulation de morceaux de gibier sortis du congélateur car la bactérie résiste au froid.

Piqûres de tiques (aux Etats Unis surtout) ou d'insectes hématophages sont des modes contamination humaine possibles.

D'autres voies de transmission ont été signalées : voies respiratoires supérieures, oropharynx, conjonctives expliquant la variété des expressions cliniques de la maladie.

■ Manifestations cliniques

La forme ulcéro-ganglionnaire est la plus fréquente. Elle associe des lésions cutanées, érythémateuses ou vésiculeuses, un syndrome pseudogrippal et une adénopathie satellite ne régressant pas et se fistulisant. Les localisations sont brachiale, sous maxillaire, prétragienne.

La maladie peut se manifester sous une forme fébrile pure (ou "typhoïde"), pulmonaire ou méningée.

■ Pathogénie

La bactérie traverse la peau ou les muqueuses et diffuse par voie lymphatique jusqu'aux ganglions voisins où il forme des micro-abcès purulents qui s'autostérilisent.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

La mise en évidence du germe est difficile; les prélèvements, même mis en culture dans de bonnes conditions, restent souvent stériles. Quand on obtient une culture, on peut identifier la souche par agglutination sur lame à l'aide d'un antisérum spécifique ou par inoculation (par friction percutanée) à l'animal.

Dans la majorité des cas, le diagnostic biologique est assuré par séroagglutination d'un antigène fait d'une suspension bactérienne formolée. La réaction est parfois faussement négative à cause d'un phénomène de zone. Par ailleurs on note des communautés antigéniques entre *F. t.*, *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:3 donnant des résultats faussement positifs.

L'intradémo-réaction à la tularine est un bon moyen de diagnostic mais il est difficile de se procurer l'antigène.

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Aminosides, cyclines, chloramphénicol, quinolones fluorées sont actifs *in vitro*. Au traitement antibiotique, il faut toutefois souvent adjoindre des ponctions répétées ou une excision du ganglion.

A noter qu'il est dangereux de manipuler une souche de *Francisella tularensis* : masque et gants sont de rigueur au laboratoire.

La maladie des griffes du chat

La maladie des griffes du chat (MGC) est connue depuis longtemps puisque Robert Debré l'a décrite en 1950 sous ce nom pendant que Pierre Mollaret la décrivait simultanément sous le nom de lymphoréticulose bénigne d'inoculation (LRBI). Les anglo-saxons l'appellent "cat scratch disease" (CSD). Elle est facilement reconnue dans

sa forme typique, mais depuis peu elle est tenue pour responsable de manifestations inhabituelles et surtout, après des errements qui ont duré près de cinquante ans, l'agent étiologique en cause semble aujourd'hui démasqué. Ceci permet, si besoin est, de confirmer le diagnostic clinique par des méthodes biologiques.

La forme habituelle

Au début, survient une papule indolore, non prurigineuse, qui se transforme en vésicule, se recouvre d'une croûte et guérit spontanément en une ou plusieurs semaines sans laisser de cicatrice. Pendant cette phase de régression, apparaît dans le territoire ganglionnaire correspondant une adénopathie mobile, indolore, non inflammatoire, qui régresse le plus souvent en quelques mois mais peut aussi suppurer. Parfois, une fièvre modérée, des douleurs diffuses, des céphalées et une discrète détérioration de l'état général complètent la symptomatologie.

L'aspect histologique des ganglions atteints n'est pas spécifique : les descriptions font état d'infiltrat inflammatoire, de granulomes et de microabcès stellaires.

La MGC concerne surtout les enfants (80% des malades ont moins de 18 ans) et sévit principalement pendant les six derniers mois de l'année. Elle n'est pas toujours reconnue, aussi sa fréquence est-elle difficilement appréciable. Aux États Unis, on l'estime à 6000 cas annuels ; en France, une enquête rétrospective portant sur les années 1991 à 1996 a répertorié 88 cas.

Les aspects atypiques

Parfois déroutants, ils peuvent être authentifiés grâce aux possibilités diagnostiques nouvelles.

Le syndrome oculo-ganglionnaire de Parinaud qui associe une conjonctivite et une adénopathie prétragienne est le plus anciennement connu.

Des atteintes neurologiques (encéphalite, méningite, syndrome pyramidal, hémiplégie ou aphasic) ont été rapportées comme relevant de la MGC.

Les autres atteintes, hépato-spléniques, osseuses, hématologiques, les formes pseudo-tumorales, abdominales ou mésentériques, un érythème noueux ou simplement une fièvre au long cours donnent lieu à des hésitations diagnostiques et méritent d'être reconnues comme MGC, de bon pronostic. C'est dans ces cas que la preuve biologique est la plus utile.

Le test cutané

Un antigène préparé à partir du pus d'un ganglion infecté d'origine humaine est utilisé pour révéler un état d'hypersensibilité retardée en pratiquant une intradermoréaction (de Hanger et Rose pour les américains ou de Reilly pour les français). La réaction est très spécifique et, jusqu'à ces dernières années, a été la seule méthode diagnostic paraclinique utilisable.

Le chat

Le rôle du chat en tant que réservoir de virus n'a jamais été contesté. Toutes les études épidémiologiques font état, dans 90% des cas observés, d'un contact avec un chat. C'est suite à une griffure, léchage d'une plaie, voire morsure, que les malades sont contaminés. La recherche d'un site d'inoculation est essentielle mais pas toujours aisée. D'autres vecteurs sont décrits comme possibles : chiens, singes, écureuils et même des objets inertes comme épines, échardes, arêtes de poisson, piquants de hérisson... Cependant n'a été sérieusement démontré que le rôle du chat, et du jeune chat en particulier, qui est porteur sain et ne serait contaminant que durant une très courte période.

Comment le chat se contamine-t-il ? Par la terre ? Par les puces chez qui on a pu isoler l'agent infectieux ? La question n'a pas reçu de réponse péremptoire.

Les critères diagnostiques

Historiquement cinq critères permettaient selon Carithers de poser le diagnostic mais on se contente en fait souvent des quatre premiers :

- inoculation cutanée,
- adénopathie,
- contact avec un chat,
- positivité de l'intradermoréaction,
- présence de granulomes à l'examen histopathologique du ganglion.

L'agent étiologique

Il a très tôt admis qu'un agent infectieux était la cause de la maladie. Des tentatives de transmission à divers animaux (souris, rats, cobayes, lapins, furets, chiens et même chats) se sont soldées par des échecs. Les premiers succès furent obtenus chez les singes cercopithèques. On a même tenté et réussi des inoculations expérimentales chez l'homme (des techniciens de laboratoire en l'occurrence). Preuve était donc faite que la maladie était due à un agent infectieux. Restait à l'identifier.

Mollaret, en raison d'analogies avec la lymphogranulomatose vénérienne (maladie de Nicolas Favre), notamment dans ses aspects histopathologiques et de la positivité de la réaction de déviation du complément pratiquée avec l'antigène de groupe des *miyagawella* (ancienne appellation des *Chlamydia*), a cru pouvoir incriminer un "virus" de ce groupe. Le "virus" de la maladie de Nicolas Favre a été récusé car l'intradermoréaction de Frei était dans tous les cas négative alors que celle pratiquée avec l'antigène de Reilly était déjà reconnue très spécifique.

D'autres agents infectieux ont ensuite été successivement incriminés : *Chlamydia trachomatis*, bactéries pyogènes, champignons, *Francisella tularensis*, mycobactéries, virus hémagglutinant, virus herpétiques ... mais toutes les examens microbiologiques et immunologiques correspondants se sont avérés négatifs.

L'éénigme résistait jusqu'au jour où Wear et coll. en 1983, utilisant une coloration spéciale, ont observé de petits bacilles dans les coupes histologiques des ganglions. L'année suivante, Margileth a fait la même observation dans les biopsies des lésions de la porte d'entrée. En 1985, Greber et coll. ont réussi l'isolement des lésions d'une

bactérie identifiée à *Rothia dentocariosa*, commensale de la cavité buccale, qui a été un court moment tenue pour responsable de la maladie avant qu'on ne comprenne qu'il s'agissait en fait d'un contaminant, comme *Leptotrichia buccalis* également évoquée par Verhoeff lorsqu'il l'a isolé de lésions conjonctivales de sujets atteints du syndrome de Parinaud. C'est enfin en 1988 que English, de l'Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), a cultivé à partir de ganglions de CSD un bacille que Brenner a identifié et proposé de nommer *Afipia felis*. La MGC n'était plus orpheline !

Malheureusement, aucun chat n'a été trouvé porteur de la bactérie et aucun anticorps spécifique d'*Afipia felis* n'a pu être mis en évidence dans le sérum des malades. Par contre, Regnery y a trouvé des anticorps dirigés contre *Rochalimea henselae*. La bactérie a ensuite été isolée chez les chats et le gène amplifié et séquencé dans le fameux antigène de Reilly reconnu spécifique. La cause semble donc entendue quand survient un dernier avatar : le genre *Rochalimea* est supprimé et les bactéries qui en font partie entrent dans le genre *Bartonella* : notre bacille devient alors *Bartonella henselae*.

Les bactéries du genre *Bartonella*

Ce sont de petits bacilles à Gram négatif, souvent incurvés, se développant lentement sur des milieux inertes mais riches - gélose au sang - sous atmosphère enrichie en CO₂.

Onze espèces sont actuellement répertoriées dans le genre *Bartonella* dont quatre sont reconnues responsables d'infections chez l'homme.

- *B. bacilliformis* est responsable de la maladie de Carrion ou fièvre d'Oroya - anémie hémolytique infectieuse, souvent mortelle - et d'une forme cutanée moins sévère, la verruga peruviana. Ces affections sévissent surtout au Pérou et en Colombie. Un phlébotome est l'agent vecteur de la bactérie.
- *B. quintana* est responsable de la fièvre des tranchées qui a gagné quelques batailles durant la première guerre mondiale.
- *B. elizabethae* a été isolée chez un malade atteint d'endocardite.
- *B. henselae* est la cause chez le sidéen ou l'immunodéprimé de l'angiomatose bacillaire qui donne lieu à des lésions papuleuses cutanées ou muqueuses hypertrophiques différentes des lésions du syndrome de Kaposi. La même bactérie est reconnue responsable, toujours chez les sidéens, de la pélioïse hépatique qui est une affection générale sévère.

Chez les sujets immunocompétents, B. henselae est l'agent actuellement reconnu de la maladie des griffes du chat.

Le diagnostic

L'infection doit être évoquée dans de nombreuses circonstances cliniques et plus encore si un contact avec un chat est reconnu.

Formes cliniques possibles de la MGC

Lymphadénopathie avec ou sans papule d'inoculation	Syndrome oculo-ganglionnaire de Parinaud
Fièvre persistante d'origine inconnue	Encéphalite ou atteintes neurologiques
Altération de l'état général avec fièvre, malaise, perte de poids, douleurs diffuses	Eruptions, érythème noueux, purpura ou microangiopathies
Adénopathie maligne redoutée	Anémie hémolytique non immune et fébrile
Atteinte hépatique de cause non déterminée	Purpura thrombopénique
Ostéomyélite	

Dans les formes atypiques surtout, elle peut être confirmée par un sérodiagnostic spécifique qu'il est bon d'associer à un sérodiagnostic effectué avec l'antigène A. felis. Les techniques utilisables sont l'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA.

La culture de l'agent infectieux est possible mais difficile (fastidious bacteria) et lente (15 jours) et n'est positive qu'au début de l'infection avant le stade de suppuration.

On peut également avoir recours à des techniques d'amplification génique (PCR).

Le test cutané, qui a rendu d'éminents services, doit être abandonné car il est dangereux non pas tant pour le malade que pour le médecin ; il n'est en effet guère prudent aujourd'hui d'injecter à des malades des produits d'origine humaine.

Le traitement

La MGC dans ses formes typiques guérit toute seule. La bactérie se montre in vitro bien sensible aux antibiotiques mais leur efficacité in vivo est plus décevante. Cyclines, rifampicine, aminosides, cotrimoxazole chloramphénicol, ciprofloxacine et même pénicilline sont le plus souvent recommandés.

Conclusion

Les formes atypiques et généralisées de la MGC signalées plus haut constituent peut-être un intermédiaire entre la forme typique, localisée et circonscrite, et les redoutables maladies générales frappant les immunodéprimés. Sa constante bénignité n'est pas si certaine...

On dispose maintenant d'une méthode diagnostique non invasive : le sérodiagnostic, qui doit surtout être préconisé pour reconnaître une forme atypique.

Si le sérodiagnostic est négatif, on peut recommander la biopsie-exérèse pour y

rechercher *Bartonelle henselae* par culture ou par une technique de **biologie moléculaire**.

MYCOBACTÉRIES

La famille des ***Mycobacteriaceae*** de l'ordre des **Actinomycetales** ne comprend que le genre ***Mycobacterium*** dans lequel on distingue les espèces suivantes :

- groupe "tuberculosis"
 - *Mycobacterium tuberculosis*
 - *Mycobacterium africanum*
 - *Mycobacterium bovis*
 - B.C.G.
- les "atypiques"
 - *Mycobacterium kansasii*
 - *Mycobacterium marinum*
 - *Mycobacterium gordonae*
 - *Mycobacterium xenopi*
 - *Mycobacterium avium-intracellulare*
 - *Mycobacterium scrofulaceum*
 - *Mycobacterium ulcerans*
 - *Mycobacterium fortuitum*
 - *Mycobacterium malmoense*
- *et Mycobacterium leprae*

Structure chimique

Les mycobactéries retiennent les colorants malgré l'action combinée d'acides dilués et d'alcool. Cette caractéristique, appelée **alcoolo-acido résistance**, est due à la richesse de leur paroi en lipides. Elle est mise à profit pour la coloration différentielle de **Ziehl-Neelsen**.

Cette paroi comprend :

- du peptidoglycane
- des lipopolysaccharides constitués principalement de mycolate d'arabino-galactane (l'arabino-galactane est un haptène, l'acide mycolique est une très grosse molécule d'acide gras)
- des cires dont certaines constituent l'adjuvant de Freund
- le cord-factor (dimycolate de tréhalose) responsable d'un assemblage filamenteux en forme de corde des cultures en milieu liquide et stimulant l'immunité

- les mycosides (glycolipides et peptidoglycolipides) dont les constitutions, variables selon les espèces et les souches, en font des marqueurs épidémiologiques.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Principal agent de la tuberculose, ***Mycobacterium tuberculosis***, couramment dénommée **bacille de Koch** ou **BK**, est un pathogène strict de l'homme.

Morphologie

C'est un fin bacille assez long (2 à 5 µm), légèrement incurvé. Il a la structure d'un Gram + mais est difficilement colorable par cette technique. Pour l'observer au microscope, il faut avoir recours à la méthode de Ziehl-Neelsen révélant son alcoolo-acido résistance qui est une propriété commune à toutes les mycobactéries.

Culture

Il cultive très lentement (le temps de division est de vingt heures) en aérobiose à 36°C et exige des milieux spéciaux.

Le milieu le plus utilisé est le milieu à l'oeuf de **Loewenstein-Jensen** qui contient en outre des sels minéraux, de la glycérine, de l'asparagine, de la féculle de pomme de terre et du vert malachite.

Les colonies apparaissent en quinze jours ou trois semaines et sont caractéristiques, rugueuses et verruqueuses, de couleur beige, eugoniques.

Caractères biochimiques

Des caractères biochimiques et enzymatiques constituent des caractéristiques biochimiques de l'espèce *M. tuberculosis* permettant son identification au sein du genre.

