

**Collégiale des enseignants de bactériologie-
virologie-hygiène**

**Enseignement de
Microbiologie**

POLYCOPIE

Sommaire

- Chapitre 1 Démarche du diagnostic microbiologique d'une méningite/méningo-encéphalite
- Chapitre 2 Démarche du diagnostic microbiologique d'une infection des voies respiratoires basses
- Chapitre 3 Démarche du diagnostic microbiologique d'une tuberculose
- Chapitre 4 Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie – Structure
- Chapitre 5 Croissance des bactéries
- Chapitre 6 Leptospira
- Chapitre 7 Bacillus anthracis
- Chapitre 8 Francisella tularensis - Tularémie

Démarche du diagnostic microbiologique d'une méningite/méningo-encéphalite

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2012

Table des matières

1. Entités nosologiques.....	3
2. Physiopathologie : comment un micro-organisme parvient-il jusqu'à l'espace sous-arachnoïdien ou l'encéphale ?.....	3
3. Agents étiologiques : quels sont les micro-organismes potentiellement responsables ?.....	3
3.1. Méningites.....	3
3.2. Méningo-encéphalites.....	4
4. Quels sont les prélèvements pertinents à réaliser ?	4
5. Paramètres biologiques du LCR utiles.....	4
6. Pénétration des antimicrobiens.....	6
Annexes.....	7

1. Entités nosologiques

Une méningite correspond à l'infection par un micro-organisme du liquide céphalorachidien qui se situe dans l'espace sous-arachnoïdien des méningites. Lorsque l'infection est limitée aux méninges, on parle de **méningite** (syndrome méningé + fièvre). Dans certains cas l'infection touche également l'encéphale, et s'accompagne d'autres signes, troubles des fonctions supérieures et / ou signes de localisation neurologique et l'on parle alors de **méningo-encéphalite**. La **myélite** est une infection de la moelle épinière. Lorsque le cerveau et la moelle épinière sont enflammés, l'état est appelé **encéphalomyélite**.

(Image espaces méningées)

2. Physiopathologie : comment un micro-organisme parvient-il jusqu'à l'espace sous-arachnoïdien ou l'encéphale ?

Dans la très grande majorité des cas, le micro-organisme traverse une première barrière (oro-pharyngée ou digestive) et **passé dans le sang**, puis traverse la **barrière hémato-méningée** (cellules endothéliales ajourées et cellules des plexus choroïdes) pour donner une méningite ou la **barrière hémato-encéphalique** (cellules endothéliales jointives et cellules gliales) pour donner une méningo-encéphalite. Il est donc possible de retrouver le micro-organisme dans le LCR mais aussi dans le sang.

La traversée de la première barrière se fait le plus souvent à bas bruit. Parfois il existe un foyer primitif notamment au niveau de l'arbre respiratoire (par exemple, otite, sinusite, pneumopathie) où le micro-organisme peut également être retrouvé.

3. Agents étiologiques : quels sont les micro-organismes potentiellement responsables ?

L'épidémiologie des méningites est différente de celle des méningo-encéphalites.
L'épidémiologie varie selon l'âge du patient, le terrain (statut immunitaire), l'origine géographique.

3.1. Méningites

Selon l'âge :

Les principaux micro-organismes responsables de méningites sont :

- **A la période néonatale** : *Streptococcus agalactiae* (groupe B), *Escherichia coli*, [entérovirus](#), plus rarement *Listeria monocytogenes*.
- **Chez le sujet âgé** : le [pneumocoque](#), le [méningocoque](#), *Streptococcus agalactiae*, plus rarement *Listeria monocytogenes*.
- **Entre ces deux périodes** : le pneumocoque, le méningocoque (surtout avant 25 ans) et les entérovirus.

(Image réseau EPIBAC article Emmanuelle Varon)

Selon l'histoire clinique :

Le terrain ou le statut immunitaire, d'autres micro-organismes sont à rechercher :

Mycobacterium tuberculosis
Leptospira spp.
Borrelia spp. (maladie de Lyme)
Arbovirus, Virus de la Dengue

3.2. Méningo-encéphalites

Les principaux micro-organismes responsables de méningo-encéphalites sont :

- *Listeria*, *M. tuberculosis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Borrelia* spp.
- Herpes viridaeae : HSV 1 et 2, VZV, CMV, EBV
- [Influenza](#)
- Rougeole

4. Quels sont les prélèvements pertinents à réaliser ?

La ponction lombaire (*cf. glossaire*) : le **LCR** est prélevé avec des conditions d'asepsie rigoureuses et adressé aux laboratoires de microbiologie et de biochimie.

La réalisation d'une hémoculture (*cf. glossaire*) systématique et éventuellement le sang à la recherche de certains virus si le LCR n'a pu être prélevé.

Possibilité de réaliser une biopsie cutanée (*cf. glossaire*) au niveau des pétéchies.

5. Paramètres biologiques du LCR utiles

Le diagnostic positif d'une méningite repose sur la numération des leucocytes et sur la protéinorachie qui sont anormalement élevées. La glycorachie peut être basse ou normale.

LCR NORMAL

Leucocytes : $<3-5 /\text{mm}^3$
Protéinorachie : $<0,3 \text{ g/l}$
Glycorachie : $>50\%$ de la glycémie

En cas de leucocytes élevés, une formule leucocytaire est réalisée ainsi qu'une coloration de Gram sur culot de centrifugation.

Selon leur valeur (*cf. glossaire*) , ces paramètres peuvent **orienter** le diagnostic étiologique entre méningite virale et méningite bactérienne.

Les micro-organismes systématiquement recherchés sont les bactéries les plus fréquentes qui peuvent être mis en évidence par culture usuelle : pneumocoque, méningocoque, *Listeria*, Streptocoque B, *E. coli*

Tous les autres micro-organismes – autres bactéries, virus, parasites - doivent faire l'objet d'une **demande spécifique**. Les renseignements cliniques accompagnant la demande peuvent utilement orienter les recherches faites par le microbiologiste.

Exemple de recherche spécifique :

- HSV
- Enterovirus
- Rougeole

LCR en faveur Méningite Bactérienne

Leucocytes : $>1000 /\text{mm}^3$
Formule : prédominance de polynucléaires
Protéinorachie : très élevée
Glycorachie : $<50 \%$ de la glycémie

LCR en faveur Méningite Virale

Leucocytes : 10 à 100 /mm³
Formule : prédominance de lymphocytes
Protéinorachie : modérément élevée
Glycorachie : >50 % de la glycémie

Cependant une méningite virale peut être au tout début de l'évolution avec une formule à polynucléaires.

Tous ces paramètres ne permettent qu'une **orientation étiologique**.

Seule la coloration de Gram, si elle visualise des bactéries permettra d'affirmer que la méningite est bactérienne et de plus permettra de s'orienter vers l'espèce bactérienne en cause.

Photo Gram 1: Neisseria meningitidis

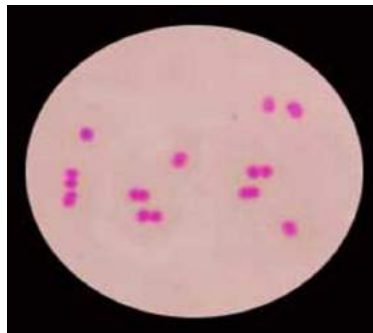


Photo Gram 2 : Listeria monocytogenes

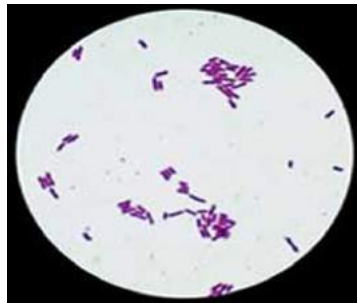


Photo Gram 3 : Streptococcus agalactiae

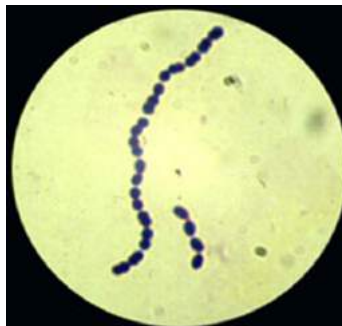


Photo Gram 4 : Escherichia coli

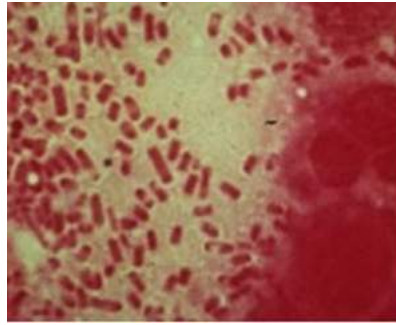


Photo Gram 5 : Borrelia burgdorferi



6. Pénétration des antimicrobiens

La pénétration des antibiotiques (*cf. glossaire*) dans l'espace sous-arachnoïdien est irrégulière et faible.

Les facteurs favorisant la diffusion des antibiotiques sont leur forte liposolubilité, leur faible degré d'ionisation, l'existence d'un gradient de pH entre le LCR et le sang, leur faible liaison aux protéines. Le facteur le plus important est l'inflammation méningée qui augmente la diffusion des antibiotiques.

Les facteurs défavorisants sont le poids moléculaire élevé et la structure complexe des antibiotiques.