- production d'acide nicotinique ou niacine
- présence de nitrate réductase, de catalase et d'uréase
- résistance à l'hydrazide de l'acide thiophène 2 carboxylique ou TCH
- sensibilité au pyrazinamide

Vitalité - Résistance

Le BK est sensible à la chaleur, à la lumière du soleil, aux U.V., aux rayons X et à l'alcool à 70°C mais résiste au froid et à la dessiccation, aux désinfectants et détergents

Pouvoir pathogène

L'atteinte pulmonaire est la plus fréquente et se manifeste sous forme de :

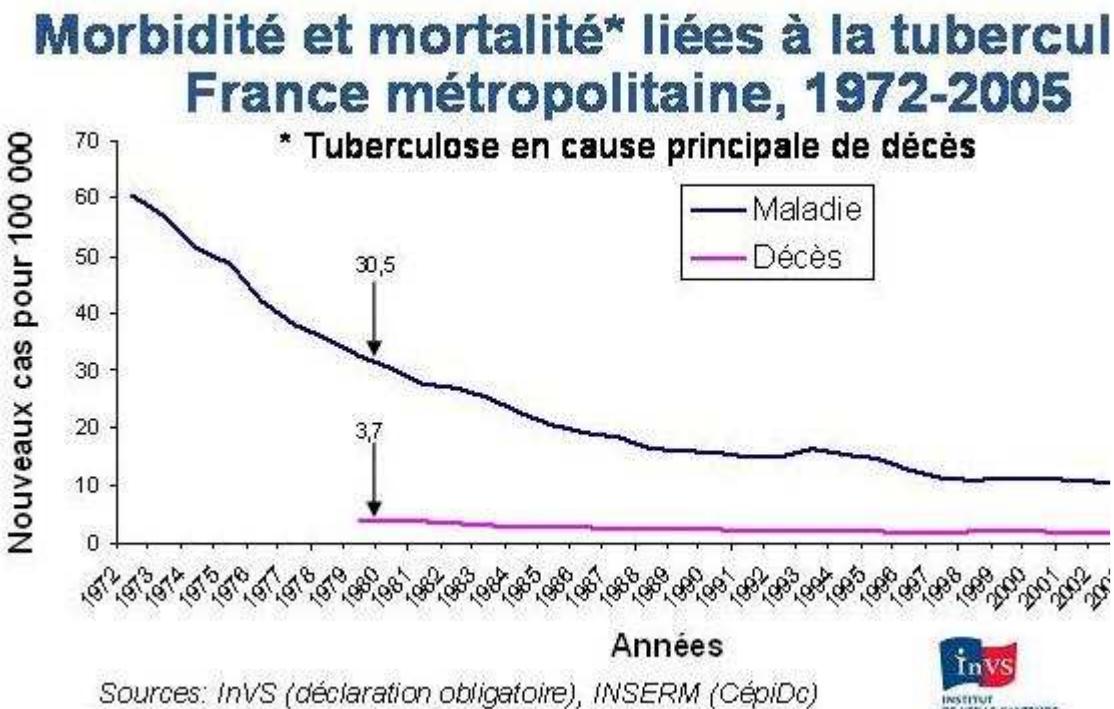
- primo-infection latente
- primo-infrction patente
- forme cavitaire commune
- pleurésie
- formes médiastinales
- forme miliaire

Les atteintes extra-pulmonaires sont plus rares : ganglionnaire, osseuse, articulaire, méningée, rénale, surrénale, digestive, génitale.

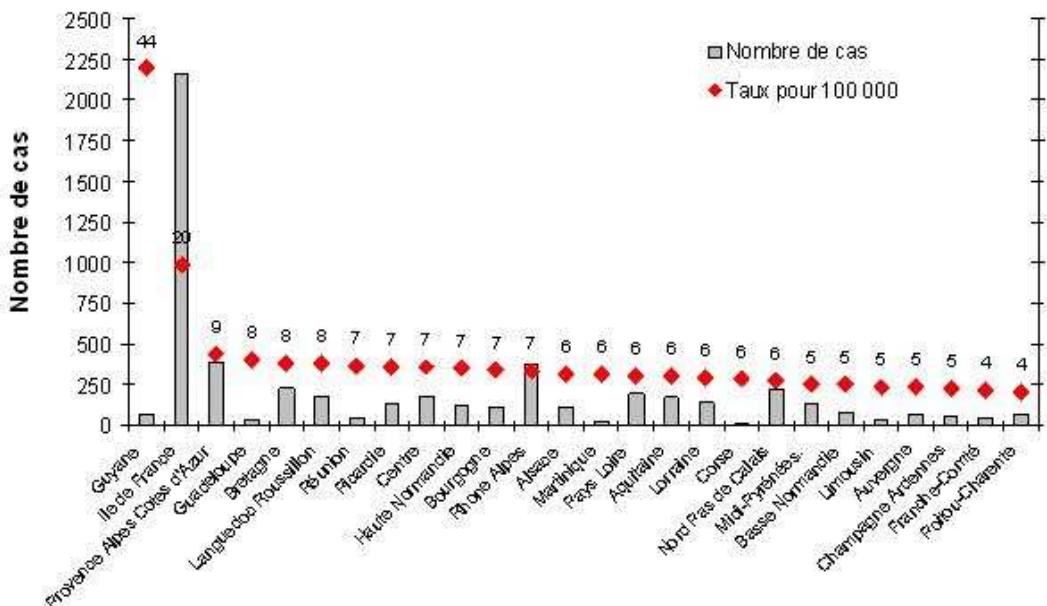
Il faut distinguer l'infection tuberculeuse démontrée par le virage spontané (hors BCG) de l'intradermo réaction (IDR) à la tuberculine de la tuberculose- maladie qui donne lieu à des manifestations pathologiques, cliniques ou radiologiques, pulmonaires ou extra- pulmonaires.

Épidémiologie

En France, l'incidence de la tuberculose décroît, mais le taux d'incidence global cache de fortes disparités régionales, l'Ile-de-France étant la plus touchée, comme le montrent les données épidémiologiques fournies par l'Institut National de veille Sanitaire (INVS).



Cas déclarés de tuberculose maladie par Région, 2005 (Nombre de cas et taux)



Source: InVS, déclaration obligatoire de tuberculose

Le nombre de souches polyrésistantes aux antibiotiques augmente et la tuberculose constitue encore actuellement en France un problème de santé publique alors qu'on avait espéré une éradication prochaine autour des années 1990.

Dans les pays en voie de développement, les statistiques concernant la surveillance épidémiologique sont moins bien établies mais les taux d'incidence estimés sont beaucoup plus élevés (jusqu'à 200/100.000), surtout dans les régions à forte prévalence d'infection par le VIH.

Tuberculose et VIH

La pandémie d'infections par le VIH a favorisé la recrudescence de la tuberculose. On constate que 16% des tuberculeux sont VIH+ et on estime que 8% de sujets VIH+ feront une tuberculose.

Si, après une primo-infection tuberculeuse, 3 à 5% des sujets développent, au cours de leur vie, une tuberculose maladie, cette proportion passe à 30% chez les sujets infectés par le VIH. La tuberculose survient souvent assez tôt et elle est alors la conséquence d'une réactivation endogène du BK dont le portage peut être ancien.

Lorsque l'infection tuberculeuse survient après l'infection par le VIH, le risque

d'évolution rapide vers la tuberculose-maladie est très augmenté.

La localisation de la maladie est souvent mixte, pulmonaire et extra-pulmonaire.

Chez les sujets atteints de sida, au stade plus tardif de l'infection, les mycobactérioses à mycobactéries atypiques (*Mycobacterium avium-intracellulare*) sont plus fréquentes.

Le traitement par antibiotique est efficace et la tuberculose est curable chez les sujets VIH+. Un traitement préventif par isoniazide est même préconisé dans les pays en voie de développement en particulier.

Pouvoir pathogène expérimental

Le cobaye est très sensible au BK et fait une tuberculose généralisée qui le tue ; le lapin guérit ; le singe en captivité est très sensible et ne résiste pas. Les bovidés ne sont pas réceptifs à *M. tuberculosis*.

Physiopathologie

La transmission est essentiellement interhumaine. La source de contamination est le tuberculeux pulmonaire dont l'expectoration est riche en mycobactéries. Amené par les gouttelettes de Pflügger, le BK est inhalé et vient se loger dans une alvéole où il est phagocyté par les macrophages. Certains restent sur place, d'autres sont véhiculés par voie lymphatique jusqu'aux relais ganglionnaires voisins. Ils se multiplient et devenus suffisamment abondants, suscitent une réponse immunitaire qui est à l'origine de la formation des tubercules ; lui fait suite la caséification qui correspond à une nécrose solide des tissus où les bactéries se sont développées. Lorsque le caséum se ramollit, la caverne se constitue dans le poumon et s'entoure d'une coque fibreuse la rendant difficilement accessible aux drogues antibacillaires. Une dissémination hématogène est éventuellement responsable de localisations extra-pulmonaires.

Pathogénie

Le BK ne produit pas de toxine et doit son pouvoir pathogène à sa capacité de se multiplier. La lyse des bactéries libère des constituants antigéniques qui suscitent une réaction immunitaire induisant un état d'hypersensibilité à l'origine de la transformation caséuse.

Allergie et Immunité. Phénomène de Koch

La sensibilisation aux produits du BK appelée **allergie tuberculinique**, est mise à profit à des fins diagnostiques (intradermo-réaction). Elle est révélée par le BK lui-même, vivant ou tué, mais aussi par ses produits protéiques constituant la tuberculine.

L'immunité n'est jamais totale et constitue plutôt un état de prémunition. Elle n'est induite que par des bactéries vivantes.

L'une et l'autre sont à médiation cellulaire. Les anticorps décelables chez les malades n'ont aucun rôle protecteur.

Le **phénomène de Koch** fournit une illustration expérimentale de cette particularité : l'inoculation de BK vivants à un cobaye sain provoque une tuberculose généralisée mortelle en trois mois. Si cette première inoculation est suivie, après quelques semaines, d'une deuxième dose, on voit apparaître, au point d'injection, une ulcération inflammatoire suivie d'une nécrose et d'une cicatrisation de la lésion. Cet effet est également obtenu si on injecte de la tuberculine.

Diagnostic biologique

Il repose sur la mise en évidence et l'identification du germe.

- ***Les prélèvements***

Ils doivent être répétés et effectués avant la mise en oeuvre du traitement. S'il s'agit d'une tuberculose pulmonaire, on prélève l'expectoration obtenue par un crachat ou par un tubage gastrique. On peut aussi obtenir les sécrétions bronchiques au cours d'une fibroscopie par aspiration, brossage ou lavage broncho-alvéolaire. S'il s'agit d'une tuberculose extra-pulmonaire, on recueille, suivant les cas, les liquides de ponction, les urines ou le pus.

- ***Méthodes classiques***

- **Examens optiques**

Recherche du BK au microscope après coloration de Ziehl ou coloration à l'auramine sur des étalements du produit pathologique effectués directement ou après homogénéisation.

Coloration de Ziehl-Neelsen : après action de la fuchsine à chaud (technique rapide) ou à froid (technique lente), on traite la préparation par l'acide nitrique puis par l'alcool. Tous les éléments non alcooloo-acido résistants sont alors décolorés. On surcolore le fond par le bleu de méthylène et les bacilles alcooloo-acido résistants (BAAR) apparaissent en rouge sur fond bleu.

Si on remplace la fuchsine par de l'auramine, qui est un composé fluorescent, les BAAR apparaissent, en lumière ultraviolette, brillants sur un fond sombre et sont de ce fait plus facilement détectables.

- **Culture**

Elle est indispensable. On ensemence le produit, éventuellement concentré et décontaminé (homogénéisation) sur milieu de Loewenstein.

- **Inoculation au cobaye** : méthode pratiquement abandonnée.

- **Identification**

Elle se fonde sur la morphologie, l'aspect des colonies et les caractéristiques biochimiques (niacine, nitrate réductase..)

	PIGMENT		CULTURE				NIAC	CATALASE		NIT
	P	S	R	E	36°C	42°C		22°C	70°C	
<i>tuberculosis</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>bovis</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>africanum</i>	-	-	-	-	+	-	V	+	-	-
BCG	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>kansasii</i>	+	-	-	+	+	-	-	++	+	-
<i>marinum</i>	+	-	+	-	F	-	V	++	F	-
<i>gordonae</i>	+	+	-	+	+	-	-	++	+	-
<i>xenopi</i>	+	+	-	+	+	+	-	++	+	-
<i>scrofulaceum</i>	+	+	-	+	+	-	-	++	+	-
<i>avium</i>	-	-	-	+	+	V	-	++	+	-
<i>ulcerans</i>	-	-	-	+	-	-	-	++	+	-
<i>fortuitum</i>	-	-	+	+	+	+	-	++	+	-
<i>smegmatis</i>	-	-	+	+	+	+	-	++	-	-

+ = test positif, - = test négatif, V = résultat variable, F = faiblement positif

P = photochromogène, S = scotochromogène, R = colonies R, E = colonies eugoniques, 36°C = culture à 36°C, 42°C = culture à 42°C, Niac = production d'acide nicotinique, 22°C - active à 22°C, 70°C = active à 70°C, NIT = réduction des nitrates en nitrites,

TCH = culture en présence d'acide thiophène 2 carboxylique.

- Antibiogramme

La résistance des BK aux antibiotiques est la conséquence de mutations. Il faut donc détecter, dans la population de bactéries infectant un malade, les mutants résistants à des concentrations d'antibiotiques voisines de celles obtenues *in vivo* au cours des traitements. Si la proportion de mutants résistants dépasse le taux de 1% , le traitement risque d'être inefficace.

- ***Autres techniques d'isolement et d'identification***

Le diagnostic biologique d'infection à mycobactéries nécessite donc de long délais. Ces dernières années, des méthodes rapides se sont développées.

- système biphasique

Il est composé d'un flacon de milieu liquide (7H) surmonté de lames de milieux solides. L'échantillon est introduit dans le flacon et après 48 heures, les milieux solides sont ensemencés par retournement. Le système détecte *Mycobacterium tuberculosis* en une vingtaine de jours.

- méthode respirométrique

La détection rapide de la croissance fondée sur la mesure du taux de CO₂ produit par le métabolisme bactérien en utilisant une méthode radiométrique ou photométrique se fait en une quinzaine de jours. Cette technique peut être utilisée pour réaliser les antibiogrammes.

- méthode chimique

Une méthode chromatographique analyse les acides mycoliques de la paroi dont le profil est caractéristique des différentes espèces.

- amplification par PCR

Directement applicable sur les prélèvements, cette méthode se réalise en plusieurs étapes : lyse des bactéries, extraction et dénaturation des ADN, amplification d'une séquence de l'ADN bactérien et révélation par hybridation avec une sonde marquée. La technique est très sensible et permet un diagnostic en quelques heures.

Des techniques rapides sont également utilisables pour identifier une souche isolée

- Hybridation de l'ADN et de l'ARN bactérien avec une sonde marquée
- Détection de l'acide tuberculostéarique par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse.
- ***Méthodes immunologiques***

La détection d'antigènes mycobactériens s'est révélée décevante à cause de nombreuses réactions croisées. L'amélioration des connaissances sur ces antigènes et la production d'anticorps monoclonaux plus spécifiques permettent d'espérer des performances améliorées.

La mise en évidence d'une allergie tuberculinique par des tests cutanés est connue et appliquée depuis longtemps. Elle détecte les sujets sensibilisés, malades ou non.

Le sérodiagnostic par hémagglutination passive mis au point en 1948 par Middlebrook et Dubos n'a guère été utilisé en raison de son manque de sensibilité et de spécificité. L'utilisation de préparations antigéniques purifiées n'ont amélioré ni la sensibilité ni la spécificité de la méthode : il n'y a pas de sérodiagnostic fiable de la tuberculose actuellement.

Traitemen

Le traitement de la tuberculose a été totalement transformé par l'apparition des antibiotiques. Les antituberculeux sont :

- Rifampicine
- Isoniazide
- Pyrazinamide
- Ethambutol

Pour éviter la sélection de mutants résistants, une polyantibiothérapie s'impose. Des préparations galéniques associant différents produits (rifampicine + isoniazide + pyrazinamide ou rifampicine + isoniazide) sont disponibles : elles diminuent le nombre de comprimés à prendre chaque jour.

Des schémas de traitement ambulatoires de six mois sont actuellement appliqués : trithérapie (isoniazide, rifampicine et pyrazinamide) pendant 2 mois suivie d'une bithérapie (isoniazide-rifampicine) de 4 mois.

Le repos et la cure sanitaire ne sont plus indiqués pas plus que l'arrêt de travail. Ils sont remplacés par une surveillance clinique, radiologique et bactériologique de l'efficacité du traitement. Une courte hospitalisation de quinze jours est souhaitable pour confirmer le diagnostic, commencer le traitement qui supprime le risque de contagion.

La primo-infection tuberculeuse symptomatique doit être traitée par une cure complète de 6 mois. La primo-infection asymptomatique est traitée chez l'enfant et l'adolescent mais pas chez l'adulte sauf contexte épidémiologique particulier.

En outre, la chimioprophylaxie est recommandée chez tout sujet en contact étroit avec un tuberculeux contagieux. Les modalités classiques de cette chimiothérapie comportent une monothérapie par INH pendant six mois.

L'écueil essentiel des traitements antituberculeux est la non-observance.

Les tuberculoses à BK multirésistants, encore rares en France, nécessitent évidemment des adaptations thérapeutiques.

B.C.G.

C'est une souche de ***Mycobacterium bovis*** repiquée par Calmette et Guérin sur pomme de terre biliée. Après 230 passages elle a perdu tout pouvoir pathogène pour les animaux et a été utilisée chez l'homme depuis 1921 comme vaccin antituberculeux.

Les recommandations concernant la vaccination ont été modifiées du fait de la régression de l'incidence globale de la tuberculose en France, mais de son augmentation dans les populations originaires d'un pays de forte endémie tuberculeuse : l'obligation vaccinale par le BCG a été levée en juillet 2007 mais le BCG reste fortement recommandé dès le premier mois de vie pour les enfants à risque, notamment ceux provenant d'un pays de forte endémie ou dont les parents sont originaires d'un tel pays. Une recommandation de vaccination généralisée des nourrissons est maintenue pour les régions à haut risque que sont l'Ile-de-France et la Guyane.

(voir le texte complet dans le B.E.H consacré au calendrier vaccinal 2007 :

http://www.invs.sante.fr/beh/2007/31_32/beh_31_32_2007.pdf)

Les colonies de B.C.G. apparaissent sur milieu de Loewenstein en deux à quatre semaines. Les colonies sont rugueuses, eugoniques mais plus étalées que celles du BK. En outre, des caractères biochimiques l'en différencient : pas de production de niacine, absence de nitrate réductase mais présence de catalase. A l'opposé du BK, le B.C.G.

résiste au pyrazinamide mais pas au TCH. Il est en outre résistant à la cyclosépine, ce qui le différencie de *Mycobacterium bovis*.

MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES

Ce sont des mycobactéries n'appartenant ni au "groupe tuberculosis" (*M. tuberculosis*, *africanum*, *bovis*, B.C.G.) ni à l'espèce *leprae*. Elles sont présentes dans l'environnement et chez les animaux et se comportent chez l'homme comme des opportunistes. Elles sont la cause de **mycobactérioses**.

Pouvoir pathogène

Les mycobactéries atypiques sont responsables de pathologies variées, pulmonaires, cutanées, ganglionnaires, septicémiques selon les espèces en cause.

espèces	infections...
<i>kansasii</i>	respiratoires
<i>xenopi</i>	respiratoires
<i>avium intracellulare</i>	disséminées (associées au SIDA)
<i>scrofulaceum</i>	ganglionnaires
<i>marinum</i>	cutanées
<i>fortuitum et chelonei</i>	cutanées
<i>ulcerans</i>	ulcération dermo-nécrotiques (pays tropicaux)

Les mycobactéries atypiques occasionnent des surinfections chez les malades atteints de sida avéré aux stades tardifs. (contrairement à *M. tuberculosis*)

Diagnostic biologique

Il se fonde sur la mise en évidence de la bactérie (alcoolo-acido résistance et culture) et son identification d'après la morphologie et l'aspect des cultures et surtout d'après les caractères biochimiques décrits plus haut.

Des sondes géniques permettent l'identification rapide de certaines espèces (*gordonae* et *avium-itracellulare*)

Les résultats doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique car ces bactéries sont des opportunistes et leur isolement peut être le fait d'une simple contamination.

Traitemen

Les mycobactéries atypiques sont souvent plus résistantes aux antituberculeux que *M. tuberculosis* mais certains antibiotiques non spécifiques ou sulfamides peuvent être

actifs. La sélection facile de mutants polyrésistants impose, dans tous les cas, une polychimiothérapie éclairée par les données de l'antibiogramme.

CHLAMYDIA

Successivement dénommés *Chlamydozoa* quand on les croyait apparentés aux protozoaires puis *Bedsoniae*, en hommage à Bedson qui avait mené une importante étude sur la psittacose, puis *Miyagawanella*, suite aux travaux de Miyagawa sur la lymphogranulomatose vénérienne, ces agents sont maintenant classés dans l'ordre des Chlamydiales, famille des *Chlamydiaceae*, et forment le genre *Chlamydia* qui comprend trois espèces : *psittaci*, *pneumoniae* et *trachomatis*, elles-mêmes divisées en sérovars et biovars responsables d'infections spécifiques.

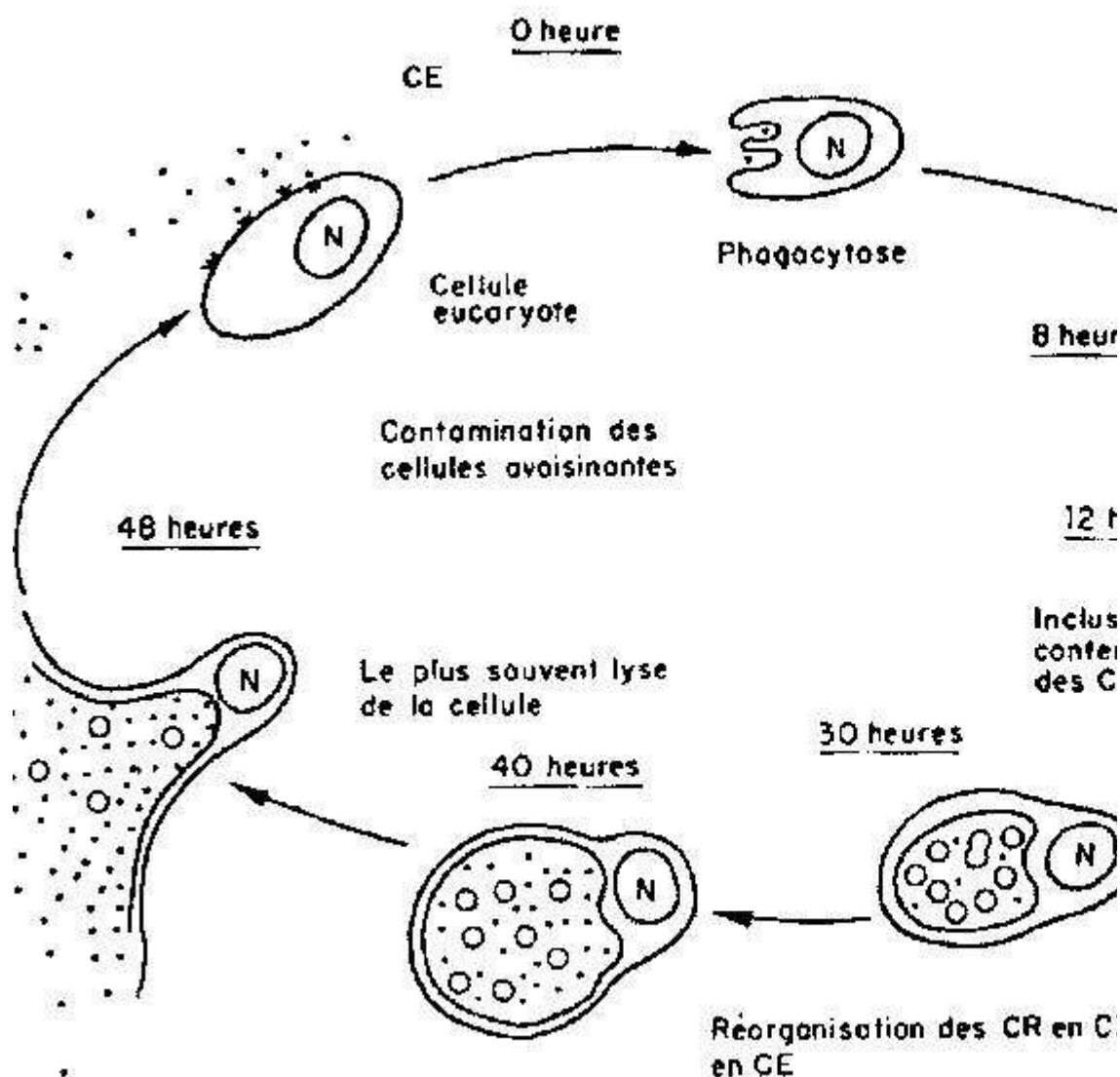
TAXONOMIE

Ordre	Chlamydiales				
Famille	Chlamydiaceae				
Genre	<i>Chlamydia</i>			<i>Chlamydophila</i>	
Espèces	<i>trachomatis</i>			<i>psittaci</i>	<i>pneumoniae</i>
Types	A, B, C	D à K	L1, L2, L3	1, 1A, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 11A	<i>biovar TWAR</i>
Habitat	homme			animal et homme	homme
Pathologies	Trachome	MST	LGV	Psittacose	Inf. respiratoires
Transmission	oculaire	génitale		respiratoire	

Ce sont des bactéries de petite taille, (0.2 micromètre) parasites cellulaires obligatoires, possédant ADN et ARN, dont la paroi, mince, ressemble à celle des bactéries à Gram négatif.

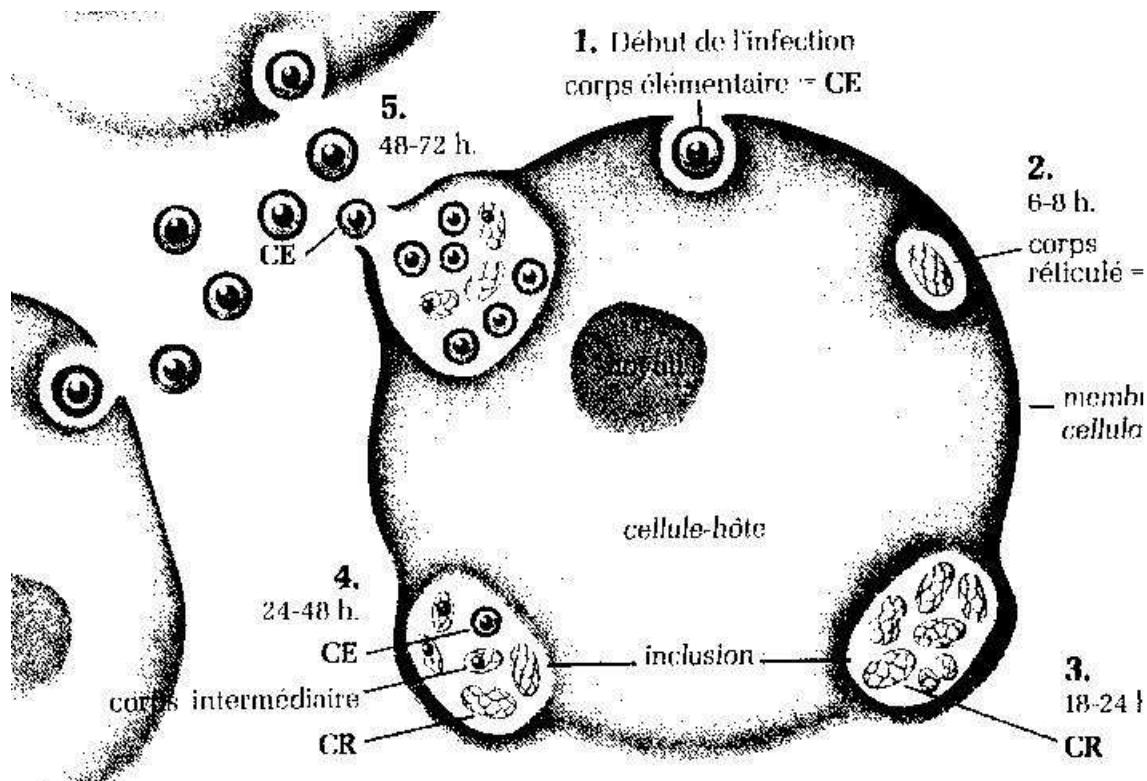
CYCLE DE DEVELOPPEMENT

Leur cycle de développement les différencie de tous les autres procaryotes ; il se déroule dans la cellule à l'intérieur d'une vacuole dérivée d'une invagination de la membrane cellulaire.



Les *chlamydiae* pénètrent dans la cellule par phagocytose sous forme de **corps élémentaires** de 0,2 micromètre et sont englobés dans une vacuole dans laquelle ils se transforment en **corps intermédiaires** puis en **corps réticulés** (0,8 à 1 µm). Ils se multiplient par division binaire; la vacuole augmente de taille et devient une grande inclusion basophile. Après 4 à 5 divisions, les corps réticulés subissent une maturation en corps intermédiaires puis en nouveaux corps élémentaires. L'inclusion finit, après un délai de 48 à 72 heures, par éclater en lysant la cellule hôte et en libérant des corps élémentaires qui parasitent de nouvelles cellules.

Les corps élémentaires sont la forme virulente mais leur pouvoir infectieux diminue sitôt l'entrée dans la cellule et devient nul pour les corps réticulés.



STRUCTURE ANTIGENIQUE

La paroi contient plusieurs structures antigéniques.

- un **antigène de genre**, thermostable, de structure lipopolysaccharidique (LPS) très proche de celle du LPS des bactéries à Gram négatif. Il est présent à tous les stades de développement et commun aux trois espèces ; il est extractible et utilisable en réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la lymphogranulomatose vénérienne et de l'ornithose-psittacose qui sont des affections provoquant une forte réponse anticorps décelable par cette réaction peu sensible;
- un **antigène spécifique d'espèces**, protéique, correspondant à la "protéine majeure de la membrane externe" (PMME) thermolabile, présent à tous les stades du développement et différents selon les espèces.
- des **antigènes spécifiques de types**, protéiques, qui caractérisent les différents sérotypes : 15 pour l'espèce *trachomatis*, 13 pour *psittaci*, (un seul pour *pneumoniae*.)

Les anticorps dirigés contre ces différents antigènes sont décelables par réaction d'immunofluorescence indirecte, par technique ELISA ou par Western blot. Ils n'ont guère de pouvoir protecteur

HABITAT ET POUVOIR PATHOGENE

■ *Chlamydia trachomatis*

C'est un pathogène presqu'exclusif de l'homme.

Quatre sérotypes (A,B,Ba,C) sont responsables du trachome, infection conjonctivale sévissant dans les pays en voie de développement.

Huit sérotypes (D à K) sont en cause dans des "maladies sexuellement transmises" (**M.S.T.** fréquentes et souvent asymptomatiques) :

- Localisations basses
 - urétrites non spécifiques et post gonococciques, épididymites chez l'homme ;
 - cervicites et urétrites chez la femme.
- Localisations hautes
 - prostatite
 - salpingite aiguë ou chronique, stérilité tubaire
- Localisation extra-génitales
 - conjonctivites folliculaires.
 - syndrome de Fiessenger-Leroy-Reiter associant conjonctivite, urétrite et atteinte articulaire.
 - conjonctivite à inclusions, pneumonie, rhinite ou otite chez le nouveau-né, contaminé au moment de l'accouchement.

Trois sérotypes L1, L2 et L3 sont les agents étiologiques de la lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas-Favre.

■ ***Chlamydia psittaci***

Il est répandu dans le monde animal (oiseaux, bovins et ovins). l'homme n'étant qu'un hôte occasionnel.

La psittacose désigne la maladie des perroquets, perruches et serins ainsi que la maladie humaine ; le terme "ornithose" concerne les maladies des oiseaux sauvages ou de basse cour.

La psittacose humaine donne lieu à une bronchopneumonie.

■ ***Chlamydia pneumoniae* (voir plus loin, paragraphe spécial)**

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

■ ***Chlamydia trachomatis***

En raison du site intracellulaire de la bactérie, il est indispensable que le prélèvement contienne des cellules : il faut donc procéder à un raclage doux de la muqueuse.

On peut tenter de mettre en évidence *C.trachomatis* dans les cellules atteintes par un examen microscopique. On observe le frottis après coloration de Giemsa ou coloration à

l'iode (car les inclusions contiennent du glycogène) pour y déceler des cellules contenant des inclusions qui déforment le noyau. Les techniques plus récentes d'immunofluorescence directe, utilisant un anticorps monoclonal anti *C.trachomatis* marqué, permettent d'observer les corps élémentaires.

L'isolement sur culture cellulaire est la méthode la plus fiable ; elle s'effectue sur cellules Mac Coy ou Hela. Le prélèvement doit être introduit dans un milieu spécial pour *Chlamydia* ou congelé à -70°C s'il ne peut être inoculé immédiatement. Il est dilué dans un milieu contenant un aminoside et centrifugé. Après 72 heures, on observe au microscope les cellules colorées par le Giemsa, l'iode ou en immunofluorescence directe après traitement par un monoclonal.

Les techniques de biologie moléculaire sont plus sensibles. Les procédés disponibles sont soit l'hybridation ADN/ARN détectée par chemiluminescence, soit la polymerase chain reaction (PCR)

Le diagnostic sérologique est d'un grand secours car l'observation directe n'est pas très sensible et la culture pas toujours réalisable.

L'antigène est constitué de cellules infectées ou de corps élémentaires obtenus par culture de *Chlamydia* dans les sac vitellin de l'oeuf de poule embryonné.

Les méthodes utilisables sont l'immunofluorescence indirecte ou l'immunoenzymologie. Sont significatifs des titres > 16 chez l'homme et > 64 chez la femme ; la présence d'IgM signe une infection récente mais elle est souvent fugace. Une séroconversion ou une nette ascension du taux des anticorps a la même signification.

La présence d'anticorps de classe IgA fait suspecter une infection active et haute.

L'exploration de l'immunité cellulaire par le test de transformation lymphoblastique est possible mais peu utilisée.

L'intradermo réaction à l'antigène dde Frei a été utilisée pour le diagnostic de la maladie de Nicolas-Favre.

■ *Chlamydia psittaci*

La réaction de fixation du complément utilisant l'antigène de groupe donne des résultats interprétables dans l'infection humaine à *C. psittaci*.

TRAITEMENT

Rifampicine, cyclines, macrolides et fluoroquinolones sont actifs ; les sulfamides sont actifs sur *C. trachomatis* mais sans effet sur *C. psittaci*.

Toutefois les formes intracellulaires sont beaucoup plus résistantes et ceci impose des traitements prolongés.

- Dans les infections oculaires, on utilise des tétracyclines en applications locales et par voie générale. Il faut traiter le trachome pendant 4 à 8 semaines.
- Dans les conjonctivites à inclusions de l'adulte, on peut utiliser un collyre à la rifampicine.
- Les infections génitales sont traitées, pendant quinze jours au moins, par oxytétracycline, doxycycline ou minocycline sans omettre de traiter le partenaire.
- Chez le nouveau né ou la femme enceinte on utilise les macrolides.

CHLAMYDIA PNEUMONIAE

L'individualité de cette nouvelle espèce, d'abord isolée sur des critères antigéniques, a été confirmée par des données de la biologie moléculaire.

MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES

On peut être infecté à tous les âges de la vie mais la maladie paraît plus grave chez l'adulte et le sujet âgé.

Tous les étages de l'appareil respiratoire peuvent être successivement ou isolément atteints : sinus, pharynx, larynx, donnant lieu à une raucicité de la voie qui est fréquemment observée - mais aussi bronches et parenchyme pulmonaire donnant un tableau de pneumonie atypique.

EPIDEMIOLOGIE

La prévalence élevée (50% chez l'adolescent) des anticorps dans la population laisse supposer que *C. pneumoniae* est un germe très largement répandu. C'est un pathogène strictement humain dont la transmission est directe, interhumaine et se fait par voie respiratoire.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Il se fonde sur l'isolement de la bactérie par culture sur oeuf embryonné, ou sur cultures cellulaires (sur lesquelles l'isolement est *C. pneumoniae* n'est parfois pas réussi). L'effet cytopathogène se manifeste sous forme de petites inclusions rondes caractéristiques.

La mise en évidence d'anticorps sériques met en jeu diverses techniques sérologiques (immunofluorescence, ELISA).

Les techniques de biologie moléculaire - hybridation ou PCR - seront sans doute essayées dans un proche avenir.

TRAITEMENT

Macrolides et cyclines sont actifs sur *Chlamydia pneumoniae*.

MYCOPLASMES

Les mycoplasmes sont des procaryotes dépourvus de paroi. Ils sont largement répandus dans la nature, chez l'animal, les insectes et les plantes. Chez l'homme, la plupart des espèces qu'on isole sont commensales ou occasionnellement pathogènes.

TAXONOMIE

asse	Mollicutes			
ordre	Mycoplasmatales			
mille	Mycoplasmataceae	Acholeplasmataceae	Spiroplasmataceae	
enre	<i>Mycoplasma</i>	<i>Ureaplasma</i>	<i>Acholeplasma</i>	<i>Spiroplasma</i>
o pèces	50	1	6	1
abitat	homme, animaux	homme, animaux	animaux	insectes, plant

Deux genres, *Anaeroplasma* et *Thermoplasma*, ne sont pas classés.

CHEZ L'HOMME

On ne rencontre chez l'homme que les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*, qui sont isolés de deux sites principaux :

*Arbre respiratoire : on y trouve *Mycoplasma pneumoniae*, qui n'est pas un commensal, ainsi que *Mycoplasma orale* et *salivarium*.

*Voies génitales : on y rencontre *Ureaplasma* et *Mycoplasma genitalium, hominis* et *fermentans*.

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi, de petite taille (300 nm) et, de ce fait, non perceptibles au microscope optique. Le cytoplasme contient un génome très court et des ribosomes. La membrane en trois feuillets contient des lipides en grande quantité, des glucides, des glycolipides et des protéines.

La culture en atmosphère microaérophile est lente mais possible sur des milieux acellulaires pourvu qu'ils contiennent du cholestérol et des extraits de levure, précurseurs pour la synthèse d'acides nucléiques. Les colonies, très petites, apparaissent en plusieurs jours et doivent être observées au microscope inversé ou à la loupe. Elles ont une allure caractéristique "**en oeuf sur le plat**".

In vivo, les mycoplasmes se multiplient en dehors des cellules mais adhèrent à leur surface. Ils sont sensibles à l'environnement (pH, température, agents tensioactifs, pression osmotique).

Fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine ou de l'urée sont des caractères métaboliques utiles à l'identification bactériologique.

Les mycoplasmes possèdent des antigènes spécifiques de groupes d'espèces

POUVOIR PATHOGÈNE

Mycoplasma pneumoniae est responsable chez l'homme de la "pneumonie atypique" (Eaton). Elle sévit à tout âge mais plus encore chez l'enfant et l'adulte jeune.

- Le début est progressif après une incubation assez longue de 15 à 20 jours. La maladie se manifeste par de la fièvre, un malaise, des céphalées, des myalgies et rachialgies et surtout une toux sèche et opiniâtre. L'état général est peu altéré. L'examen physique est pauvre en symptômes mais les images radiologiques impressionnantes. L'évolution est en règle lentement régressive mais la convalescence est longue et la toux persistante.
- Des complications et localisations extra-pulmonaires sont possibles : pleurésie, éruptions cutanées, sinusites, myocardites, péricardites, atteintes articulaires, anémie hémolytique, manifestations nerveuses, infections génitales.

Les Mycoplasmes génitaux sont souvent des commensaux.

- Chez l'homme, ils sont peut-être la cause d'urétrites non gonococciques, plus rarement de prostatites et d'épididymites. Leur adhésion aux spermatozoïdes serait responsable de stérilité.
- Chez la femme, on les isole dans des cas de vaginites, cervicites, salpingites mais il n'est pas toujours certain qu'ils soient responsables des troubles ; leur découverte ne doit pas masquer une éventuelle infection à *Chlamydia*. Ils sont également incriminés dans des cas de fièvre du post-partum, d'infections urinaires ou pelviennes.
- Une contamination du nouveau-né lors de l'accouchement est possible et donne lieu à une infection néonatale. Si la contamination survient pendant la grossesse, il y a risque d'avortement ou d'hypotrophie de l'enfant.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Du fait de l'adhérence des mycoplasmes, les prélèvements doivent ramener des cellules. Les brossages bronchiques ou lavages broncho-alvéolaires, les produits de grattage des muqueuses ou les liquides biologiques centrifugés conviennent beaucoup mieux que les prélèvements sur écouvillons.

Le diagnostic microscopique direct est impossible. On peut cependant rechercher, avec des chances de succès, les antigènes par des techniques immunologiques : immunofluorescence directe, immunoenzymologie ou immunoprécipitation.

La culture des mycoplasmes, qui prend plusieurs jours, nécessite des milieux spéciaux et un protocole rigoureux. L'identification se fonde sur la morphologie des colonies et sur les propriétés métaboliques.

Le diagnostic sérologique est essentiel dans les infections à *Mycoplasma pneumoniae*.

Les anticorps spécifiques sont révélés par diverses techniques : immunofluorescence, ELISA ou immunoblotting. Ascension de la concentration des anticorps entre deux sérum prélevés à 15 jours d'intervalle ou présence d'IgM spécifiques témoignent d'une infection récente.

La présence d'un taux élevé d'agglutinines froides est parfois constatée dans les infections à *Mycoplasma pneumoniae* mais elle n'est ni constante ni caractéristique.

TRAITEMENT

Les mycoplasmes sont insensibles aux bétalactamines ; il faut utiliser les **macrolides** ou les **cyclines**.

Quelques définitions...

ANTHROPONOSE

- maladie infectieuse propre à l'homme (gonococcie, syphilis, fièvre typhoïde, coqueluche)

ANTHROPOZOONOSE

- maladie infectieuse commune à l'homme et à l'animal (listériose, brucellose)

CONTAMINATION

- (cum = avec, taminare = souiller)
- présence de micro-organismes sur (ou dans) un objet, une substance, un organisme vivant qui, normalement, ne devraient pas s'y trouver.

INFECTION OPPORTUNISTE

- infection liée au développement d'un microbe opportuniste

INFECTION RECURRENTE

- (qui revient en arrière)
- reprise d'une maladie apparemment guérie sans nouveau contact pathogène (herpès, zona).
- L'emploi de ce terme implique une délai beaucoup plus long (plusieurs mois, plusieurs semaines) que la rechute

RECHUTE

- reprise d'une maladie qui était en voie de guérison

INFECTION RÉCIDIVANTE

- nouvelle manifestation d'une maladie infectieuse antérieurement guérie

(furoncles staphylococciques).

MICROBE PATHOGENE

- se dit d'un microbe apte à provoquer des troubles dans un organisme soit par virulence, soit par toxinogenèse
- Il existe des pathogènes stricts (*S. typhi*, *Tr. pallidum*), des pathogènes occasionnels (*St. aureus*), des "pathogènes" opportunistes.

TOXINOGENESE

- capacité de produire une toxine.

ZOONOSE

- (zōon = animal, nosos = maladie)
- Maladie infectieuse propre aux animaux (Maladie de Carré, Choléra des poules)

TOXI-INFECTION

- Maladie infectieuse liée à la multiplication d'un microbe et à l'effet de la (ou des) toxine(s) qu'il sécrète
- exemples : diptéries, toxi-infections alimentaires

INTOXICATION

- Troubles provoqué par une toxine ou toute autre substance nocive.
- En pathologie infectieuse, le terme s'applique surtout lorsque la toxine est une exotoxine.
- exemple : tétonos.

INTOXINATION

- néologisme parfois utilisé pour désigner une intoxication sans infection.
- exemple : botulisme.

ÉPIDÉMIE

- maladie infectieuse qui atteint en même temps un grand nombre d'individus et se propage par contagion.
- exemple : peste, choléra.
- Une épidémie est limitée dans le temps et dans l'espace.

ENDÉMIE

- maladie infectieuse persistante dans une collectivité ou une région déterminée.
- exemple : le paludisme

PANDÉMIE

- épidémie mondiale
- exemple : la grippe.

ANADÉMIE

- maladie épidémique non contagieuse qui atteint simultanément plusieurs membres d'une collectivité qui s'infectent à la même source.
- exemple : légionellose

CONTAGION

Transmission directe (les gouttelettes de Pflügge) ou indirecte (le manu-portage) d'une maladie d'un sujet atteint à un sujet sain.

Les Virus

définition :

Parasite intracellulaire obligatoire ne pouvant se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte et utilisant sa machinerie cellulaire.

Il contient :

- Une **information génétique** sous forme d'ADN ou d'ARN
- Une structure de protection souvent protéique, compacte, pour protéger son Acide Nucléique
: **La Capside**

On peut ainsi classer les virus en 2 catégories :
les virus possédant une capsidé à symétrie icosaédrique (ou encore hexagonale)
les virus possédant une capsidé à symétrie hélicoïdale (comme le virus de la mosaïque du tabac).

Le virus prend le pouvoir dans la cellule infectée: tous les systèmes de la cellule sont canalisés pour fabriquer du virus.

Historique

1900-1935 : Hypothèse des agents ultrafiltrants

1935 : Stanley: Purification du virus de la mosaïque du tabac (VMT)

1936 : Découverte de particules virales sous forme de bâtonnets allongés

1941 : Des travaux de radio-cristallographie montrent que ce virus sont constitués par l'assemblage régulier de sous-unités identiques

1947 : Shramm décrit la dissociation du VMT en une protéine et un ARN

1952 : Harris et Knight montrent que le VMT est constitué par l'assemblage de sous-unités de poids moléculaire égale à 17300 Da

1954 : Démonstration de la symétrie hélicoïdale par Watson

1955 : Fraenkel-Conrat réussit à reconstituer des Virus infectieux en mélangeant protéines et ARN purifiée

1956 : Fraenkel-Conrat démontrent le pouvoir infectueux de l'ARN isolé

1977: Éradication officielle de la variole selon l'organisation mondiale de la santé grâce à la vaccination basée sur la découverte de Jenner (1796)

Années 80: Découverte du virus d'immunodéficience humaine par Gallo et Montagnier.

CAPSIDE et ENVELOPPE

1. La Capside

La Capside est une structure qui protège le génome du virus (génome qui est souvent de petite taille). Le virus utilise un nombre de gène minimale pour constituer cette capsidé formée de briques identiques, les protéines de capsidé.

Il existe 2 grands types de structures de capsidé:
les virus à **structure hélicoïdale** et les **virus à structure icosaédrique** (cubique).

a. Structure à symétrie hélicoïdale

On peut définir un virus à symétrie hélicoïdale par 5 paramètres:

- Le nombre de sous-unités protéiques par tour
- Le pas de l'hélice
- L'angle α (angle formé entre l'axe central de la capsidé et le barycentre de 2 sous-unités)
- le nombre d (distance entre 2 sous-unités)
- la longueur de l'hélice

Un bon exemple de virus possédant ce type de structure est le Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV)

b. Structure à symétrie icosaédrique

Les capsides à symétrie icosaédrique sont formés de sous-unités formant un réseau hexagonal composé de 20 faces et de 12 sommets (structure en icosaèdre) et 3 axes de symétrie par rotation..

Un bon exemple de ce type de virus sont les adénovirus:

- Nombre de triangulation : 25
 - 60T sous-unités : $25 \times 60 = 1500$ (60: 20 sommets * 3 sous-unités par triangulation)
 - 12 pentons
 - 60 sous-unités (12 pentons * 5)
 - 240 hexons ($1500 - 60$) / 6 (un hexon regroupe 6 sous-unités)
- => Nombre totale de capsomères: 252 (240 hexons + 12 pentons)

c. Structure combinée

Il existe en plus de ces 2 catégories une symétrie combinée (cf. phage T4)

d. Fonction de la capsidé

La capsidé protège le virion lorsque celui-ci se trouve à l'extérieur. Pour les virus nus (sans enveloppe), c'est elle qui porte les déterminants viraux qui se lient

spécifiquement à des récepteurs cellulaires.

2. L'enveloppe

La capsid de certain virus peut être entourée d'une enveloppe de même nature lipidique que les cellules infectées.

Cette enveloppe porte alors les déterminants viraux (glycoprotéines...) qui se lient aux récepteurs cellulaires de manière spécifique.

Après fixation aux récepteurs de la membrane cellulaire, l'enveloppe peut fusionner avec cette membrane et permettre l'introduction du nucléocapsid dans la cellule (ex: le virus HIV).

Il est important de noté que le caractère enveloppé d'un virus lui confère une certaine fragilité.

Les différents types d'acide nucléiques retrouvés chez les virus

En gros il faut savoir qu'il existe des virus à:

-ADN double brin (+/-) linéaire

- ADN db circulaire (rare)
- ADN sb + (rare)
- ADN sb - (rare)
- ARN sb +**
- ARN sb -**
- ARN sb +/- (rare)

NB:

-Virus à ARN + :

Virus dont l'ARN peut être immédiatement traduit par les ribosomes en protéines virales qui assurent la réPLICATION du génome virale et la synthèse des protéines de capsid.

-Virus à ARN - :

Virus dont le génome (ARN) doit être préalablement transcrit en ARN + (ARNm) par une polymérase virale

- **Classification des Virus**

On peut classer les virus suivant plusieurs classification

Reliquats de cette classification	
Classement basé sur les symptômes provoqués	Les Virus des hépatites (inflammation du foie)
Classement basé sur les caractères épidémiologique	les arbovirus (regroupe 5 familles de virus différentes)
Classement basé sur les anomalies cytologiques dont ils sont responsables	
De 1941 à 1962, mise au point d'un système de classification basé sur les caractéristiques structurales des virus.	

-Classification de Lwoff Horne et Tournier

Cette classification comporte **4 critères essentiels**:

- La Nature du matériel génétique c'est à dire le **type d'Acides nucléiques** (ARN+ ou -, ADN db ou sb...).
- Le type de **symétrie de la capsidé** (cubique ou hélicoïdale)
- Le caractère **nu** (ne possédant pas d'enveloppe) ou **enveloppé** (possédant une enveloppe autour de la capsidé)
- **Les caractéristiques morphologiques** du virion:
 - .Le nombre de capsomères et le diamètre de la particule virale pour les virus à symétrie cubique.
 - .La longueur et l'épaisseur des nucléocapsides pour les virus à symétrie hélicoïdale.

- **Transmission des Virus et cycle de multiplication**

Le cycle de multiplication d'un virus peut se décomposer en 4 étapes:

- L'attachement**
- La pénétration avec ou sans décapsidation**
- La réplication**
- La libération**

1. **L'attachement**

L'attachement du virus à sa cellule cible peut s'opérer de 3 manières différentes selon le type de virus:

- : un même récepteur peut être exprimé sur différents types cellulaires
- Différentes parties d'un même anti-récepteur peuvent reconnaître différents récepteur
- et □ : la fixation du virus peut-être indirecte, médiée soit par les anticorps soit par les anticorps associés à des fractions du complément.

ex : le virus de la Dengue, VIH

NB : rappel de quelques notions :

-Un récepteur est une structure cellulaire où se fixe la cellule : ex : le CD4 du LT pour le virus VIH

la structure virale se fixant sur le récepteur est l'anti-récepteur

-Dans certains cas (□ et □) le virus pénètre dans la cellule par l'intermédiaire d'une fixation Ig-antirécepteur viral.

Ceci explique le fait que certains virus infectent certaines espèces et pas d'autres (notion de barrière d'espèce).

2. La pénétration / décapsidation

-Pénétration du virus dans la cellule hôte:

On peut considérer qu'il existe **3 voies possibles de pénétration** du virus dans la cellule hôte:

-Pénétration par **translocation**

-Pénétration par **endocytose** (différentes selon que le **virus** soit **nu**, c'est à dire sans enveloppe, **ou enveloppé**)

-Pénétration par **fusion/lyse** (le virus fusionne sa membrane avec celle de la cellule hôte et expulse à l'intérieur du cytoplasme cellulaire sa capsid (décapsidation partielle) .

-Décapsidation du virus:

Comme on le voit sur le schéma, **la décapsidation peut s'effectuer dans le cytoplasme ou au niveau des pores nucléaires, être complète** (c'est le cas pour la majorité des virus) **ou partielle** (chez les rotavirus) .