Il apparaît indispensable de doser l'antibiotique dans le LCR et de comparer les concentrations obtenues avec celles dans le sérum et à la CMI du germe responsable (détermination d'un coefficient thérapeutique : concentration de l'antibiotique / CMI de la souche bactérienne).

Pénétration et concentration des antiviraux.

Annexes

Glossaire

- **antibiotiques** : Antiotiques à bonne diffusion méningée: chlramphénicol (> 50 % taux sériques), C3G, fluoroquinolones, sulfamides, imidazoles, fosfomycine. Diffusion méningée moyenne: pénicillines G (3-10 % taux sériques), pénicillines A (5-30 % taux sériques); carbapénèmes.
- **biopsie cutanée** : En présence d'un purpura, une biopsie de lésion cutanée peut être pratiquée afin de mettre en évidence l'agent pathogène par culture ou par amplification génique. N. meningitidis est mis en évidence à partir de ce type de prélèvement dans 60 % à 80 % des cas, et ce jusqu'à 24 h après le début d'une antibiothérapie.
- **hémoculture** : Dans le cadre d'un syndrome méningé fébrile, une hémoculture (au moins) doit être systématiquement prélevée (grade A). Les hémocultures sont positives dans 50 % à 75 % des cas de méningites bactériennes et peuvent être positives même si la culture du LCR est négative.
- **ponction lombaire** : En l'absence de contre-indication (hypertension intracrânienne, trouble majeur de la coagulation sanguine, infection locale au point de ponction), la ponction lombaire est réalisée en respectant une asepsie de type chirurgical. Le LCR est successivement recueilli dans 3 tubes stériles sans anticoagulant, numérotés 1, 2 et 3, destinés respectivement à l'examen biochimique et microbiologique. La quantité totale de LCR nécessaire est de 2 à 5 ml chez l'adulte et idéalement de 2 ml chez l'enfant. Des analyses complémentaires (mycobactéries, agent de la maladie de Lyme, virus, champignons, Toxoplasma, par exemple) nécessitent 1 à 2 ml supplémentaires. L'acheminement du LCR vers le laboratoire se fait sans délai afin que les résultats cytologiques, biochimiques et de la coloration de Gram soient communiqués dans l'heure qui suit le prélèvement. L'échantillon est maintenu avant son arrivée au laboratoire à une température de 20°C environ. Une partie du LCR en attente d'amplification génique peut être mis à + 4°C. Dans le contexte de la recherche de virus (entérovirus ou virus du groupe herpès), la recherche des génomes par PCR ou RT-PCR est le gold standard et a remplacé la culture ou la recherche d'antigènes. La réalisation doit en être rapide pour être utile à la prise en charge du patient (se référer au chapitre continuité des soins).
- **valeur** : - La formule cytologique d'une méningite bactérienne peut être panachée, voire lymphocytaire si le traitement par antibiotique est précoce ou la ponction lombaire réalisée très rapidement après les premiers symptômes; - Les méningites tuberculeuses, à Mycoplasma spp. ou à Brucella spp. sont lymphocytaires; - Une méningite infectieuse peut se présenter initialement avec un LCR «normal», c'est-à-dire sans pleiocytose, en cas de prélèvement précoce ou de certains déficits immunitaires; - Les méningites virales ont habituellement une formule à prédominance lymphocytaire; néanmoins, dans le cas des méningites à entérovirus, une prédominance de polynucléaires ou une formule panachée sont souvent observées, en particulier chez l'enfant; on peut observer une inversion de formule sur une deuxième ponction ultérieure dite «de contrôle» rarement faite en pratique car inutile dans ce contexte ; Les méningites à levures sont à majorité lymphocytaire, mais peuvent être pauvres en cellules lors d'un contexte d'aplasie médullaire, par exemple.

Démarche du diagnostic microbiologique d'une infection des voies respiratoires basses

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2012

Table des matières

1. Entités nosologiques pneumopathies / Bronchites.....	3
2. Physiopathologie : comment le micro-organisme parvient-il jusqu'au parenchyme pulmonaire ?.....	3
3. Eléments clinico-radiologiques permettant le diagnostic.....	5
3.1. Pneumonie.....	5
3.2. Bronchite aiguë	5
4. Agents étiologiques : Quels sont les microorganismes potentiellement responsables d'infections pulmonaires basses ?	6
4.1. Pneumopathies.....	6
4.1.1. Pneumopathies communautaires	6
4.1.2. Pneumopathies nosocomiales	6
4.2. Bronchites.....	6
4.2.1. Bronchites aiguës.....	6
4.2.2. Bronchite et processus toxinique	6
5. Prélèvements à réaliser.....	7
5.1. Prélèvements au niveau de l'arbre respiratoire	7
5.1.1. Prélèvement au niveau des voies respiratoire hautes (naso-pharynx)	7
5.1.2. L'écueil majeur+++ du prélèvement des voies respiratoires basses.....	7
5.2. Prélèvements « à distance » de l'arbre respiratoire.....	9
5.3. Diagnostic indirect.....	9
6. Antimicrobiens.....	9
7. Signalement - Hygiène.....	9

Objectifs ENC

- Connaître les éléments simples caractérisant les entités nosologiques : pneumopathie et bronchite.
- Connaître les éléments de bases de leur physiopathologie ayant des implications dans le diagnostic.
- Connaître les différents microorganismes responsables de pneumopathies et bronchites ; ceux qui sont recherchés systématiquement et ceux recherchés sur demande spécifique.
- Connaître les prélèvements pertinents pour la mise en évidence des microorganismes.
- Interprétation des résultats de ces prélèvements permettant un diagnostic positif et étiologique d'une pneumopathie.
- Connaître les caractéristiques essentielles de certains microorganismes (fiche synoptique) ayant des implications spécifiques sur la prévention, le diagnostic, et le traitement.
- Connaître les bases de l'antibiothérapie de 1ère intention et place des antiviraux dans les infections respiratoires basses et l'épidémiologie de la résistance des principaux pathogènes.
- Connaître les notions générales de prévention des infections respiratoires : précautions hygiène « air », « gouttelettes », vaccination....
- Connaître la chaîne épidémiologique.

1. Entités nosologiques pneumopathies / Bronchites

La **pneumopathie** touche le parenchyme pulmonaire, c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires et les structures organiques (tissus interstitiel) qui les entourent. Cette affection est principalement d'origine bactérienne.

La **bronchite** et la **bronchiolite**, par définition, touchent les bronches sans atteinte parenchymateuse. Elles sont principalement d'origine virale.

Une 3ème entité correspond à l'exacerbation aiguë sur des bronches pathologiques : **la bronchopathie chronique obstructive (BPCO), la dilatation des bronches, la mucoviscidose**. Elle est également fréquemment d'origine virale ou bactérienne.

2. Physiopathologie : comment le micro-organisme parvient-il jusqu'au parenchyme pulmonaire ?

Le mode d'acquisition varie suivant le pathogène impliqué.

Les voies de pénétration sont aériennes, rarement hématogène.

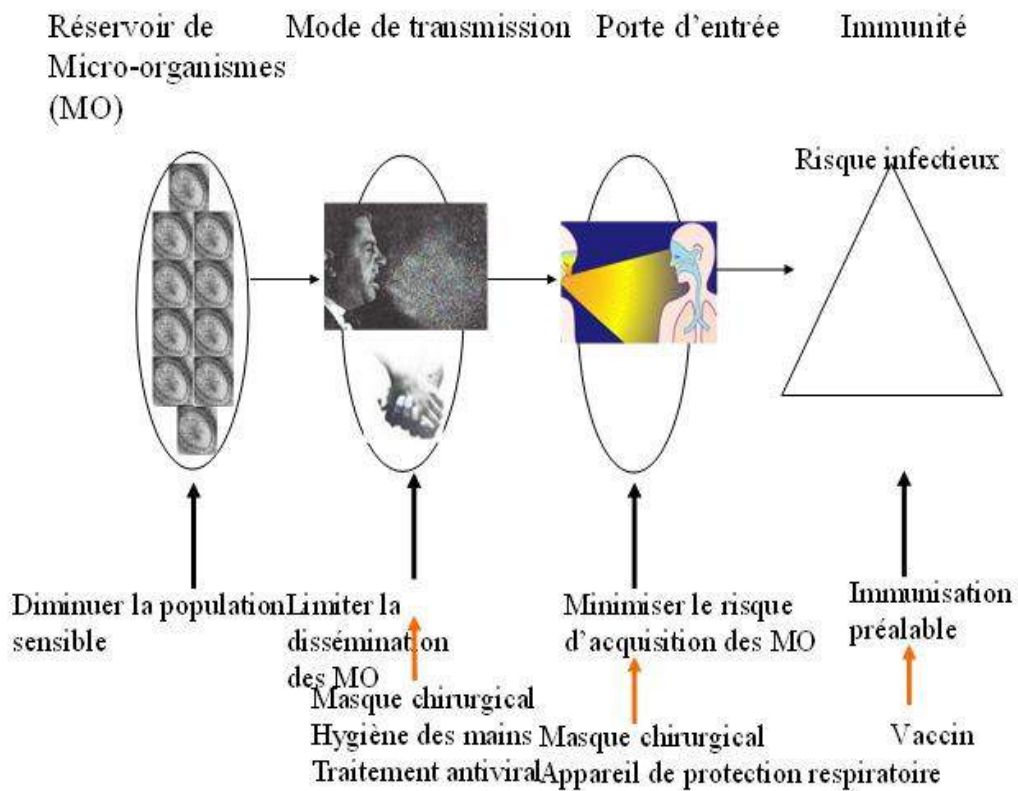
La plupart des infections résultent de l'aspiration d'organismes résidant dans les sécrétions nasopharyngées. L'infection peut également provenir de *l'inhalation de particules contaminées* provenant d'autres patients (infections virales), d'animaux (psittacose), de l'environnement (légiellose). Ces particules aériennes se déposent ensuite au niveau des bronchioles respiratoires ou des alvéoles. Elles peuvent ensuite être transportés par les canaux lymphatiques vers les ganglions lymphatiques régionaux et par la circulation sanguine vers des sites plus éloignés.