Le phénomène de décapsidation peut être

- un **phénomène passif lié à la cellule** (dégradation de la capsid par des enzymes protéolytiques) .

-un **phénomène où le virus prend une part active** dans sa propre décapsidation en utilisant des décapsidases.

3. La réPLICATION

Au sein de la cellule, le virus a deux objectifs :

-Synthétiser ses protéines virales

-Amplifier son génome

A ces 2 objectifs, la cellule impose des contraintes

-L'acide nucléique viral doit comprendre l'information nécessaire à la synthèse des composants structuraux et non structuraux

-Cette synthèse doit être entièrement réalisée par la machinerie traductionnelle de la cellule (les ribosomes utilisés sont nécessairement d'origine cellulaire).

-L'information génétique fournie par le virus à cette machinerie (ARNm) doit être conforme aux contraintes liées à la traduction chez les eucaryotes, à savoir:

.que les ARNm soient de polarité positive

.que les ARNm soient nécessairement monocistroniques (1 ARNm = 1 polypeptide)

Selon le type de virus (virus à ADN, à ARN + ...) la réPLICATION se fait de manière différente:

-Les Virus à ADN : leur réPLICATION se calque sur celle de l'ADN cellulaire

-Les Virus à ARN :

Les virus à ARN sont l'unique exemple d'organismes dont le génome est constitué d'ARN.

Il requièrent pour leurs réPLICATION une **ARN polymérase ARN-dépendante**.

La plupart des virus à ARN animaux se multiplient sur cellules anucléées ou en présence d'actinomycine D (sauf les Myxoviridae, les Bunyaviridae et les retrovirus) .

On distinguera:

-les virus dont l'**ARN génomique est codant** (ARNg = ARNm) : ex: les phages à ARN, les piconavirus, les togavirus) .

Par convention, on les note **ARN+**

-les virus dont l'**ARN génomique est non codant** (ARNg -> ARNm) : ex: les Orthomyxovirus, les paramyxovirus, les rhabdovirus, les réovirus.

Par convention, on les note **ARN-**.

RéPLICATION de ces virus:

-L'**ARN des virus à ARN+** (dont l'ARN code directement pour les protéines) est transcrit directement par les ribosomes cellulaires pour donner des protéines dont l'**ARN polymérase ARN-dépendante** et les protéines de structure.

-Les virus à ARN- possède une protéine réPLICASE déjà élaboré qui permet de réPLiquer l'ARN- en ARN+, permettant ainsi une transcription du génome virale .

Effets cytopathiques de la réPLICATION des virus animaux :

Certains virus animaux peuvent induire des effets cytopathiques sur les cellules infectées:

-Vacuolisation

-Arrondissement et décollement des cellules (comme si elles étaient Trypsinées)

-Non absorption des colorants vitaux (Bleu de Trypan et rouge neutre)

-Inclusion virale

-Manifestation apoptotique

Lorsque des virus induisent de tels effets, ils sont qualifiés de cytopathogène.

4. La libération du virus

On peut considérer qu'il existe **3 possibilités de libération:**

-La **lyse cellulaire** qui induit souvent un relargage de milliers de particules virales.

-Une libération par **bourgeonnement cytoplasmique** : la membrane cellulaire est ensuite remaniée, des protéines virales s'y insèrrent.

-Une libération par **bourgeonnement nucléaire** (la membrane du virus sera issue de la membrane nucléaire).

Trois critères sont donc déterminants dans les modalités de réPLICATION du virus:

- .La polarité de l'ARN (+ ou -)
- .La segmentation
- .Le fait que l'ARN soit simple ou double brin.

- **Multiplication d'un virus chez un individu**

Virus et hôte

Les différentes portes d'entrées des virus dans l'organisme

Pour infecter un organisme comme l'être humain, les virus disposent de plusieurs portes d'entrée potentielles:

- l'oeil
- l'oropharynx (bouche et nez)
- le système respiratoire
- la peau
- le système digestif
- le système urogénital.

-Porte d'entrée : la peau

Le virus peut y pénétrer:

- . lorsque celle-ci a subi une ou des lésions mineures (ex. Des papillomavirus, du virus de l'hépatite B, du HSV ou du Poxyviridae).
- . lorsque celle-ci a subi une ou des lésions majeures comme des morsures ou des injections (ex. du virus de la rage, de l'hépatite B, du HIV, du CMV ou de l'EBV).
- . lors d'une piqûre par un arthropode (ex. des arbovirus).

-Porte d'entrée : le système respiratoire

Infections virales s'accompagnant de symptômes respiratoires locaux	Infections virales généralisées généralement sans symptômes respiratoires locaux
-Virus respiratoire -HSV -CMV -EBV	-Rubéole -Rougeole -Oreillons -Varicelle -Variole

-Porte d'entrée : le système digestif

Bouche - Oropharynx	Tractus intestinale
-HSV	-Entérovirus
-CMV	-Virus des gastro-entérites
-EBV	-Adénovirus

1. La diffusion du virus dans l'organisme

-Diffusion locale dans les surfaces épithéliales

Le virus ne traverse pas les cellules épithéliales: c'est une diffusion locale.

-Diffusion lymphatique

Le virus passe au travers des cellules épithéliales et est ensuite drainé par le système lymphatique (ce qui provoque une virémie) à travers tout le corps jusqu'à ses cellules cibles.

Les virus qui provoquent des infections systémiques doivent se propager à partir du site d'entrée jusqu'à leur ultime cible, soit par voie sanguine, soit par voie nerveuse.

-Diffusion par voie sanguine

.La diffusion du virus dans le corps par les voies sanguines entraîne une virémie (une diffusion du virus dans tout le corps)

les étapes de la virémie

.Le virus peut diffuser par les voies sanguines selon 2 modes de transports

Libre dans le plasma	-Piconaviridae
Associé aux cellules sanguines	-Rétrovirus -Herpèsviridae

-Diffusion par voie nerveuse

.Le virus de l'Herpès et de la Varicelle:

Cheminement: Peau<=>Nerfs périphériques<=>Ganglions
L'Herpetoviridae ne passe pas les cellules endoneuronales.

.Le virus de la Rage:

Cheminement: Peau<=>Nerfs périphériques<=>Cerveau
Le virus de la Rage suit la voie neuronale.

L' interaction Virus-Cellules endothéliales

Pour franchir la barrière endothéiale, les virus disposent de plusieurs possibilités:

- Franchissement par migration passive.
- Franchissement par infection des cellules endothéliales.
- Franchissement par diapédèse (les virus ont infecté une cellule qui se déforme pour passer entre les cellules endothéliales).

2. Le choix de la cible - Notion de Tropisme

Le virus choisit son organe cible en fonction de l'adéquation des récepteurs dont il dispose à sa surface et des antirécepteurs types des cellules qu'il infecte.

Organe cible	Type de Virus
Foie	Virus des hépatites
Glandes salivaires	CMV
Tractus respiratoire	Rougeole
Peau	Poxvirus
Muscles Lisses	Picornarviridae
Articulations	Rubéole
Pancréas	Oreillons

Le tropisme est lié à l'absence ou à la présence d'antirécepteurs:

Types de Virus	Types de cellules infectées	Récepteurs cellulaires
VIH	Lymphocyte T	CD4
EBV	Lymphocyte B	C3d
Rage	Ganglioside	
Rhinovirus		ICAM1

Mais ceci n'est pas toujours suffisant: d'**autres facteurs rentrent également en jeu :**

-Les **facteurs physico-chimique**, comme la Température

ex: Le Rhinovirus nécessite pour infecter une cellule que celle-ci possède le récepteur ICAM1 et que la cellule soit à la Température de +33°C

-Le **mode de propagations**

-Le **site d'entrée**

ex: le virus de la polio peut suivre les voies orales et les voies intra-cérébrale avec 2 conséquences différentes pour l'hôte.

- **Quelques notions de relation Hôte-Virus**

1. Le spectre d'hôte

Il existe ce que l'on appelle une barrière d'espèces qui limite l'infection par un virus à une ou plusieurs espèces. Cette limitation définit le **spectre d'hôte** du virus et divise les hôtes potentiels en 2 catégories:

- Les hôtes susceptibles.
- Les hôtes non susceptibles.

2. Le tropisme cellulaire

Les virus ne peuvent infecter, au sein d'un même organisme, tous les types de cellule: c'est ce que l'on appelle le **tropisme cellulaire**.

3. Infections productives - Infections abortives

Une fois virus à l'intérieur de la cellule, il se peut que son développement et/ou sa reproduction soient bloqués:

c'est l'**infection abortive**:

Soit le virus est éliminé de la cellule hôte.

Soit le génome du virus est intégré à celui de la cellule hôte mais le virus ne s'exprime pas: il est en phase de latence.

Exemple d'infection restrictive: l'infection de l'épithélium cutané par les papillomavirus

Les différents types d'infections virales

L'infection aigüe

L'infection aigüe se caractérise par une destruction massive des cellules de l'hôte infecté suivit d'une disparition totale du virus dans l'organisme.

Elle **peut être localisée ou généralisée**.

Un exemple d'infection aigüe localisée est le virus de la grippe:

- Le virus pénètre par inhalation de micro-gouttelettes.
- Il se multiplie dans la muqueuse respiratoire ciliée des fosses nasales.
- Il diffuse ensuite de proche en proche jusqu'à l'épithélium cilié des bronches.
- Là, la multiplication du virus grippal reste localisé sans jamais traverser la membrane basale.

Un exemple d'infection aigüe généralisée: Le virus de la Polio:

- Le virus pénètre par voie orale
- Il commence par se multiplier dans l'oropharynx et une partie est excrétée par voie fécale: c'est la phase lymphatique
- Cette multiplication est ensuite suivit d'une virémie et dans un faible pourcentage de cas, d'une atteinte du système nerveux central et des tissus extra-neuronaux: le virus se multiplie alors dans les neurones moteurs, entraînant une paralysie par destruction de ces neurones.

L'infection latente

L'infection latente est une sorte de guérilla permanente entre le système immunitaire de l'organisme infecté et le virus.

Le virus se manifeste de manière intermédiaire dans un site de latence où il est situé (ex.: les virus de la famille Herpès)

Ce type d'infection peut se révéler dangereuse pour un sujet immuno-déprimé car le virus peut dans ce cas devenir virulent.

Un exemple de ce type d'infection: le virus Herpès 1

-Il est localisé dans le ganglion ou dans une zone bien définie.

-il peut ensuite se généraliser et se disséminer dans différents ganglions.

L'infection chronique

Le virus ne se situe pas cette fois-ci dans un site de latence mais en permanence dans l'organisme où il détruit petit à petit ces cibles: le virus est relativement détectable en permanence dans l'organisme.

Les virus comme le VIH ou les virus de la famille des hépatites (hépatite B , C..) amène à ce type d'infection.

1. L'infection transformante

	HTLV	HPV	EBV	HBV	HIV
Stimulation de la prolifération cellulaire par un oncogène virale	+ TAX REX	+ E6 E7	+ EBNA1 EBNA2 LMP	+ ? HBX	-
Insertion d'un promoteur	- ?	- ?	- ?	+ ? HBX	-
Induction non spécifique d'une prolifération cellulaire	-	-	-	+	-
Immunosuppression	-	-	-	-	+

TAX : protéine virale mise en jeux dans le processus de...

+ : La régénération chronique et continue des cellules hépatiques entraîne une accumulation de mutation de laquelle peut émerger un clone de cellule cancéreuse.

+ : L'immunosuppression entraîne l'émergence de tumeurs non reliées au virus inducteur:
Syndrome de Kaposi ou Lymphome.

Cette partie est plus approfondie dans le chapitre :"Oncogénèse et cycle des virus".

Le Virus Epstein Barr

Découverte

-D. Burkitt, parcourant l'Afrique, décrit le lymphome de Burkitt et analyse son épidémiologie.

-M.A. Epstein met en évidence dans les lymphomes de Burkitt un virus appartenant à la famille des herpéviridae et observe que les cellules de Burkitt sont capables de se multiplier *in vitro*.

-1966: Tous les sujets porteurs de lymphome B ont des anticorps contre une protéine produite par les lymphocytes B en culture.

-Tous les Africains ont des anticorps contre cette protéine.

-Les sujets américains ont aussi des anticorps contre cette protéine.

-1968 Mr A. Epstein met en évidence dans les lymphomes de Burkitt un virus appartenant à la famille des herpéviridae et observe que les cellules de Burkitt sont capables de se multiplier *in vitro*.

On sait à présent que le virus est présent chez 95% de la population mondiale ont été en contact avec ce virus et que celui-ci reste présent chez les individus.

Ce virus reste très bien contrôlé, sauf chez les personnes immuno-déprimées (greffés, malades du SIDA...). Dans ce cas, le virus exprime sa fonction primaire, à savoir la prolifération de Lymphocyte B.

Le Lymphome de Burkitt apparaît sous le maxillaire, chez les enfants, dans des zones où le paludisme est endémique.

Les cellules de Lymphome prélevées ont été mises en culture:

-celles-ci se multiplient à l'infini.

-c'est à partir de là qu'on a identifié un nouveau virus (visualisation de particules virales infectant les Lymphocytes B issus du Lymphome en microscopie électronique).

-le virus étant présent chez 95% de la population européenne, environ 100% de la population africaine, on peut en déduire que celui-ci **n'est pas le facteur unique déclenchant la Cancérogenèse**:

Le virus Epstein Barr est un cofacteur de la Cancérogenèse mais n'est jamais le seul responsable (comme le virus de l'hépatite C).

- Réactions entraînées par le virus et Tropisme**

- 1. Primo infection:**

Le virus déclenche une mononucléose infectieuse chez 50% des jeunes adultes (>10ans) lorsque ceux-ci sont en contact avec le virus.

Lorsque le virus infecte l'individu dans les premiers mois de la vie, il n'y a pas de signes visibles

- 2. Tropisme du virus EBV (Epstein Barr Virus):**

-Le Virus EBV à un tropisme pour les lymphocytes B.

-Dans certains pays, le virus est cause de cancer nasopharyngé. Dans ces zones (Chine sud est, Californie.....), c'est le cancer le plus rencontré chez les hommes. Ces tumeurs sont épithéliales et contiennent le virus EBV au sein de leurs cellules épithéliales.

Pour résumer:

EBV

- Virus persistant dans les lymphocytes B**
- Associé à un processus tumoral des lymphocytes B**
- Rencontré également dans les cellules épithéliales (peut donner le cancer du nasopharynx)**

- **Etude de lignées de LB cellulaire issu de tumeurs**

1. Généralités

Trois lignées ont été isolées sur des tumeurs de Burkitt:
BLn, BL1, BL2

On met en contact le surnageant de ces lignées avec de LB sains:

-certains des surnageants ont la capacité d'immortaliser des LB (donne des LB immortels) et d'autre non:

Donc dans ces lignées issues de tumeurs, certaines sont productrices du virus EBV (surnageant + LB normaux donnant des LB immortels) et d'autres non.

2. Notion de Latence

-Il est possible de rendre une lignée de LB immortelle par l'action de produits chimiques (phorbol ester (TPA), Butyrate)

Le virus peut donc rendre les cellules immortelles mais il ne s'exprime pas forcément: il est alors en phase de latence.

- **Analyse du cycle répliquatif**

Les lignées non-productrices permettent de voir les protéines indispensables à l'activation du virus (elles ne sont pas présente durant la latence).

Pour analyser le cycle répliquatif du virus, on se penche sur les lignées productives (de virus).

1. Le virus EBV possède 3 caractéristiques majeures

- Il transforme les lymphocytes B.
- Il persiste toute la vie de l'individu sous forme de latence.
- Il possède des fonctions d'immortalisation définies.

2. Ce virus présente 2 paradoxes

-Il possède un très haut pouvoir transformant in vitro **mais** il est responsable d'aucun signe clinique (chez la très grande majorité des sujets infectés).

-Lors de la mononucléose infectieuse, il y a une forte prolifération de LB et de LT8 dirigé contre le virus (réponse immunitaire intense au contact de l'EBV) **mais** le virus n'est jamais totalement éliminé de l'organisme (il reste sous forme latente).

1-Pénétration du virus dans les cellules de l'épithélium oropharyngé

- 2-Multiplication du virus
- 3-Infection des LB: multiplication et prolifération
- 4-Réponse cytotoxique aspécifique puis spécifique (les Lb infectés possèdent des protéines virales à leurs surface)
- 5-Constitution de réservoir de latence dans des LB mémoire
- 6-Parfois, le virus échappe au contrôle immunitaire d'où réinfection des cellules épithéliales et transmission du virus
cycle infectieux de l' EBV chez un sujet immunocompétent

3. Rappel sur le cycle répliquatif

- On prend des lignées cellulaires Non Productrice auxquelles on ajoute du sérum issu de personnes ayant été en contact avec le virus.
On constate par immunofluorescence que toutes les cellules non-productrices possèdent un antigène EBNA1 (Antigène présent sur le noyau cellulaire).
- On prend des lignées productrices de virus on ajoute du sérum issu de personnes ayant été en contact avec le virus.
On constate par immunofluorescence que seulement 5% des cellules possèdent un antigène au niveau du cytoplasme: le VCA (antigène de capsid virale d'EBV).

-Les lignées cellulaires infectées par EBV mais non-productrice de virus

Possèdent les protéines virales suivantes:

EBNA 1, 2, 3A, 3B, LP, 3C.

LMP 1, 2A, 2B

EBER

- Le gène codant pour la protéine LMP1 est un oncogène viral.
- Le produit du gène EBNA1 assure la persistance du génome viral (il active la réplication du génome viral) sous la forme d'un épisome au niveau du chromosome cellulaire. EBNA1 est peu puissant (il permet juste qu'à chaque division cellulaire soit associé la réplication viral).

Le virus EBV est, dans ces cellules, en Latence.

-Les lignées productrice de virus

Ces lignées expriment en outre des gènes précoces immédiats (ZEBRA).

Ces gènes possèdent un très fort pouvoir activateur de réplication, permettant au virus d'effectuer plusieurs milliers de réplication pour une division cellulaire (de cellule infecté). Ceci permet de constituer un réservoir important de virus permettant de propager l'infection à d'autres cellules.

Le virus peut, dans ces cellules, passer en cycle lytique.

Les deux types de phases de latences

-la latence de type II:

Cette latence est obtenue sur des lignées de LB issues de lymphomes de Burkitt.

Le génome de ces cellules est transformé, ce qui provoque une dérégulation du cycle cellulaire: la cellule est tumorale.

-la latence de type III:

Cette latence est obtenue sur des lignées de LB issues de sujet séropositif pour le virus

EBV (c'est à dire exprimant les 9 protéines de latences)
Il n'y a pas dans ce cas d'anomalie du génome cellulaire, mais il y a en revanche induction de molécule d'adhésion et de marqueurs oncogènes (constaté *in vitro*).
Lorsque l'on crée *in vitro* une immuno-dépression totale, on s'aperçoit que les **cellules infectées** ne sont pas transformées (ne deviennent pas des tumeurs) mais **sont seulement immortelles**.

-La latence *in vitro*: Les EBER

Durant la période de latence, de petits ARN sont transcrits en quantité importante (10 à 100millions de copies/cellules) ; Déetectable en HIS, il présente un intérêt dans le diagnostique de la latence

4. La persistance de l' EBV chez l'homme

A partir de là, 3 questions se posent:

- Comment l'EBV persiste chez l'homme sans être éliminé par le système immunitaire?
- Dans quel type de cellules persiste t-il?
- Quels sont les moyens de détection?

-Persistance chez les sujets immunocompétents:

- Les cellules en phase de latence expriment un nombre limité de protéines virales et de ce fait échappent au système immunitaire.
- Les autres protéines EBNA et les LMP sont reconnues mais non présentent.
- Les cellules infectées n'expriment qu'à très faible niveau les molécules d'histocompatibilité de type I et les molécules d'adhésion.

-Prélèvement du sang total d'un patient (contient tout les LT).

- On utilise des billes magnétiques couplées à des Ac anti CD19. Si les LB sont CD19+, ils se fixent sur les billes. On sépare les 2 populations de LB CD19+ et CD19- en mettant le tube contenant les billes sous un champ magnétique.
- Même chose pour le marqueur CD23.
- Au final, on ne garde que les LB CD19+ CD23-.
- les LB en phase G0-G1 correspondent aux LB mémoires**

Pour conclure:

- Le virus provoque chez les LB infectés une différenciation vers les LB mémoires: ces cellules sont en arrêt de réplication, ce qui permet au virus d'exprimer sa persistance tout en ne se multipliant pas.**
- Environ 5 à 10 cellules LB mémoires sur 1 million sont infectées par le virus EBV.**
- Ces LB mémoires expriment également la protéine LMP2A de fonction inconnue.**

Le système immunitaire d'un sujet sain infecté par l'EBV contrôle dans un premier temps la prolifération des LB infectés par ses cellules N.K. (Natural Killer, cellules de l'immunité non-spécifiques) puis dans un deuxième temps commence la prolifération

de LT CD8, spécifique des antigènes de l'EBV.

Les LT CD8 reconnaissent les protéines des gènes précoces et détruisent les cellules infectées qui sont en phase lytique de manière quasi-immédiate.

Comme on le voit sur le schéma, chez un sujet immunocompétent, l'infection par l'EBV se traduit par une sorte de **guérilla permanente**:

Les LB non-mémoires infectés sont automatiquement reconnus par le système immunitaire en raison des antigènes viraux présent à leurs surface correspondant aux protéines exprimées par les gènes précoces et sont détruit. Quelques LB infectés se différencient en LB mémoires et ne sont alors plus attaqués par le système immunitaire. Cependant, certain LB mémoire redonne des LB non-mémoire qui sont alors automatiquement détruit par les cellules du système immunitaire.

Mais pourquoi les cellules LB mémoires infectées par l'EBV ne sont elles pas reconnues par le système immunitaire?

-Mécanisme de non-reconnaissance de la protéine EBNA1

Les cellules LB mémoires infectées par l'EBV ne sont pas reconnues par le système immunitaire. Pourtant, la protéine EBNA1 est exprimée par les cellules infectées: ces épitopes devraient donc être reconnus par les cellules immunitaires. Or ce n'est pas le cas.

Une analyse de la séquence d'EBNA1 a donc été effectuée:

Une répétition de la séquence Gly-Ala entre les acides aminés 89 et 327 a été détectée.

Une autre protéine, EBNA4, bien reconnu par le système immunitaire, spécialement par une séquence épitope comprise entre la région 416-424 a été utilisé afin de construire des protéines chimères pour déterminer le rôle de la répétition Gly-Ala.

La protéine fusion EBNA1-EBNA4, tout comme la protéine EBNA1, n'est pas reconnu par le système immunitaire, tandis que déléte de la répétition Gly-Ala, la protéine EBNA1D-EBNA4 est reconnu par le système immunitaire.

En réalité, **ce motif de répétition empêche la protéine d'être prise en charge par le protéasome et donc d'être dégradé** par celui-ci.

Il n'y a donc pas présentation de peptide issu de la protéine viral EBNA1 sur le CMH I de la cellule infectée et donc pas de réponse immunitaire contre celles-ci. Le LB mémoire infecté n'est donc pas détruit et constitue donc un réservoir de latence pour le virus.

5. Résumé

-Sujet immunocompétent infecté par l'EBV (95% de la population mondiale):

-Possèdent des LTCD8 reconnaissant l'EBV

-Possèdent des LBmémories contenant l'EBV

Lorsque les LB se mettent à proliférer, il y a expression des protéines lytiques reconnus par les LTCD8 et destruction des cellules exprimant ces protéines.

Il y a donc conflit permanent entre l'EBV et notre système immunitaire.

-Sujet immunocompétent mais atteint d'un lymphome de Burkitt:

Chez ces sujets, il y a expression limité d'EBNA: le lymphome est plutôt dut à une

anomalie cellulaire (translocation du gène myc) qu'au virus EBV.
Il existe par ailleurs des lymphomes de Burkitt EBV-
Les lymphome de Burkitt sont plutôt retrouvé, chez les sujets SIDA, en début de la maladie.

-Sujet immunodéprimé (Greffé ou atteint du SIDA)

-Possèdent un nombre insuffisant de LTCD8 reconnaissant l'EBV
-Les lignées infectées développent la latence de type III (car les protéines lytiques ne sont pas reconnus par le système immunitaire déficient du sujet).
Il y a alors prédominance des facteurs de prolifération lié à l'EBV et donc développement de lymphomes liés à l'EBV.
Pour soigner ce type de tumeur, il faut alors remonter l'immunité du sujet:
dans le cas d'un greffé de la moelle, on peut rajouter des LTCD8 spécifiques des LB lymphomes dût à l'EBV (le patient ne possède alors que ces LTCD8).On peut observé alors une disparition totale des lymphomes.

	Immunocompétent	Immunodéprimé
LTCD8	+++	-
Contrôle de la prolifération par les LTCD8	Oui	non
Expression des protéines virales	EBNA1 (non reconnu par le S.I.)	-Latence de type 3
Cellules LB	Normales Prolifération des LB contrôlée par le S.I.	Prédominance des facteurs de prolifération liés à l'EBV

- Les autres pathologies induites par le virus EBV**

- 1. La mononucléose infectieuse**

- Infection ubiquitaire
- Age d'acquisition: importance de la géographie et du niveau socio-économique.
Enfants infectés à 6 ans: Afrique inter-tropicale (>90%), Europe et Amérique du Nord (30 à 40 %)
- Transmission: salive ("maladie du baiser"), exceptionnellement par transfusion ou lors de greffes.
- Incubation de la maladie: 30 à 50 jours
- Phase prodromique: 3 à 5 jours (céphalées, asthénie, sensation de malaise)
- Phase d'état: fièvre (90%) pendant 10 à 15 jours, angine, polyadénopathie, splénomégalie, hépatomégalie, éruption cutanée.
- Biologie: hyperleucocytose, syndrome mononucléosique: 50 à 80% avec des cellules

hyperbasophiles (surtout T suppressive).

2. La leucoplasie chevelue de la langue (LCL)

-Infection productive chronique par l'EBV des cellules épithéliales de la langue

-Signes cliniques:

stries blanchâtres, verticales, parallèles

bord latéraux linguaux, bilatérales: 87%

puis surface plissées, "chevelue"

extension possible: face ventrale linguale

Le carcinome nasopharyngé (NPC)

-En raison de l'existence de régions endémiques très précises (Sud-Est de la Chine essentiellement), on peut supposer que cette affection peut être due à une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et virologiques:
l'EBV est toujours présent.

Les phorbols esters et les nitrosamines (stoppant la phase de latence) ont été retrouvés dans l'alimentation chinoise (poissons salés).

Il y a souvent perte d'hétérozygotie dans les tumeurs.

-En examinant une tumeur, l'EBV clonal suggère celle-ci provient d'une seule cellule infectées par l'EBV.

-On constate par ailleurs que le titre élevé d'IgA anti-EBV précède le développement du NPC.

- Il a été démontré que les IgA sécrétaires facilitent la pénétration de l'EBV dans les cellules épithéliales.

- Il y a également expression, dans les cellules tumorales, des protéines de latence EBNA1, LMP1, LMP2.

Les Retroviridae

• Généralités

Les Rétrovirus sont des virus globulaires enveloppés, d'un diamètre de 110 à 125 nanomètres, très répandus dans le monde animal. Ils sont la cause de différentes formes de cancer, d'immunodéficiences, dont le sida, et de dégénérescences du système nerveux central. Ce sont des parasites vrais car leurs génomes s'intègrent sous forme d'ADN proviral, le provirus, dans celui de la cellule hôte, pour ensuite s'exprimer pendant toute la vie active de la cellule. Les manipulations génétiques récentes de rétrovirus ont abouti à l'élaboration de vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes dans des cellules, et cette méthode, en cours d'expérimentation chez l'animal, va permettre le développement de nouvelles thérapeutiques.

Les lentivirus (ou Lentivirinae) font partie de cette famille:

Ces virus non transformant sont responsables de pathologie à évolutions lentes.

L'exemple le plus connu est le virus **HIV** mais il existe d'autres virus appartenant au lentivirus comme le SIV, le FIV ou le BIV.

Nous prendrons comme modèle d'étude de cette famille le virus VIH.

1. Les 2 types de VIH

Il existe deux types de VIH: le VIH-1 et le VIH-2

-Ces deux virus sont antigéniquement distinct (mais il existe des réactions antigéniques croisées entre les 2 types).

-Ils ont en commun 42% d'homologie au niveau du génome

-Ils diffèrent par un gène de régulation (vpx pour HIV-2 et vpu pour HIV-1)

2. Modes de transmission de ce virus

Sang, sécrétions génitales, lait

Transmission par voie sexuelle dans 70 à 80% des cas d'infection:

- Homosexuels et bisexuels masculins
- Hétérosexuels ++++ (spécialement en Afrique)
- Facteurs favorisant la transmission: multipartenaire, MST.

Transmission par le sang:

- Toxicomanie (homme et femme, en constante augmentation)
- Accidentelle
- Au cours de transfusion: actuellement, le risque est maîtrisé par un dépistage systématique des dons du sang (risque résiduel estimé à 1/500.000)

Transmission Materno-fœtale:

- In Utero*
- A l'accouchement (probablement le plus fréquent)
- Allaitement (surtout en Afrique)
- Le taux de transmission mère-enfant qui était de 13 à 20 % a été réduit à 3-4%.
- Mais en Afrique, environ 1000 enfants naissent chaque jour VIH+.

Taux de transmission:

- VIH-1 sans traitement: 15 à 20% (+10% s'il y a allaitement)
- VIH-1 avec traitement préventif: 5 à 8 % (<2% en Europe)
- VIH-2 : 2%

- virus à ARN (2 molécules d'ARN, génome diploïde)
- La Reverse Transcriptase permet le passage de l'ARNv à l'ADNv, offrant les possibilités d'intégration du génome viral dans la cellule hôte.
- Les glycoprotéines gp 120 et gp 41 permettant l'attachement aux récepteurs cellulaires et donc l'entrée du virus dans la cellule.

• **Structure du génome virale:**

Le génome comporte:

- 3 gènes principaux: Gag, Pol et Env
- des gènes de régulation: vif, vpr, tat, rev, vpu
- Les protéines sont produites sous forme de précurseurs
- Les ARNm sont les copies complètes de l'ensemble du génome viral.

- **Cycle viral:**

- 1-Attachement du virus grâce à la protéine de surface gp120 et aux co-récepteurs.
- 2-Pénétration par fusion.
- 3-Décapsidation et libération de l'ARNv dans le cytoplasme.
- Transcription inverse grâce à la Reverse Transcriptase contenue dans la paroi virale..
- Passage dans le noyau, circularisation et intégration.
- 4-RéPLICATION
- Transcription grâce à l'ARN pol II cellulaire.
- 5-Traduction en protéines précurseurs: la protéase virale permet le découpage des précurseurs.
- 6-Assemblage des virions.
- 7-Bourgeonnement à la membrane plasmique.
- 8-libération.

- **Mécanismes d'entrée du VIH dans les cellules**

- Fixation au récepteur et fusion Précurseur env gp160 clivé en gp120 (sous unité) et gp41 (Transmembranaire) .
- Fixation de la boucle V3 de gp120 au domaine V1 du récepteur CD4.
- Changement de conformation de la gp120 entraîne fixation au corécepteur.
- Démasquage du peptide de fusion de la gp41.
- Fusion entre les 2 membranes et entrée du VIH dans la cellule.

Lorsque l'on fait une expérience d'infection par le VIH, on s'aperçoit que le récepteur CD4 ne suffit pas pour une pénétration du virus dans la cellule. Des co-récepteurs sont nécessaires:

Corécepteurs du VIH:

- Corécepteurs majeurs : CXCR4 et CCR5.
- Ces récepteurs possèdent 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR).
- Les chimiokines interfèrent dans l'entrée du VIH. SDF1 est un ligand naturel de CXCR4 MIP1a/b et RANTES est un ligands naturels de CCR5 par internalisation du récepteur (down-régulation).
- Selon la souche virale, il y a utilisation de l'un ou l'autre de ces co-récepteurs.

Un troisième type de récepteur également présent: serait un transporteur:
On le trouve sur les cellules dendritiques présentatrices d'Ag (localisées sur l'épithélium muqueux): c'est le récepteur DC-SIGN: le virus se fixe sur ce récepteur et il devient plus résistant à l'inactivation. Les cellules dendritiques migrent vers les ganglions jusqu'au LT_{CD4+} (qui possèdent les récepteurs CD4 et CCR5).

- **La rétrotranscription**

La Reverse Transcriptase ne fait qu'une copie complète du génome donc la séquence

de l' ADN_{retrotranscrit} n'est pas identique à l'ARN_{virale} .

Comme on peut le voir sur le schéma, la R.T. effectue des "sauts" jusqu'au séquences répétées U₅ et U₃ .

Le cDNA provirale possède à chacune de ces extrémités U₃-R-U₅ ce qui le différencie de l'ARN_{virale}.

- **La transcription des protéines précoces**

De petits messagers codent pour TAT et REV.

Celles-ci retournent dans le noyau (cf schéma) et reconnaissent la séquence TAR, transactivant la transcription du génome viral.

REV favorise la stabilité des ARNm non épissés et le transfert des ARNm de grande taille qui, une fois traduits, donnent les protéines tardives.

- **Exemple de variabilité du VIH: le VIH1**

On considère environ 9 sous types de VIH1. On peut noter que le sous types O est très différent génétiquement ce qui fait qu'il peut être considéré comme une autre espèce de HIV.

Ces différentes souches peuvent être corrélées à des zones géographiques: par exemple, la souche B est essentiellement présente en Amérique du Nord et en Europe. Mais à l'intérieur d'une même zone géographique, on trouve encore des souches différentes et même au sein d'un seul patient: la variabilité du VIH est très forte.

Pourquoi une telle variabilité?

2 mécanismes rentrent ici en jeu:

-le taux d'erreurs de la Reverse Transcriptase (qui ne possèdent pas d'activité exonucléase 3'5'): Environ 10⁻³ à 10⁻⁴, soit une à deux mutations par cycle de réPLICATION.