Les facteurs favorisant le développement d'une infection sont:

- altération du « l'escalator muco-cilié » qui est un mécanisme de défense essentiel de l'arbre respiratoire permettant un drainage trachéo-bronchique permanent de particules inhalées. Celui-ci peut être notamment altéré par:
 - des facteurs environnementaux : tabagisme, pollution, par exemple.
 - des agents infectieux : la grippe favorise la surinfection bactérienne.
- pathologies acquises ou congénital de l'arbre respiratoire : BPCO, mucoviscidose, cancers, par exemple.
- inhalation de salive ou de liquide gastrique (lors de comas, sondes gastriques, problèmes ORL, troubles neurologiques) entraînant une pneumopathie d'inhalation ou pneumopathie de déglutition.
- intubation : inhibition de la toux (perte de l'effet mécanique de drainage des sécrétions trachéales)
- immunodépression: VIH, cancers, personnes âgées, greffés, éthyliste, diabète sucré.

Figure 1 : Inhalation de particules contaminées

Limiter la transmission : ex grippe



3. Eléments clinico-radiologiques permettant le diagnostic

Tryptique : toux ± expectoration ± fièvre

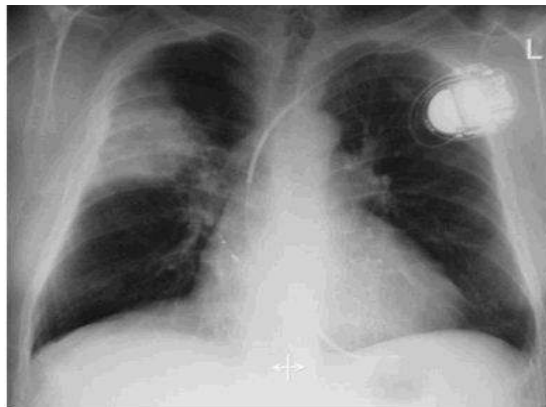
3.1. Pneumonie

Fièvre >38,5°C - douleur thoracique – râles crépitants en foyer

2 entités :

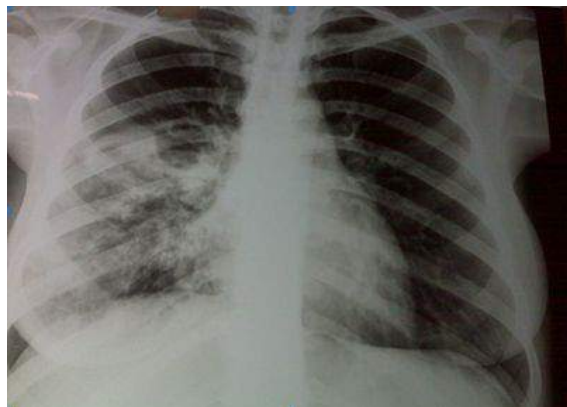
- Pneumopathies alvéolaires à foyer systématisé : pneumonie franche lobaire aiguë (PFLA).
- Pneumopathie interstitielle constituée d'opacités diffuses.

Figure 2 : Radiographie du thorax de face d'une pneumopathie franche lobaire aiguë



Ref : <http://epu95.nexenservices.com/epu95-enseignement-post-universitaire-montmorency/assets/files/archives-cr-reunion-pdf/cr-pneumologie-12/pneu-infections-respiratoires-01-11.htm>

Figure 3 : Radiographie du thorax de face d'une caverne tuberculeuse



Réf : <http://fr.wikinoticia.com/style%20de%20vie/beaut%C3%A9/111585-depistage-de-la-tuberculose>

3.2. Bronchite aiguë

Fièvre peu élevée – auscultation normale ou râles bronchiques diffus.

4. Agents étiologiques : Quels sont les microorganismes potentiellement responsables d'infections pulmonaires basses ?

L'épidémiologie des pneumopathies est différente de celle des bronchites.

L'épidémiologie varie selon l'âge du patient, le terrain, le statut immunitaire, l'origine géographique.

4.1. Pneumopathies

4.1.1. Pneumopathies communautaires

Pneumonie franche lobaire aiguë : *Streptococcus pneumoniae* (1ère cause+++), plus rarement : *Staphylococcus aureus*

Pneumopathies atypiques (interstitielles)

- *Mycoplasma pneumoniae* (la plus fréquente des pneumopathies atypiques, 2^{ème} cause de pneumonie communautaire)
- *Legionella pneumophila* (légiellose)
- *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*
- *Coxiella burnetii* (Fièvre Q)

Tuberculose

Rougeole

4.1.2. Pneumopathies nosocomiales

Pseudomonas aeruginosa, *S. aureus*, Entérobactéries (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*), anaérobies, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*

4.2. Bronchites

4.2.1. Bronchites aiguës

Virus influenzae+++ (Grippe), virus respiratoire syncytial+++ (bronchiolite du nourrisson), adénovirus, métapneumovirus.

*Principales bactéries responsables de surinfection bronchique: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (mucoviscidose+), *Staphylococcus aureus*.

4.2.2. Bronchite et processus toxinique

Coqueluche (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*).

5. Prélèvements à réaliser

La mise en évidence directe du pathogène peut être faite au niveau de l'arbre respiratoire lui-même ou dans certains cas « à distance » de l'arbre respiratoire. Pour certains pathogènes, il existe un diagnostic indirect : la sérologie.

5.1. Prélèvements au niveau de l'arbre respiratoire

5.1.1. Prélèvement au niveau des voies respiratoire hautes (naso-pharynx)

Certains pathogènes infectent tout l'arbre respiratoire et peuvent être présents au niveau du naso- ou de l'oro-pharynx. Lorsque ces pathogènes n'appartiennent pas à la flore commensale (pathogène strict), leur recherche directe qui doit être spécifiée peut être réalisée sur un simple prélèvement naso-ou oro-pharyngé (écouvillon ou aspiration) :

- Virus : influenza, VRS, adénovirus
- Bactérie : *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*

5.1.2. L'écueil majeur+++ du prélèvement des voies respiratoires basses

L'écueil majeur+++ du prélèvement des **voies respiratoires basses** en bactériologie est sa contamination par la flore commensale oro-pharyngée. Pour optimiser son rendement cette contamination doit être minimale++ et son interprétation repose sur une analyse quantitative des cultures (sauf si le pathogène est un pathogène strict comme le bacille tuberculeux).

Certains pathogènes peuvent être recherchés par PCR ou par culture ou les deux (cf fiches synoptiques) ou encore par des tests rapides (TDR Grippe).

Plusieurs prélèvements pulmonaires possibles :

- *Examen cyto-bactériologique* du crachat (ECBC) : souvent contaminé par la salive
- *Aspiration endotrachéale* (ou bronchique) : risque de contamination par flore salivaire
- *Prélèvement distal protégé* et le brossage au cours d'une fibroscopie ;
- *Liquide de lavage broncho-alvéolaire* (LBA) au cours d'une fibroscopie.

Le résultat de l'examen direct réalisé au cours d'un LBA est d'une plus grande importance comparée à celui d'un ECBC. Dans ce dernier cas, une flore monomorphe présente un intérêt diagnostique.

Figure 4 : Examen cyto-bactériologique

Prélèvements	Principes	Critères d'interprétation			
		Classes	Cellules		Interprétation
Expectoration (ECBC)	Non invasif. Prélèvement à réaliser le matin, au réveil, après rinçage bucco-dentaire à l'eau distillée stérile et lors d'un effort de toux, aidé si besoin d'une kinésithérapie.		épithéliales	leucocytes	
		1	>25	<10	A refaire
		2	>25	10-25	
		3	>25	>25	
		4	10-25	>25	Interprétable
5	<10	>25			

Un seuil de 10^7 UFC/ml est considéré comme significatif avec 1 ou 2 espèces identifiées uniquement.

Figure 5 : Aspiration endotrachéale

Prélèvements	Principes	Critères d'interprétation
Aspiration endotrachéale ou bronchique	Non invasif Utilisation d'une sonde ou d'un fibroscope afin d'évacuer les sécrétions produites par la muqueuse de la trachée ou des bronches. Elle peut être réalisée par la sonde d'intubation	Les prélèvementsensemencés sont ceux contenant des bactéries visibles au microscope ou contenant moins de 10 cellules épithéliales par champ microscopique. Un seuil de 10^5 UFC/ml est considéré comme significatif.

Figure 6 : Prélèvement distal protégé

Prélèvements	Principes	Critères d'interprétation
Prélèvement distal protégé	Invasif. Brosse (dispositif de Wimberley) télescopique glissée au travers d'un fibroscope et dirigée sous contrôle de la vue dans une petite bronche de 4 ^{ème} ordre drainant le territoire pulmonaire radiologiquement suspect. Le cathéter interne est alors poussé, expulsant le bouchon et permettant d'avancer la brosse de quelques centimètres, pour réaliser le prélèvement bactériologique. Le cathéter interne est désinfecté par de l'alcool à 90°C, puis on fait sortir la brosse interne et on la coupe avec des ciseaux stériles pour qu'elle tombe dans 1 ml de liquide (eau physiologique tamponnée stérile ou liquide de Ringer) que l'on agite sur place au lit du malade (agitation mécanique de type vortex) pendant 2 min.	Un seuil de 10^3 UFC/ml est considéré comme significatif. Le seuil de significativité peut être abaissé à 5.10^2 UFC/ml notamment chez les malades recevant des antibiotiques.

Figure 7 : Liquide de lavage broncho-alvéolaire

Prélèvements	Principes	Critères d'interprétation
LBA	Invasif. Instillation après blocage du broncho-fibroscope dans une bronche segmentaire ou sous-segmentaire des échantillons de 50 ml de sérum physiologique (à 37°C) 4 à 6 fois et on ramène entre 20 et 60 % de la quantité injectée.	Un dénombrement des germes banals supérieur à 10^4 UFC/ml est généralement considéré comme significatif d'une pneumonie.

5.2. Prélèvements « à distance » de l'arbre respiratoire

- Hémocultures : Dans les cas de pneumopathies graves, il y peut y avoir une bactériémie. On peut donc réaliser des hémocultures (3 hémocultures aéro-anaérobies à au moins 1 h d'intervalle).
- Ponction pleurale : peut permettre de documenter l'étiologie de la pneumopathie.
- Antigènes urinaires par immuno-chromatographie : en cas de suspicion de pneumocoques, légionelles+++.

5.3. Diagnostic indirect

Sérologie (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burnetii*), intra-dermo-réaction, test interferon in vitro (tuberculose).

6. Antimicrobiens

Les 2 principales familles d'antibiotiques utilisées dans les pneumopathies aiguës communautaires (PAC) sont :

- les β -lactamines +++ (amoxicilline+++ , amoxicilline et acide clavulanique, céfotaxime...) ;
- les macrolides et apparentés +++ (érythromycine, azithromycine).

Plus rarement, les fluoroquinolones sont utilisées (ciprofloxacine, lévofloxacine) et les cyclines (doxycycline).

Dans les PAC, le pneumocoque étant le 1^{er} pathogène responsable, l'antibiotique de 1^{ère} intention est l'amoxicilline qui reste actif même sur les souches de sensibilité diminuée aux β -lactamines.

En cas d'échec (absence d'apyrexie à 48h) ou en 1^{ère} intention si le tableau est très évocateur d'infection à bactéries atypiques, un macrolide sera prescrit.

Il est à noter que :

- le traitement d'une PAC est différent du traitement d'une pneumopathie nosocomiale,
- si la pneumopathie est sévère, aucun pari thérapeutique ne peut être entrepris. Un traitement à large spectre doit être mis en première intention

Au cours des affections virales, le traitement est :

- symptomatique, avec hospitalisation lors des formes graves,
- anti-viraux lors d'épisode grippal:
 - oseltamivir (Tamiflu) et zanamivir (Relenza) : inhibiteurs de la neuraminidase N, empêchent la libération des nouveaux virions à partir des cellules infectées.
 - actifs sur les virus grippaux A et B.
 - dans les 48 premières heures et en prévention.

7. Signalement - Hygiène

Précautions d'hygiène de type « gouttelettes » ou « air » si suspicion tuberculose, rougeole, varicelle

Kinésithérapie en cas de mucoviscidose, de dilatations des bronches, ou d'exacerbation.

Démarche du diagnostic microbiologique d'une tuberculose

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2013

Table des matières

1. Agents étiologiques.....	4
2. Physiopathologie.....	4
2.1. Formation du granulome.....	4
2.2. Evolution de la nécrose caséuse.....	8
3. Mode de transmission du complexe tuberculosis.....	9
4. Epidémiologie.....	10
4.1. Dans le monde.....	10
4.2. En France.....	11
5. Diagnostic clinico-radiologique.....	12
5.1. Signes cliniques.....	12
5.2. Radiologie pulmonaire.....	13
6. Prélèvements à réaliser.....	14
6.1. Arbre respiratoire.....	14
6.2. Autres sites anatomiques.....	14
7. Diagnostic bactériologique.....	14
7.1. Diagnostic direct.....	14
7.2. Diagnostic indirect.....	15
7.2.1. Diagnostic de l'infection latente par intradermoréaction à la tuberculine.....	15
7.2.2. Diagnostic de l'infection latente par les tests de libération d'IFN γ (tests IGRA).....	15
8. Antituberculeux.....	16
9. Prophylaxie – Déclaration.....	17
10. Mesures d'hygiène pour la prise en charge d'un cas de tuberculose.....	17

Objectifs ENC

- Programme 2ème cycle (Bulletin officiel n° 20 du 16 mai 2013)

Unité d'enseignement 6. Maladies transmissibles - Risques sanitaires - Santé au travail

Objectifs N° 155. Tuberculose de l'adulte et de l'enfant :

- Connaître les populations à risque de tuberculose et l'épidémiologie de la résistance du BK
- Connaître les indications et savoir interpréter une IDR à la tuberculine, un test interféron gamma
- Diagnostiquer une primo infection tuberculeuse, une tuberculose dans ses différentes localisations et chez l'immunodéprimé.
- Connaître les principes du traitement d'une tuberculose dans ses différentes localisations, et de sa surveillance notamment de l'observance.
- Connaître les mesures de prévention à appliquer dans l'entourage d'un patient atteint de tuberculose.

1. Agents étiologiques

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse contagieuse à prédominance respiratoire. Ses agents étiologiques sont des **mycobactéries** du complexe *tuberculosis* regroupant comme espèces les plus fréquentes ***Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* et *M. bovis***. Il s'agit d'une maladie dont le principal réservoir et l'agent de transmission est l'homme.

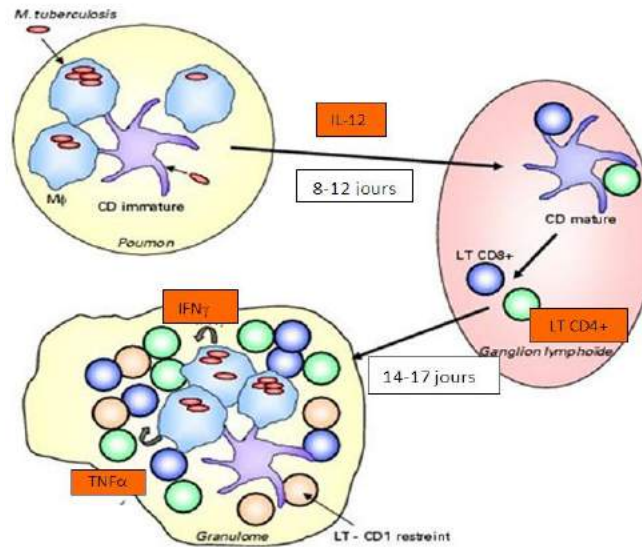
2. Physiopathologie

2.1. Formation du granulome

Une fois que le bacille tuberculeux inhalé, a atteint les alvéoles, il est reconnu grâce à des constituants de sa paroi et est **phagocyté** par différentes cellules immunitaires : les **macrophages alvéolaires**, les **cellules dendritiques** qui sont des cellules présentatrices d'antigène et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules constituent la **1^{ère} barrière de défense non spécifique** (immunité innée). Le bacille tuberculeux a des facteurs de virulence qui lui permettent de **survivre dans les cellules phagocytaires**.

Une autre caractéristique du bacille de la tuberculose est de **retarder la mise en place de l'immunité spécifique** (immunité adaptative) qui, dans le cadre de la tuberculose, est essentiellement une **réponse de type cellulaire**. Les **lymphocytes T CD4⁺** et 3 cytokines et/ou interleukines : **Tumor Necrosis Factor α (TNF α)**, **Interféron γ (IFN γ)** et **l'interleukine 12 (IL12)** sont des acteurs majeurs pour contrôler l'infection tuberculeuse (**Figure 1**). Ainsi, les pathologies diminuant le taux de LT CD4+ (infection par le VIH), le taux de TNF α (traitement par anti-TNF α de pathologies auto-immunes) augmentent considérablement le risque de développer une tuberculose.

Figure 1 : Réponse immunitaire à l'infection par le bacille tuberculeux



D'après Herrmann et coll (2006)

Figure 1 : Réponse immunitaire à l'infection par le bacille tuberculeux. Circulation du bacille tuberculeux du poumon vers le ganglion relais par l'intermédiaire des cellules dendritiques (migration sous la dépendance de l'IL12) → différenciation des LT naïfs en LT CD4⁺ et CD8⁺ qui rejoignent **la lésion pulmonaire initiale (Figure 4 "Formation de la lésion initiale primaire")** pour participer à la **formation du granulome (Figure 5 "Organisation du granulome primaire")**.

La migration des cellules dendritiques (CD) infectées par le bacille tuberculeux (cellule dendritique activée) vers le **ganglion relais** n'apparaît qu'au bout d'une dizaine de jours après l'inoculation. Les cellules dendritiques activées participent à la **maturation des lymphocytes T (LT) naïfs** du ganglion en **CD4⁺ et CD8⁺**. Là encore, l'induction de la **réponse immunitaire à médiation cellulaire est retardée** (délai de maturation 15 jours environ).