-Le taux de renouvellement du virus est très élevé (la demi-vie du virus est de 48h), ce qui donne 10⁸ à 10⁹ virions synthétisés par jour. (NB: 10⁹ lymphocytes T CD4 sont régénérés par jour).

Une telle variabilité rend très difficile l'élaboration d'un vaccin.

La glycoprotéine gp120 possède une région constante + des boucles hypervariables. Lorsque le système immunitaire est encore fort, il y a expansion du nombre de variants (du à aux mutations): le virus déborde ainsi le système immunitaire qui est détruit: la variabilité se réduit alors et le variant le plus efficace prend le dessus.

- **Evolution du virus: diagnostic**

Charge virale: quantité de virus présente.

Les cellules infectées (tissus lymphoïdes) produisent du virus: elles constituent un réservoir de virus.

Diagnostic:

Chez les adultes:

- Diagnostic sérologique: Ac anti-VIH dans le sérum (3 semaines après l'infection)
- 2 tests de dépistage ELISA
- 1 test de confirmation: Western Blot
- En cas de primoinfection: Antigène p24 dans de sérum

Chez le nouveau né:

- Diagnostic direct
- isolation en coculture lymphocytaire
- détection de l'ADN provirale par PCR
- La mère peut transmettre de manière passive ses anticorps à l'enfant.

Suivi virologique d'un patient VIH+

On recherche l'ARN viral dans le plasma et on le quantifie: plus la charge virale est élevée, plus la variabilité est augmentée. Il faut donc réduire la réPLICATION du virus pour éviter l'apparition de résistance due à la variabilité du virus.

Mesure de la charge virale:

-Méthodes:

RT-PCR quantitative (Problème de la variabilité)
bDNA

NASBA

-Intérêt

Mise en route du traitement anti-rétroviral

Suivi du patient

-Phénotype - génotype des souches

SI, NSI

Résistance aux antiviraux

• **Thérapeutique:**

Les traitements visant à prévenir l'infection (blocage de l'attachement et de la pénétration du virus dans la cellule) sont pour l'instant non efficace.

Les traitements actuels utilisent un mélange d'inhibiteurs de la Reverse Transcriptase et d'antiprotéases: ces traitements sont efficaces mais ils n'ont qu'une activité virostatique (ils n'éliminent pas le virus de l'organisme infecté) et implique donc un traitement à vie.

On attend beaucoup également de la thérapie génique: pour l'instant, ce type de traitement n'est pas encore appliqué.

II - Les Antiviraux

- **Quelques définitions**
- **Antiviraux:** substances artificielles introduites à l'intérieur de l'organisme pour lutter contre les virus.
- **Antivirucide:** qui pourrait détruire les particules virales. Ceci n'existe pas pour des traitements in-vivo car les particules virales sont synthétisées par la cellule infectée elle-même.
Il existe néanmoins des virucides pour usage externe (par exemple pour la désinfection des muqueuses génitales). Mais parfois ces peuvent irriter la muqueuse et paradoxalement favoriser l'infection virale.
- **Virostatique:** on parle d'activité virostatique lorsque qu'une substance est capable d'inhiber la multiplication virale (et non de libérer totalement l'organisme de la présence du virus).
- **Les Virostatiques**

Les virostatiques réduisent la production de virus.

Pour mesurer l'efficacité d'un virostatique, on mesure sa C.I.50 (concentration d'antiviraux nécessaire pour réduire à 50% la réplication du virus, testé en culture de cellule).

- On calcule la **concentration qui réduit de 50% le nombre de plaques** (ici, **CI50= 0,1**)
- Il se peut qu'à une concentration de 1000, il y ait des altérations pour la cellule: dans ce cas, la **concentration cytotoxique (C.C.)** est égale à 1000.
- On détermine ensuite l'**indice de sélectivité**, qui permet de donner la marge de concentration d'utilisation du virostatique:

$$I.S.= C.C./CI50$$

Exemple de virostatique: L'aciclovir, qui bloque la réplication du Herpès virus simplex (HSV).

- **Les différents types d'Antiviraux selon leurs cibles**

Antiviraux inhibant l'attachant du virus à la membrane plasmique: exemple du VIH

Pour pénétrer dans la cellule le virus s'attache à la membrane plasmique.

Le VIH, par exemple, possède 2 glycoprotéines de surface, gp41 et gp120 qui permettent au virus d'interagir avec le CD4 du lymphocyte LTHelper.

-Il a été fabriqué un analogue de la chaîne transmembranaire CD4 afin de bloquer la fixation du virus par sa glycoprotéine gp120. Cet analogue a été testé sur une culture cellulaire infectée par le VIH. Il a été montré que des doses faibles peuvent inhiber la réplication du VIH avec un indice de sélectivité d'environ 1000.

Il a par ailleurs été observé chez l'homme une non-toxicité de cette analogue.

Mais cela ne marchait pas sur la multiplication virale in vivo: POURQUOI ?

En fait, le travail a été réalisé sur la souche BRU de HIV est cette souche est passé un grand nombre de fois en culture cellulaire et les caractéristiques de la gp120 ont été altérée (perte de ses glycosides): la glycoprotéine étant différente, elle était devenu beaucoup plus accessible à l'analogue du CD4 que la protéine gp120 sauvage.

La gp41 détermine la fusion entre la membrane virale et la membrane cytoplasmique. La glycoprotéine gp41 rapproche l'enveloppe du virus de la membrane cytoplasmique: ce repliement peut être géné par le polypeptide T20 qui bloque la gp120. Un traitement comportant deux piqûres par jours est ou a été effectué sur des patients.

Antiviraux inhibant la décapsidation du virus

Nous prendrons l'exemple des Rhinovirus.

Les rhinovirus, agents du rhume, comporte environ 100 sérotypes.

Le virus possède une capsidé lui permettant de résister à l'air ambiant: la **décapsidation** (destruction de la capsidé), une fois que le virus dans la cellule, **est nécessaire pour que son ARN soit exprimé**.

Une substance a été trouvée qui bloque cette décapsidation. Cette substance est capable de contracter les liaisons covalentes entre 2 molécules de capsidé.

Antiviraux inhibant la réplication du virus

Virus	Antiviraux	Caractéristique(s) - Rôle(s)

CMV (Cytomégalovirus)	DHPG (ou Ganciclovir Sodique)	-Se transforme sous l'effet de kinases en ganciclovir triphosphate capable d'inhiber de façon compétitive l'ADN polymérase virale et donc de stopper ou de ralentir la réPLICATION du virus.
HIV	didéoxynucléoside AZT, CTV, 3TC	-Analogues nucléosidiques. -Ne possèdent pas de 3'OH -Agissent sur la RNAPol du Virus
HSV	Activin™	
HBV	sensible au 3TC	-Analogue nucléosidique de la cytidine. -La 3-TC est phosphorylée en lamivudine triphosphate qui inhibe la transcriptase inverse et qui bloque l'élongation de la chaîne d'ADN proviral lors de la réPLICATION virale. -N'aurait que peu d'effet sur l'ADN nucléaire et mitochondrial des cellules humaines. -Pourrait agir sur certaines souches de VIH résistantes à la zidovudine. Inhiberait également la réPLICATION du virus de l'hépatite B

-Il existe également des antiviraux bloquant la réPLICATION des virus possédant une ARN polymérase:

Le virus HSV (Virus de l'Hépatite C) est un virus à ARN+. L'ARN est synthétisé

grâce à une ARNpol virale.

Il existe un inhibiteur de cet ARNpol, la **ribavirine**, qui, convertie en dérivés mono, di et triphosphate, inhiberaient la synthèse des acides nucléiques viraux.

Plus exactement, cet inhibiteur s'oppose à la pose de la coiffe sur les ARN (c'est donc un inhibiteur non spécifique). Il induit donc d'importants effets secondaires.

Antiviraux inhibant la protéase virale

De nombreuses synthèses de protéines virales se font à partir de précurseurs polypeptidiques (Enzymes, protéines de capsides...)

Par exemple dans le cas du VHC, tous le génome d'ARN est traduit sous forme d'un polypeptide géant qui est ensuite clivé en plusieurs morceaux dont les protéines de capsides, les protéines aux propriétés enzymatiques, les protéases virales...

Ces dernières servent justement à découper certains sites du polypeptide géant.

Si l'on parvenait à inhiber la protéase, on posséderait un antiviral capable de bloquer la réPLICATION du virus.

Ceci a été trouvé pour le virus HIV (ceux sont les fameux anti-protéases).

1. Antiviraux inhibant la Neuraminidase

Le virus Influenza se fixe aux récepteurs de l'hémagglutinine (protéine de surface) situés à la surface des cellules (récepteurs) de l'appareil respiratoire. Ensuite, il s'introduit clandestinement à l'intérieur de la cellule hôte et s'y reproduit.

Ici, la deuxième protéine de surface du virus, la **neuraminidase**, remplit sa tâche spécifique : elle coupe des parties des récepteurs de virus (acide neuraminique) de manière à ce que les particules de virus se libèrent de la surface de la cellule hôte et puissent contaminer de nouvelles cellules

Elle permet donc de libérer les bourgeons.

Toutes les cellules infestées meurent petit à petit.

Les inhibiteurs de la neuraminidase, bloquent ce processus de libération : les récepteurs de virus de la surface de la cellule hôte restent intacts si bien que les virus suivants restent « collés » et que le cycle d'infection est stoppé.

Antiviraux inhibant l'intégrase

C'est une nouvelle génération d'antiviraux qui tentent d'être synthétisé, en particulier pour la lutte contre le VIH.

L'**intégrase** du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) est une enzyme qui catalyse l'incorporation de l'ADN proviral dans l'ADN de l'hôte, étape cruciale du cycle de réPLICATION du virus. Des chercheurs ont mis au point de nouveaux inhibiteurs de l'intégrase. Ces inhibiteurs - possédant le noyau styrylquinoléine - ont montré une excellente activité anti-intégrase in vitro. Ils bloquent la réPLICATION du VIH en culture cellulaire et sont dénués de cytotoxicité. Ils ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour le développement d'antiviraux destinés au traitement du Sida."

Les obstacles à l'utilisation d'antiviraux

1. La cytotoxicité

Plusieurs antiviraux sont activés par des enzymes cellulaires:

-L'ACV (Aciclovir):

C'est un nucléoside qui est activé par la Thymidine Kinase du Virus (TKV). Il n'est donc activé que dans les cellules infectées.

Par ailleurs, l'ACV inhibe la DNA polymérase virale de façon plus importante que celle de la cellule hôte.

La cytotoxicité de cet antiviral reste donc faible.

-L'AZT (azidothymidine):

Le virus HIV ne possède pas de Kinase virale. L'AZT est donc phosphorylé uniquement par des kinases cellulaires. Il s'en suit que l'AZT peut être activé dans toutes les cellules de l'hôte infecté, même si ces cellules ne sont pas infectées par le virus. Heureusement, l'AZT n'agit pas sur l'ADN pol. nucléaire mais plutôt sur l'ADNpol mitochondriale (ADNpol. γ mitochondriale).

Le risque de toxicité pour l'organisme reste donc limité mais il existe néanmoins, notamment au niveau neuronale.

-Le FIAV (Fluorio-iodo AraVridine)

Cet antiviral agit sur la transcriptase inverse virale du virus HBV (virus de l'hépatite B) mais également sur l'ADN pol.g des mitochondries cellulaires.

En cas de traitement, l'antiviral s'accumule et détruit les mitochondrie (toxicité retardée). Il y a alors mort des individus traité (il n'est donc pas prescrit...).

►plus d'info sur les antiviraux de l'HBV? <http://www.john-libbey-eurotext.fr/articles/vir/1/3/197-215/fr-resum.htm>.

-BVaraU (Bromo-Vinyl-ara-Uridine ou sorivudine)

Cet antiviral est utilisé contre le virus de la varicelle et du zona (VZV).

Associé au 5 FluoroUracile (5FU)* utilisé dans les traitements cancéreux, il inhibe le catabolisme de ce dernier, entraînant un surdosage du 5FU est donc de très forts effets secondaires.

*(antivirale qui freine la mitose cellulaire, prend la place de l'uracile dans les désoxyribonucléotides. en inhibant la thymidilate synthétase (TS), empêchant la méthylation de l'acide désoxyridylique en acide thymidylique et interfère donc dans la biosynthèse de l'ADN. Trois métabolites actifs dérivés du 5-FU agissent : - le 5F-dTP (fluoro-uridine triphosphate) s'incorpore dans l'ARN et inhibe la formation et la fonction de l'ARN. - le 5F-dUMP (5 fluoro-désoxyuridine monophosphate) se lie à la thymidilate synthétase et inhibe la formation de la déoxythymidine triphosphate qui est un précurseur nécessaire de l'ADN. - le FdUTP est incorporé dans le DNA et inhibe l'elongation de la chaîne de l'ADN.)

►Plus d'info sur le VZV? <http://www.john-libbey-eurotext.fr/articles/vir/4/3/207-16/index.htm>.

-Les inhibiteurs de protéases

Ces antiviraux bloquent les protéases virales qui dans le cas du VIH, permet de scinder les protéines précurseurs pour former les différentes protéines de structure ou de régulation incluant la transcriptase inverse, l'ARNase et l'intégrase.

Des anomalies biologiques peuvent s'associer ou non au syndrome lipodystrophique:

hyperglycémie par insulino-résistance pouvant aboutir au diabète, hypertriglycéridémie modérée à sévère, hypercholestérolémie plus rare. La connaissance de ces anomalies est trop récente pour que les conséquences, en particulier vasculaires, ne soient appréciées mais des durées de traitement prolongées font craindre des accidents cérébraux et/ou coronariens. La réversibilité de ces anomalies à l'arrêt du traitement est incertaine, du moins pour les troubles morphologiques.

Plus un antiviral est bien ciblé sur une structure ou un mécanisme virale (donc plus il est spécifique), plus il est possible de sélectionner des mutants résistants, d'autant que les virus (surtout ceux à ARN qui non pas de mécanisme de réparation) mutent facilement.

-Exemples de résistance aux antiviraux par mutations:

. Les virus Herpès résistant à l'Aciclovir sont par exemple mutés sur leurs Thymidines Kinases (T.K.-) (ce qui empêche l'activation par phosphorylation de l'aciclovir) ou sur leurs ADNpol.

Seulement 1/10000ème des virus Herpès sont TK-. Mais ces mutants peuvent être sélectionnés chez les sujets immuno-déprimés traité à l'aciclovir. Il faut alors traiter les patients infectés par le virus TK- par du Foscarnet (anologue du pyrophosphate, inhibe l'ADNpolvirale de l'HSV) qui agit directement (il n'a pas besoin d'être phosphorylé par la TKvirale) et donc peut agir sur les virus Herpès TK-.

. Pour le virus HIV, où les virus à ARN en général, ce problème de mutation des cibles des antiviraux se pose d'autant plus que la fréquence des mutations est élevée. Le traitement en monothérapie sélectionne très rapidement des mutants résistants (d'où l'idée de tri-thérapie).

2. Influence de la latence

Le virus, une fois la cellule infectée, peut s'intégrer dans le génome cellulaire sans se multiplier.

-ex: le virus HIV s'intègre parfois dans les cellules CD4+ mémoires.

-ex: le virus de l'herpès simplex (buccal) s'installe dans les ganglions tri-jumeaux (ganglions nerveux) et peuvent rester toute la vie de l'hôte infecté dans ces ganglions. La latence correspond souvent (mais pas toujours) à une non-expression du génome viral (et donc à une non-prolifération virale): Malgré les anticorps et les LT8 dirigés contre le virus, le virus reste présent car il ne produit pas d'antigènes susceptibles d'être reconnus par le système immunitaire.

La seule façon de lutter contre ces virus en latence serait l'utilisation de sondes d'oligonucléotides antisens qui réduiraient les gènes viraux au silence ou d'utiliser une nucléase spécifique qui couperait le(s) gène(s) viral(aux). Ces traitements sont pour l'instant à l'étude notamment en ce qui concerne les oligonucléotides antisens.

• Essais thérapeutiques

Tests précliniques

Sur différentes sources virales:

	-CI50 -IS (indice de sélectivité)
Modèles animaux	-Mesure de la dose létale 50% -Etude du modèle d'infection
Essais	<p><u>Phase I:</u> on teste la dose à administrer en augmentant les concentrations: Etude de la tolérance</p> <p><u>Phase II:</u> étude de l'effet dose sur les sujets infectés: recherche de la meilleure dose entraînant le meilleur effet.</p> <p><u>Phase III:</u> traitement à des doses efficaces contre un témoin Mesure de la différence entre l'effet placebo sur un groupe versus l'effet de l'antiviral un groupe traité.</p> <p><u>Phase IV:</u> Pharmacovigilance</p>

Les malades sont également associés aux actions thérapeutiques.

III - Oncogénèse et cycle biologique des virus

- Quelques définitions**

-cancer: (Lat *cancer*, crabe)

Nom donné à toutes les tumeurs malignes qui s'étendent rapidement et ont tendance à se généraliser.