En gagnant les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques ayant phagocytés le bacille tuberculeux, participent à sa **dissémination par voie lymphatique** au même titre que les polynucléaires neutrophiles le font par **voie sanguine**. Cette dissémination est à l'origine des **formes extra-pulmonaires (Figure 2)** voire disséminée de la TB et est favorisée par l'immunodépression. La forme ganglionnaire (**Figure 3**) est la forme extra-pulmonaire la plus fréquente.

Figure 2 : Localisations anatomiques les plus fréquentes du bacille tuberculeux après dissémination par voie sanguine et lymphatique à partir de la lésion initiale pulmonaire

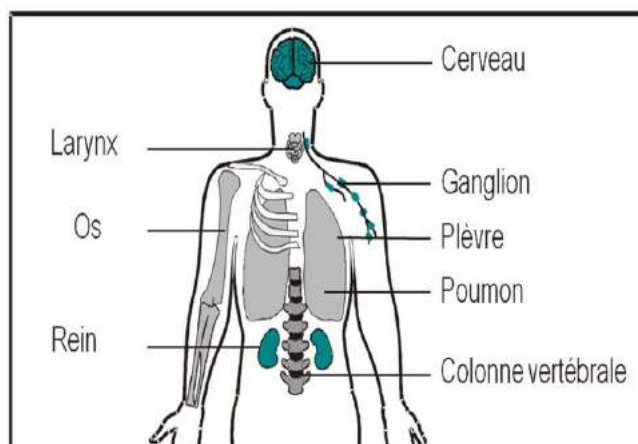
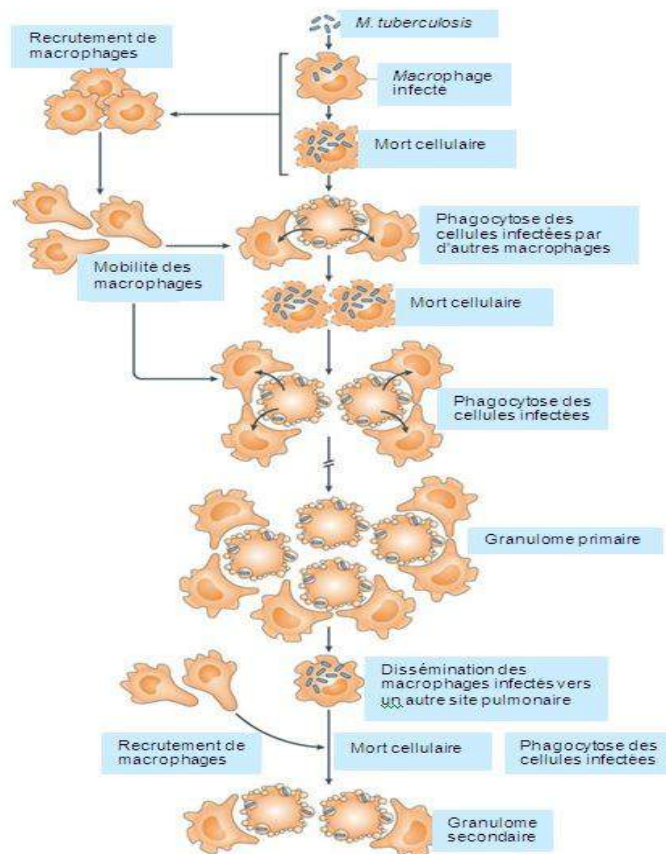


Figure 3 : Adénopathie cervicale volumineuse (J. Mazza-Staldera, 2012)



L'induction retardée de la réponse immunitaire adaptative permet au **bacille tuberculeux** de continuer de se multiplier dans le poumon et dans le ganglion relais et d'atteindre une **masse critique** qui forme la **lésion initiale pulmonaire (granulome primaire)** (Figure 4)

Figure 4 : Formation de la lésion initiale primaire



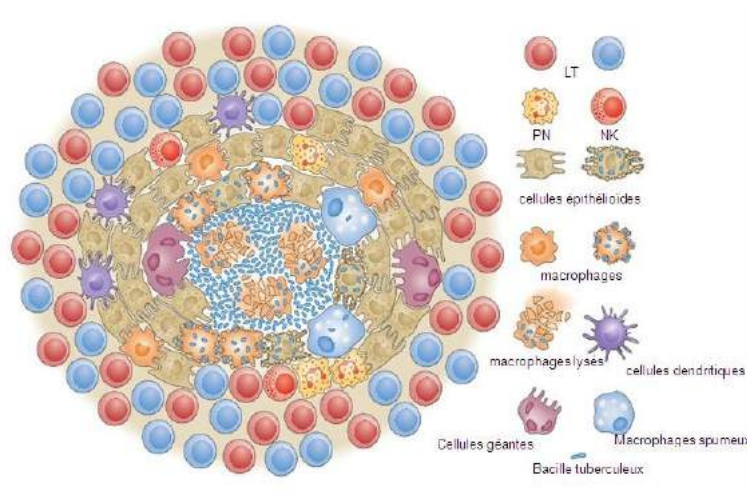
D'après Ramakrishnan, 2009

Figure 4 : Formation de la lésion initiale primaire. La multiplication du bacille au sein des cellules phagocytaires aboutit à la **mort de ces cellules** qui sont phagocytées par de nouveaux macrophages qui ont été recrutés au site de l'infection. Cette **succession de cycles de multiplication intracellulaire du bacille tuberculeux et de mort cellulaire** aboutit à la formation d'une lésion initiale pulmonaire (**granulome primaire**). Des macrophages infectés vont essaimer du granulome primaire pour donner des granulomes secondaires.

L'**infiltration** tardive (4 à 6 semaines après l'inoculation) du granulome primaire par les **CD4⁺ et CD8⁺** va

aboutir à la formation d'un granulome plus large et plus organisé pour contenir l'infection (**Figure 5**). L'induction de la réponse immunitaire cellulaire est contemporaine de l'apparition de la **nécrose caséuse** (*cf. glossaire*) qui est très évocatrice d'une infection par le bacille de la tuberculose sur les coupes histologiques (**Figure 6**).

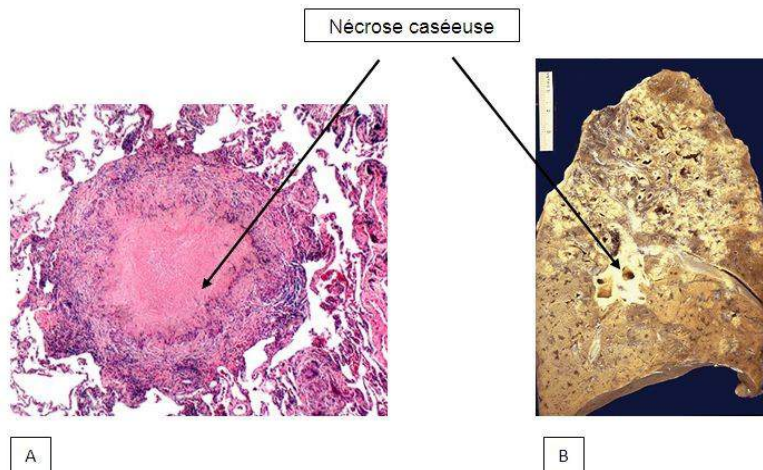
Figure 5 : Organisation du granulome primaire



D'après Ramakrishnan, 2009

Figure 5 : Organisation du granulome primaire. Au centre : les macrophages, **cellules épithélioïdes** (macrophages activés sécrétant de cytokines et d'enzymes), macrophages différenciés en cellules géantes multinucléées ou **cellules de Langhans**, qui correspondent à la fusion de cellules épithélioïdes et de macrophages), macrophages spumeux (chargés de vacuoles lipidiques) qui sont au bord du foyer de nécrose caséuse. Des bacilles tuberculeux sont présents dans la **nécrose caséuse** (**Figure 6**) mais, leur métabolisme est ralenti (phase de dormance). D'autres cellules sont présentes dans le granulome, les polynucléaires neutrophiles (PN), des cellules dendritiques, des cellules natural killer (NK). En périphérie : couronne de **lymphocytes** CD4⁺ et CD8⁺ et de fibroblastes qui forment une sorte de capsule. C'est une zone beaucoup mieux oxygénée → multiplication active du bacille tuberculeux en périphérie du granulome.

Figure 6 : A. Coupe histologique d'un granulome avec au centre un dépôt anhiste correspondant à la nécrose caséuse. B. Aspect macroscopique du tissu pulmonaire avec plusieurs foyers de nécrose caséuse (lésions blanchâtres disséminées)



Le **développement du granulome est asymptomatique** (aucun signe clinique et radiologique). La seule manifestation est le **virage des réactions cutanées à la tuberculine** (extrait protéique de bacille tuberculeux) après intradermo réaction de Mantoux ([Figure 17 "Inoculation de la tuberculine par voie intradermique à la face antérieure de l'avant bras"](#)) ou la **positivité des tests IGRA** (Quantiféron® et TspotTB® qui explorent la production d'IFN γ de l'individu en réponse à des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*). Ces tests immunologiques positifs traduisent la **réaction d'hypersensibilité retardée** mise en place au cours de l'infection tuberculeuse (**Phénomène de Koch (cf. glossaire)**).

2.2. Evolution de la nécrose caséuse

Dans **90 %** des cas, **l'infection est maîtrisée par la réaction immunitaire de l'individu**. Les petits foyers de nécrose caséuse s'entourent de sclérose progressivement, le nombre de bacilles décroît et le foyer se calcifie (calcifications parfois visibles à la radiographie). Les foyers de plus grande taille peuvent persister des années, voire même toute la vie. Les **bacilles** dans ces foyers **persistent** mais ne se multiplient pas activement. Ils ont un métabolisme ralenti (bacilles dormants). On parle d'**infection tuberculeuse latente**.

Dans **les 10 % de cas restant**, l'infection n'est pas maîtrisée et le bacille continue de se multiplier → phase de progression rapide vers **la maladie tuberculeuse** immédiatement après l'infection ou au contraire après une **phase de latence** qui peut durer plusieurs années. On estime que le risque cumulé de développer une TB maladie est **de 10% sur toute une vie**. La moitié des cas de TB maladie surviennent dans les 2 ans qui suivent le contage. Les personnes immunodéprimées sont plus à risque de développer une TB maladie (**Tableau 1**)

Tableau 1 : Facteurs qui augmentent le risque d'évoluer vers une TB maladie en cas d'infection tuberculeuse latente

Facteurs de risque
Infection par le VIH : 40% de risque de développer une TB maladie après infection en général dans la continuité de la PIF
Age < 5 ans
Infection récente par le bacille tuberculeux (< 2 ans)
Traitement immunosuppresseur : anti TNF α , corticothérapie prolongée par voie systémique (\geq 15 mg de prednisone/ jour)
Transplantation d'organe
Insuffisance rénale chronique, diabète, malnutrition
Cancer, leucémie
Silicose, tabagisme
Ethylisme, toxicomanie

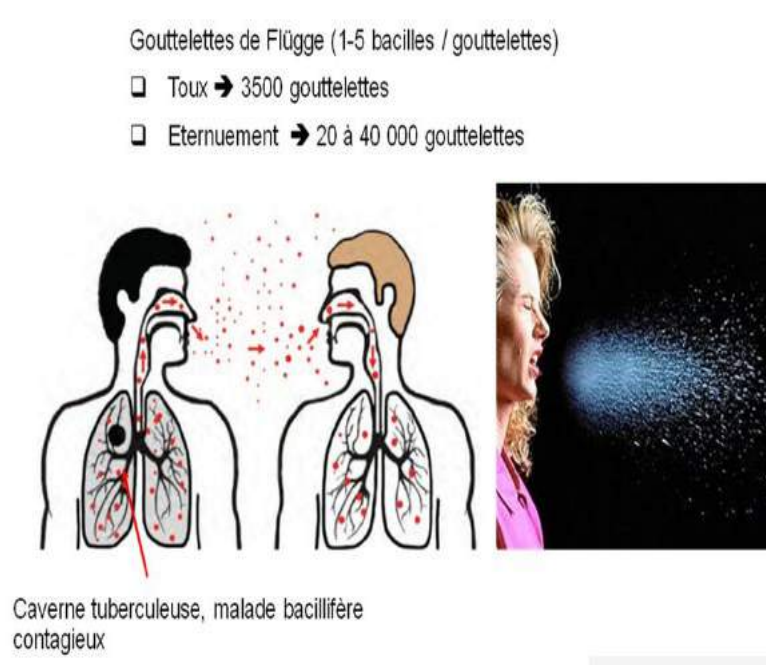
La **nécrose caséuse** s'accumule dans le granulome et se **ramollit** ce qui aboutit à la nécrose et au collapsus du granulome avec la formation d'une caverne pulmonaire. Cette caverne peut s'ouvrir dans une bronche. A partir des **lésions cavitaires ouvertes**, les bacilles vont être dispersés à l'occasion de la toux dans l'air pour contaminer d'autres personnes. La caverne étant bien oxygénée, elle va être le siège d'une **multiplication intense** du bacille tuberculeux. En effet, le bacille tuberculeux est une bactérie aérobie stricte. Sa **multiplication est fonction de la tension en oxygène du milieu environnant**. Il va donc se multiplier bien plus rapidement dans une caverne pulmonaire bien oxygénée que dans les tissus profonds. Ceci explique que les formes extra-pulmonaires de TB sont rarement riches en bacilles à la différence de la caverne pulmonaire qui contient environ 10⁸ bacille tuberculeux.

3. Mode de transmission du complexe tuberculosis

A l'exception de *M. bovis* qui peut-être transmis par ingestion de produits laitiers contaminés, la transmission de *M. tuberculosis* et de son variant africain *M. africanum* est aérienne ce qui explique qu'environ 80% des cas de TB sont des formes pulmonaires.

A l'occasion de la toux, de la parole et de l'éternuement, le malade ayant une tuberculose pulmonaire excavée, (**malade bacillifère ou malade contagieux (cf. glossaire)**) émet des micro-gouttelettes de mucus (**gouttelettes de Flügge**) qui contiennent des bacilles tuberculeux (1 à 3 bacilles/gouttelette) (**Figure 7**). Ces micro-gouttelettes se dessèchent très rapidement → noyaux de condensation (droplets nuclei de Wells). Les droplet nuclei sont capables de rester en **suspension dans l'air pendant plusieurs heures** (environ 6 heures) et, sont inhalés par les sujets en contact avec la source d'infection. Les droplet-nuclei les plus petites (1-3 µm de diamètre) ne sont pas éliminées par le tapis muco-ciliaire et traversent l'appareil respiratoire, les bacilles atteignent ainsi **l'alvéole pulmonaire** où ils seront phagocytés par les cellules immunitaires.

Figure 7 : Transmission aérienne du bacille tuberculeux lors de l'émission de gouttelettes de Flügge par un malade tuberculeux bacillifère



Le risque de transmission est plus élevé dans une atmosphère confinée et si les contacts sont répétés et durables (**Tableau 2**). Ceci explique les épidémies survenues dans des espaces confinés (sous-marin, discothèque...) lors de contacts répétés avec une source de contamination et, le risque maximal de contamination chez les contacts vivant au domicile des malades bacillifères.

Tableau 2

Facteurs de risque	
Facteurs clinique	<p>Toux persistante</p> <p>Atteinte laryngée</p> <p>Traitement antituberculeux inadapté ou retardé</p>

Manœuvres instrumentales provoquant la toux	Induction d'expectorations - Bronchoscopie - Administration d'aérosols
Facteurs radiologiques	Caverne à la radiographie du thorax
Bactériologiques	Présence de BAAR visibles à l'examen microscopique, plus le nombre de BAAR est élevé plus la personne est contagieuse (cf. fiche synoptique mycobactéries)

4. Epidémiologie

4.1. Dans le monde

On estime qu'un **1/3 de la population mondiale est infectée** (stade infection tuberculeuse latente) par le bacille tuberculeux. En 2011, **6 millions de nouveaux cas de tuberculose maladie** (nombre de nouveaux cas estimés = 9 millions) ont été notifiés à l'OMS dont environ la moitié sont des cas contagieux (<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>).

L'incidence mondiale de la maladie est de 137/100 000 h avec **de fortes disparités géographiques** → 40% et 26% des cas de tuberculose sont répertoriés en Afrique et en Asie du sud-est, respectivement.

Co-infection par le VIH : 13% des cas de tuberculose, **superposition de l'infection à VIH et de l'infection tuberculeuse en Afrique.**

Figure 8 : Nombre de cas estimés de tuberculose dans le monde en 2011 (OMS rapport 2012)

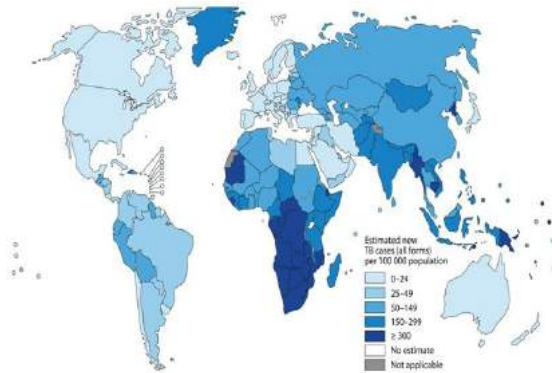
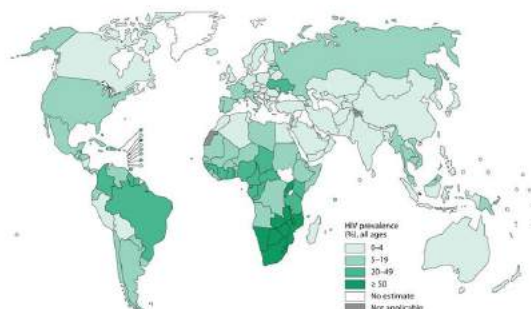
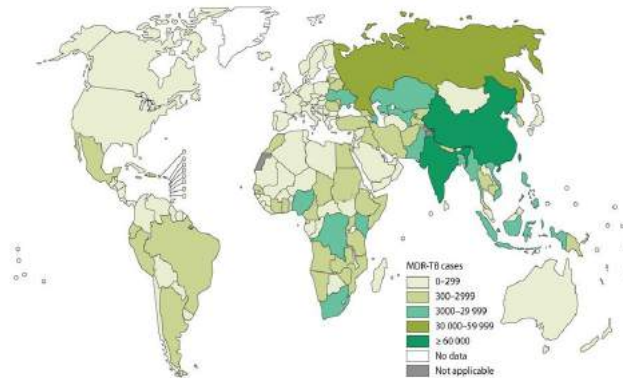


Figure 9 : Estimation de la prévalence de l'infection par le VIH parmi les nouveaux cas de tuberculose en 2011 (OMS rapport 2012)



La mortalité est de 1,4 millions de décès par an. Malgré ce chiffre élevé de mortalité, la situation épidémiologique s'améliore puisque la mortalité a été réduite de 41% par rapport à 1990, c'est-à-dire depuis la mise en place par l'OMS d'une stratégie mondiale de lutte antituberculeuse. Néanmoins, l'apparition et la diffusion de souches multirésistantes aux antituberculeux est préoccupante. Ces souches prédominent en Asie centrale, Chine, Inde et Fédération de Russie. Le pronostic d'une tuberculose multirésistante est mauvais, équivalent à une tuberculose à bacilles sensibles non traitée : 50% de décès.