-Tumeur: (Lat *tumere*, enfler)

Nom générique donné à des productions pathologiques constituées par un tissu de nouvelle formation et distinctes de processus inflammatoires (tumeurs bénignes ou tumeurs malignes).

-Immortalisation:

Processus pathologique par lequel une cellule se divise de façon continue ou indéfinie.

-Transformation:

Processus pathologique par lequel une cellule acquiert de nouvelles propriétés modifiant sa morphologie et sa croissance.

-Virus oncogène:

Virus introduisant la formation de tumeurs chez l'homme ou l'animal.

-Virus transformant:

Virus induisant une transformation des cellules infectées in vitro.

-Processus tumoral:

Le processus tumoral peut se résumer en 4 facteurs:

-Immortalisation des cellules et modifications de leurs adhérences

-Contournement du système immunitaire

-Néo-angiogénèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins alimentant les cellules tumorales)

-Diapédèse (les cellules tumorales passent entre les cellules endothéliales et arrivent dans le système de régulation sanguin, ce qui leur permet de se disséminer ailleurs dans l'organisme.)

- **Les propriétés des cellules transformées**

1. Au niveau de leurs croissances

- Augmentation de la densité cellulaire à saturation
- Diminution des besoins en facteurs de croissance
- Croissance "ancre-indépendante"
- Perte de l'inhibition de contacte

2. Au niveau du cytosquelette

- Perte des fibres de stress (visible en microscopie optique)
- Redistribution des microfilaments (microscopie électronique)

3. Au niveau de la surface des cellules

- Augmentation de l'agglutinabilité par les lectines
- Augmentation de la production de protéases membranaires et sécrétées
- Métabolite accrue des protéines membranaires
- Diminution de l'adhérence aux supports solides

4. Au niveau de la matrice extracellulaire

-Diminution des fibronectines

.Les cellules transformées ne présentent pas nécessairement toutes les modifications décrites.

.Les tests de transformation peuvent recouvrir des notions différentes:

-croissance en agar molle

-croissance à taux de sérum réduits

-modification morphologiques etc....

.Il est important de distinguer les cellules transformées des cellules tumorigènes(tumeurs en souris nude(dépourvue de système immunitaire) ou dans un contexte isogénique)

.Les cellules tumorales sont en générales immortalisées et transformées.

- **Rôles des virus dans l'oncogénèse**

-84.5% des tumeurs sont dût aux facteurs environnementaux (pollution, tabac...) et aux facteurs génétiques.

- 0.5% des tumeurs sont causé par des causes infectieuses autres que virales.

-15% des tumeurs sont le fait d'étiologie virale, dont 80% dût au seuls virus HPV et HBV..

Groupe taxonomique	Exemple	Mode d'infection, quand celle-ci est transformante	Pouvoir oncogène naturel
Virus à ARN			
<i>Rétrovirus</i>	ALV RSV HTLV-I	chronique chronique chronique	leucémie aviaire sarcome aviaire leucémie T de l'adulte
<i>Flavivirus</i>	VHC	chronique	hépatocarcinome
<i>Deltavirus</i>	VHD	chronique	discutable- en association avec VHB
Virus à ADN			
<i>Papovavirus</i>			
- papillomavirus	HPV 16/18	restrictive ou abortive	papillomes - carcinomes
- polyomavirus	SV40	abortive	non
<i>Adénovirus</i>	Ad12 humain	abortive	non
<i>Herpesvirus</i>	EBV HHV8 CMV	latente latente hit and run ?	lymphome / carcinome Kaposi / lymphome non prouvé

<i>Hepdnavirus</i>	VHB	chronique	hépatocarcinomes
<i>Poxvirus</i>	Virus Fibrome Shope	Chronique ?	fibromes

- - Les infections transformantes sont persistantes
 - Les voies physiologiques altérées le sont également dans les tumeurs non-induites.
 - Le processus néoplasique est toujours associé à une dis-régulation du cycle cellulaire.

Les Rétrovirus oncogènes

1. Propriétés communes des rétrovirus oncogènes

- Oncogènes chez l'homme ou chez l'animal
- Persistance sous forme intégrées
- Sont peu ou pas cytolytiques

2. Différences majeures entre les rétrovirus oncogènes

Délais d'apparition des tumeurs	Taux de tumorigénèse	Type de virus
rapide (~jours/semaines)	élevé	RSV
Intermédiaire à long (~mois)	moyen	ALV
très long (années)	faible	HTLV-I

3. Les Virus oncogènes lents: exemple de l'ALV (*Avian Leukosis Virus*)

- Si l'on injecte à des poussins le virus ALV, au bout de 6 mois, 95% de ces poussins donneront des poulets sains et 5% des poulets leucémiques
- Si l'on prélève du virus de ces derniers pour infecter de nouveau des poussins, ceci donneront 95% de poulets sains et 5% des poulets leucémiques.

Le virus issu d'un poulet leucémique n'acquiert donc aucun pouvoir oncogène.

-Le virus ALV n'est pas transformant (les cellules infectées n'acquièrent pas de nouvelles propriétés modifiant leurs morphologies ou leurs croissances).

-L'ADN proviral est intégré sans distinction à l'ADN des cellules tumorales et à l'ADN des cellules non tumorales.

-En analysant l'intégration de l'**ADN proviral**, on s'aperçoit:
qu'il **s'intègre de façon aléatoire dans les cellules infectées mais non tumorales**.
qu'il **s'intègre de manière identique dans toutes les cellules tumorales : La tumeur est donc clonale** (issue d'une même cellule).

-En réalité, le site d'insertion du génome virale détermine le processus de transformation de la cellule infectée.
Si l'insertion s'effectue par exemple dans la zone de régulation du gène c-myc (proto-oncogène), il peut y avoir dérégulation de l'expression du proto-oncogène et transformation de la cellule infectée.

Un virus oncogène lent est un virus cic-activateur, ce qui veut dire qu'il est capable d'activer l'expression de certain gène, mais uniquement si il est inséré à coté de ce gène.

Récapitulons: Caractéristiques des virus oncogène lents:

- Virus oncogène, mais non transformant**
- Faible taux de tumorigénèse chez l'animal**
- Les Tumeurs sont clonale**
- Le site d'insertion du provirus est spécifique dans l'ADN cellulaire**
**Oncogénèse par mutation
insertionnelle**
- L' Oncogénèse est compatible avec la réPLICATION virale**

4. Les Virus oncogènes rapides: exemple du RSV (*Rous Sarcoma Virus*)

-Si l'on extrait par ultracentrifugation le virus RSV d'un poulet infecté et qu'on réinjecte le virus sur des poussins, 1 à 2 semaines plus tard, 100% des poussins ont développé un Sarcome.

Le virus est facteur d'oncogénèse

-En analysant l'effet du virus sur les cellules infectées, on s'aperçoit que le virus

RSV est transformant.

-En analysant l'intégration de l'**ADN proviral**, on s'aperçoit:
qu'il s'intègre que dans le génome des cellules tumorales .
qu'il est présent dans toutes les cellules tumorales.

les sites d'insertion du provirus est aléatoire et ne détermine pas le pouvoir tumorigène ou transformant du virus.

Pour déterminer si le pouvoir transformant du RSV est lié à un gène viral, **des mutants de RSV** sont étudiés:

Un stock viral est établi et on isole les mutants sur culture cellulaire:

Le virus sauvage est transformant

Les mutants se répliquent mais sont défectifs pour les fonctions de transformation.

Il faut ensuite localiser les sites mutés dans les virus défectifs afin de déterminer le ou les gènes responsables des propriétés transformantes du virus.

En analysant comparativement les génomes des virus RSV et ALV, on s'aperçoit que le virus RSV possède un gène supplémentaire baptisé **Src**.

En analysant ensuite la présence ou non du gène Src dans le génome des cellules non transformées, on s'aperçoit que le gène Src est présent dans les cellules saines, ce qui signifie que ce gène est un gène d'origine cellulaire et non virale.

-Enfin, une dernière expérience a été menée:

Un mutant RSV "type ALV" (c'est à dire le gène v-Src déleté) a été construit.

Le virus ainsi muté a été inoculé à des poussins:

Dans de rares cas, les poussins développent un sarcome, et ceci à un stade avancé de leurs croissances (comme si on les avait infecté avec ALV).

De ces rares poussins développant un sarcome l'on extrait le virus que l'on inocule de nouveau à des poussins:

Dans 100% des cas, le poussin présente un sarcome (comme si il avait été infecté par le virus RSV sauvage).

En analysant le génome des virus prélevés sur ces poussins, on s'aperçoit que le mutant RSV "type ALV" a acquis l'oncogène Src cellulaire.

le virus RSV est capable de capturer un proto-oncogène cellulaire et c'est ce gène qui porte les fonctions de transformation.

Il est intéressant de noter que **les virus à pouvoir oncogène rapide sont en général défectifs, d'où la nécessité soit d'un virus helper permettant au virus de se répliquer ou soit la mise en jeu d'un mécanisme de co-infection.**

les virus oncogènes rapides sont donc des virus transducteurs.

Résumé des Caractéristiques des virus oncogène rapides:

- Virus oncogène et transformant
- Courte période d'incubation avant apparition de la tumeur
- Taux élevé de tumorigénèse chez l'animal et de transformation in-vitro
- Tumeurs polyclonales
- Site d'insertion aléatoire du provirus dans l'ADN cellulaire
- Les fonctions de transformation sont portées par le virus et indépendantes des fonctions de réPLICATION
- Les virus portent un oncogène d'origine cellulaire
- La capture d'un proto-oncogène cellulaire se fait le plus souvent au détriment des fonctions de réPLICATION.

Les Virus oncogènes à ADN

Le Virus SV40

-Découverte:

Le virus SV40 (*Virus Simien 40*) a été découvert par hasard lors des essais de vaccination contre la polio:

Salk et Sabin firent produire du virus de la polio sur des cellules de rein de singe.

Ces virus étaient ensuite inactivés puis utilisés pour la vaccination. On faisait en parallèle des tests d'innocuité.

-En injectant la préparation à des hamsters nouveau-nés, ils constatèrent l'apparition d'une tumeur 230 jours après injection.

En isolant les anticorps produits par le hamster, ils identifièrent un nouveau virus: le **SV40**.

-Ce virus est capable de se multiplier sur cellules de singe sans occasionner de tumeurs mais dès qu'il est injecté à des hamsters, il cesse de se multiplier mais induit des transformations en cellules tumorales.

Pour identifier les facteurs de la transformation, un mutant thermosensible de SV40 a été isolé: à 37°C, les cellules de hamster infectées par ce virus sont transformées, mais pas à 32°C (température où le virus est défectueux) :

le facteur transformant est donc un protéine virale : c'est l'antigène grand T.

-Le site d'insertion virale dans l'ADN génomique est aléatoire.

-Une région virale est constamment exprimée dans les cellules transformées, la région codant pour l'antigène grand T.

L'antigène grand T est suffisant pour immortaliser et transformer des cellules embryonnaires de rongeur

Fonctions de l'antigène grand T

- L'antigène grand T peut immortaliser et transformer des cellules de rongeurs.
- Son expression stimule l'entrée des cellules en phase S
- Trois régions sont requises à l'expression du pouvoir transformant
- Deux de ces régions s'associent aux produits des gènes (cellulaires) supresseurs de tumeurs P53 et pRB

N.B.:

- l'inactivation de pRB est observée dans certaines formes de rétinoblastome.
- la p53 est inactive dans environ 50% des cancers humain.

Le papillomavirus

-Découverte des propriétés oncogènes du virus:

Shope transmet un échantillon du papillomavirus à F.P. Rous

Injection de ce virus sur un lapin. Après quelques semaines, les lapins de laboratoire ne développent pas de verrue et le virus "disparaît".

Plusieurs mois après l'infection, les lapins développent un carcinome cutané....

En réalité, le virus présente 2 cycles possibles:

- Un cycle d'infection lytique
- Un autre d'infection abortive (pas de production de virus) et transformante.

**-Les protéines virales E6 et E7 sont responsable du déclenchement de l'oncogénèse:
la protéine E6 interagit avec le produit de gène (cellulaire) supresseur de tumeurs P53.
la protéine E7 interagit avec le produit de gène (cellulaire) supresseur de tumeurs pRb.**

Les oncogènes vitaux des "petits virus à ADN" sont ils un exemple de convergence évolutive

Virus	Interaction avec p53 cellulaire	Interaction avec pRb cellulaire
SV40	antigène T (EA)	antigène grand T
Virus Polyome Murin	Non Donné	antigène grand T
BK	antigène T (EA)	antigène grand T
JC	antigène T (EA)	antigène grand T
Adénovirus	E1b-55K/E4ORF6 (EA)	E1a (EA)
Papillomavirus 16/18	E6 (EA)	E7 (EA)

Virus Epstein-Barr (EBV)	EBNA-5 (EBNA-LP)	EBNA-5 (EBNA-LP)
Cytomégalovirus (CMV)	IE-84	non
Virus de l'Hépatite B (HBV)	HBx	non

Ces virus ont en commun de posséder une ou deux protéines précoces interagissant avec p53 et pRb.

- L'interaction se fait dans les cellules transformées et au cours du cycle répliquatif normal (*coïncidence?*)
- La transformation survient dans le contexte d'une infection abortive et persistante.
- Elle requiert l'intégration du génome viral et l'expression continue d'une ou plusieurs protéines précoces.

Cycle viral et transformation

La réplication virale dépend en grande partie du métabolisme nucléotidique de la cellule et, dans une mesure plus variable, de la machinerie de réplication.

Le virus oncogène amplifie l'avancée du cycle cellulaire vers les phases G1 et S, ce qui lui permet de se répliquer plus facilement, le métabolisme nucléotidique étant largement amplifié durant ces phases.

En tant normal, le cycle cellulaire est régulé.

-En phase G1:

La protéine Rb forme avec E2F le complexe Rb-E2F qui réprime l'expression des gènes du cycle cellulaire et ceci constitue un événement essentiel pour supprimer la prolifération cellulaire.

La liaison à Rb ou sa phosphorylation, fonctionnellement ou physiquement, libère les facteurs de transcription E2F. E2F est lié à l'ADN en association avec un autre facteur de transcription DP-1 et ensemble, une fois l'action inhibitrice des protéines "pocket" levée, elles induisent l'expression de la cyclineE et cyclineA, nécessaire pour le passage à travers G1. Mais surtout, les facteurs de la famille "pocket" régulent la transcription des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et dans l'induction de l'expression des histones 2A et 2B, indispensables pour l'assemblage de l'ADN dans les nucléosomes. Ils sont donc essentiels pour l'initiation et progression de la phase S.

L'irradiation ionisante des cellules provoque des cassures de chaînes d'ADN qui conduisent à une augmentation post-traductionnelle du taux de p53 et à son activation (l'astérisque indique l'état activé de p53). La protéine p300 interagit avec p53 et cause son acétylation, contribuant à son activation. L'induction optimale de p53 après irradiation paraît nécessiter un gène ATM normal. L'accumulation et l'activation de p53 conduisent à une transactivation transcriptionnelle de plusieurs gènes comprenant gadd45, mdm2, p21, bax et cycline G. La question n'est pas encore résolue de savoir si les gènes inductibles par p53, IGF-BP3 et TSP1 (thrombospondine-1, inhibiteur d'angiogenèse), sont induits spécifiquement en réponse aux

radiations ionisantes. Une augmentation du taux de p21 contribue à l'arrêt du cycle cellulaire par l'inactivation des complexes cycline-Cdk (l'astérisque après cycline-Cdk indique l'état d'activation de ceux-ci). p53 stimule l'expression de mdm2, entraînant une régulation négative de p53, ce qui limite la durée de l'arrêt en G1 provoqué par l'irradiation des cellules.

Dans une cellule avec des gènes RB1 intacts, l'induction de p53 tend à empêcher la phosphorylation de pRb, qui reste ainsi lié au facteur de transcription E2F. Les cellules qui sont en G1 à ce temps de l'irradiation ne peuvent progresser en phase S car les gènes permettant cette progression sont bloqués.

Au contraire, si pRb est inactivée, soit par fixation avec des oncoprotéines virales (E1a, E7), soit par inactivation du gène RB1, alors E2F est constitutivement libre et capable de faire passer la cellule en phase S1 malgré l'induction de p53.

La combinaison de l'induction de p53 et l'expression de E2F ou la progression continue en phase S tendent à induire l'apoptose.

Les voies de régulation p19ARF-MDM2-p53 et p16-cycline D/CDK4,6-pRb sont indiquées.

Pour pouvoir permettre une oncogénèse, les oncogènes viraux doivent "collaborer"

Le modèle des "petits virus oncogènes à ADN"

-La transformation viro-induite (par SV 40, Adénovirus, Papillomavirus) est une perversion du cycle réplicatif, mais elle en traduit certaines modalités.

-Les interactions observées traduisent une "mise en condition" de la cellule (permettant d'optimiser les processus de réplication virale).

Les protéines impliquées sont très **précoce**s ou **précoce**s

La transformation étant incompatible avec les propriétés cytolytiques de ces virus, elle n'est observée qu'au cours d'infection **persistantes et abortives**.

Il y a alors intégration du génome viral et expression constante des oncoprotéines virales