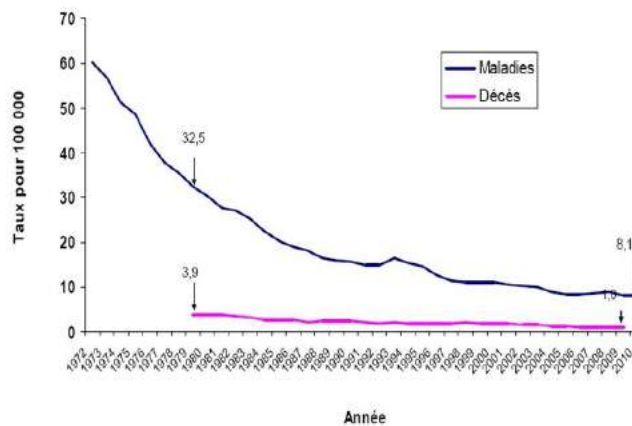
Figure 10 : Nombre de cas estimés de tuberculose multirésistante parmi les cas de tuberculose notifiés en 2011 (OMS rapport 2012)



4.2. En France

En France comme dans l'ensemble des pays industrialisés, l'incidence de la tuberculose est en constante diminution depuis plus d'un siècle. La France est considérée comme un pays à faible incidence (incidence 8,1/100 000 h soit 5187 cas déclarés en 2010).

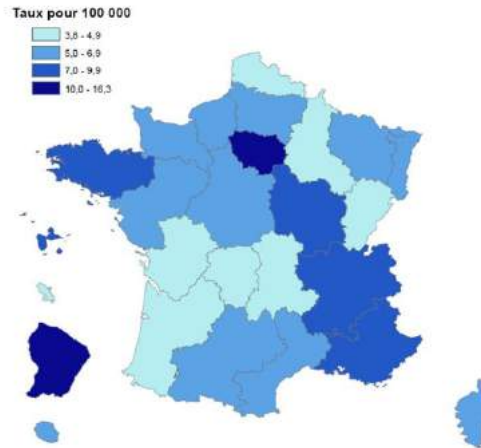
Figure 11 : Incidence de la tuberculose (courbe en bleue) et mortalité attribuable (courbe rose) en France métropolitaine entre 1972 et 2010



Sources : l'InVS (déclaration obligatoire de tuberculose) et INSERM (CépiDc).

Néanmoins, de fortes disparités persistent avec une incidence élevée en Ile-de-France et en Guyane et dans certains groupes de populations (personnes sans domicile fixe, migrants de pays à forte prévalence de tuberculose).

Figure 12 : Taux de déclaration de tuberculose par région française en 2010



Sources InVS (déclaration obligatoire de tuberculose) et INSEE (estimations localisées de population).

Concernant la multirésistance aux antituberculeux, le nombre moyen de cas est relativement constant depuis le début de la surveillance (1992). Il est d'environ 50 cas soit, une proportion de ~ 1% de souches. La France fait partie des pays à faible prévalence de multirésistance.

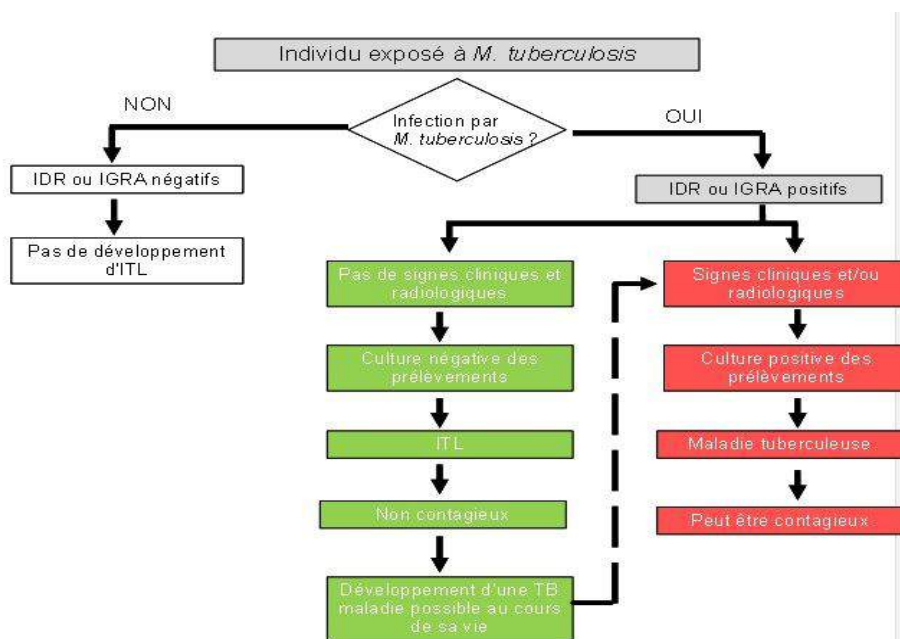
5. Diagnostic clinico-radiologique

5.1. Signes cliniques

Les signes cliniques de la tuberculose maladie sont une association d'altération de l'état général avec une perte de poids, parfois > 10 kg, une fiébricule à prédominance nocturne, des sueurs nocturnes, une toux et éventuellement des hémoptysies.

En raison de la lenteur de multiplication du bacille (temps de dédoublement d'environ 20 h), **la maladie tuberculeuse est lentement évolutive**. L'infection tuberculeuse latente est asymptomatique (Figure 13).

Figure 13 : Devenir du bacille tuberculeux chez les individus exposés



5.2. Radiologie pulmonaire

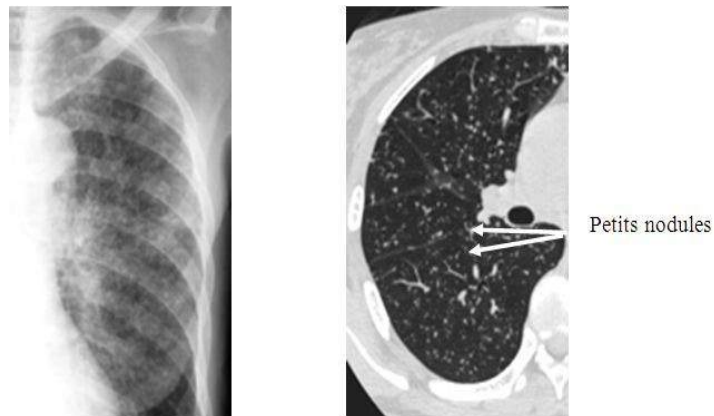
En cas de TB maladie, trois types de lésions évocatrices du diagnostic : caverne (**Figure 14**), nodules (**Figure 15**) et infiltrats (**Figure 16**). Ces 3 lésions peuvent être associées et siègent préférentiellement dans les segments supérieurs ou postérieurs du poumon où la teneur en oxygène est la plus élevée car le bacille tuberculeux est une bactérie aérobie stricte.

Figure 14 : Caverne



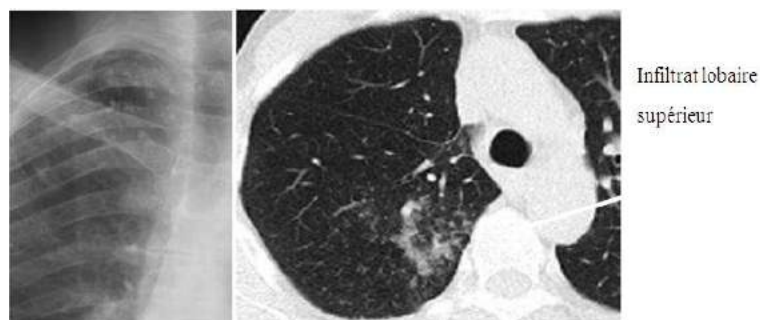
Respir.com est un site gratuit mis en ligne pour tous par la FGLMR

Figure 15 : Miliare tuberculeuse : multiple petits nodules de 2–3-mm



(Burill et coll. RadioGraphics 2007)

Figure 16 : Infiltrats



6. Prélèvements à réaliser

6.1. Arbre respiratoire

Le diagnostic de certitude de la tuberculose pulmonaire repose sur la mise en évidence de *M. tuberculosis* dans les prélèvements à visée respiratoire. **L'émission des bacilles tuberculeux étant intermittente**, il faut **répéter les prélèvements** non invasifs : recueil de 3 crachats si émission spontanée ou si pas de crachats spontanés → 3 tubages gastriques de préférence le matin (recueil de crachats déglutis pendant la nuit).

En cas de fibroscopie bronchique, aspiration des sécrétions et recueil des crachats post-fibroscopie.

6.2. Autres sites anatomiques

Pour les localisations extra-pulmonaires : urines (typiquement il y a une leucocyturie à culture négative sur les milieux usuels de bactériologie), liquide de ponction des séreuses, biopsies tissulaires. **Ne seront répétés que les prélèvements non invasifs**, par exemples les urines (3 prélèvements sur 3 jours).

7. Diagnostic bactériologique

7.1. Diagnostic direct

IMPORTANT

Spécifier sur l'ordonnance la recherche de mycobactéries pour que l'examen microscopique par coloration de Ziehl-Neelsen et la culture sur milieu adapté à la recherche de mycobactéries soient réalisés +++.

L'**examen microscopique** des produits d'expectoration est **fondamental**. Il permet **rapidement** de mettre en évidence des **BAAR (cf. glossaire)** ([cf. fiche synoptique mycobactéries](#)) ce qui traduit la contagiosité du malade et permet un diagnostic de forte présomption de TB s'il est positif (détection d'environ la moitié des cas de TB pulmonaire).

La culture sur milieu adapté **confirme le diagnostic** de TB et permet de réaliser un **antibiogramme**. En raison de la lenteur de multiplication du bacille tuberculeux (temps de doublement d'environ 20 h) et la croissance rapide des autres bactéries éventuellement associées, les produits pathologiques susceptibles d'être contaminés par une flore commensale doivent être **décontaminés** avant d'être ensemencés. Le **délai** d'obtention de la culture est **d'environ 3 à 4 semaines** en milieu solide de Löwenstein-Jensen et de 10-15 jours en milieu liquide. Ce délai est d'autant plus réduit que le prélèvement mis en culture est riche en bacilles.

L'identification des mycobactéries du complexe *tuberculosis* se fait par détection d'antigène spécifique ou par biologie moléculaire.

L'**amplification génique** par PCR du **complexe tuberculosis directement** dans les **prélèvements à visée diagnostique** s'avère particulièrement sensible et spécifique dans les prélèvements respiratoires positifs à l'examen microscopique (sensibilité et spécificité voisines de 100%). Elle est **un peu moins sensible** dans les **prélèvements respiratoires négatifs** à l'examen microscopique (sensibilité entre 70-80%, taux de faux négatifs entre 20 et 30%). Dans les **formes extra-pulmonaires de TB** qui sont souvent **pauci-bacillaires** la **sensibilité de la PCR est encore plus faible** (environ 50 à 60%, taux de faux négatifs entre 50 et 40%).

IMPORTANT

Une PCR négative n'exclut pas le diagnostic de tuberculose ++++.

7.2. Diagnostic indirect

Il n'existe pas de sérodiagnostic fiable de la tuberculose.

7.2.1. Diagnostic de l'infection latente par intradermoréaction à la tuberculine

Figure 17 : Inoculation de la tuberculine par voie intradermique à la face antérieure de l'avant bras



Figure 17. Inoculation de la tuberculine par voie intradermique à la face antérieure de l'avant bras. Le résultat est lu par mesure du diamètre d'induration (en mm) selon le plus grand diamètre au point d'injection à la 72^{ème} heure après l'inoculation. La rougeur n'est pas prise en compte. Le développement de l'**induration** est lent (hypersensibilité retardée, elle prend 48 à 72 heures). L'induration est liée à l'infiltration de la peau par les macrophages et les LT. La positivité de l'IDR témoigne d'un contact avec le bacille tuberculeux ou une vaccination par le BCG.

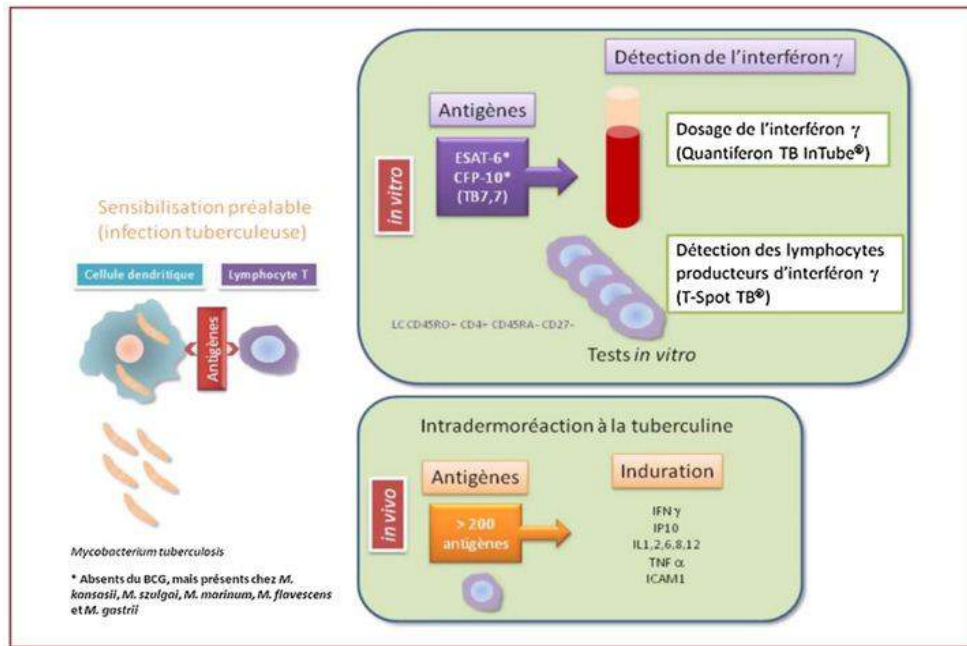
Trois situations peuvent se présenter de signification clinique variable :

- < 5 mm IDR négative
- 5-15 mm IDR positive mais zone d'incertitude à interpréter en fonction de la notion de vaccination par le BCG ou la probabilité d'infection récente ou d'immunodépression.
- > 15 mm IDR positive, infection certaine.

7.2.2. Diagnostic de l'infection latente par les tests de libération d'IFN γ (tests IGRA)

Diagnostic de l'infection latente par les tests de libération d'IFN γ (tests IGRA) réalisé à partir d'un tube de sang chez les personnes exposées aux bacilles tuberculeux. Consiste à doser l'IFN γ ou les LT producteurs d'IFN γ en réponse à la présence d'**antigènes spécifiques** de *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT-6 et CFP-10). Avantage → pas de réponse positive en cas de vaccination par le BCG.

Figure 18 : Diagnostic de l'infection latente par les tests de libération d'IFN γ



8. Antituberculeux

Une des particularités de la TB est que chez un même individu, **coexistent des bacilles tuberculeux qui sont à différents stades métaboliques** :

- bacille intra intracellulaire dans les macrophages,
- extracellulaire à multiplication active
- à multiplication fortement ralentie dans la nécrose caséeuse.

Le traitement antituberculeux fait appel à l'association de différents antibiotiques actifs sur les bacilles présents dans ces différents stades. Le **traitement** doit aussi être **suffisamment long** pour éradiquer les bacilles à croissance fortement ralentie pour **éviter les rechutes** à l'arrêt du traitement.

Du fait, du long temps de doublement (20 h) du bacille tuberculeux, une **prise unique quotidienne** est suffisante.

L'association d'antibiotique est indispensable **pour prévenir la sélection de mutants résistants** au sein de la population de bacilles tuberculeux. La résistance est acquise par sélection de mutants résistants (**mutation chromosomique**). Le risque de sélection est d'autant plus élevé que la quantité de bacille est abondante dans la lésion comme c'est le cas dans la caverne tuberculeuse ($\sim 10^8$ bacilles).

Le traitement standardisé de la tuberculose pulmonaire comprend une phase de **quadrithérapie** pendant **2 mois** associant isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol et une phase de **bithérapie** par isoniazide et rifampicine pendant **4 mois**. Le traitement bien conduit s'accompagne de **moins de 2% de rechute**.

L'isoniazide, le pyrazinamide et l'éthambutol sont des antibiotiques qui agissent sur des composés spécifiques de la paroi des mycobactéries (**acides mycoliques et arabinogalactane**) ce qui explique leur inefficacité sur les autres espèces bactériennes. La rifampicine est un antibiotique à spectre plus large, actif sur les bactéries à Gram positif, elle inhibe la transcription de l'ADN.

D'autres antituberculeux sont utilisés en cas de TB multirésistante : amikacine (aminoside), moxifloxacine (fluoroquinolones), éthionamide....

9. Prophylaxie – Déclaration

Vaccination par le BCG (**bacille de Calmette et Guérin**), souche de *M. bovis* ayant perdu sa virulence par repiquage successifs (vaccin vivant atténué).

- Efficace pour prévenir les 2 formes de tuberculose presque toujours mortelles: la miliaire et la méningite,

- Recommandée pour les enfants à risque ((Recommandation : [Vaccinations par le BCG : recommandations actuelles](#))),

- **Obligatoire** pour les professionnels et étudiants des professions de santé.

Chimioprophylaxie : par isoniazide en monothérapie pendant 9 mois ou 3 mois de bithérapie par rifampicine et isoniazide chez certains groupes à risque (jeunes enfants, sujet infecté par le VIH, sujet relevant d'un traitement par antiTNFa) de développer une TB maladie après le contagage :

Maladie à déclaration obligatoire pour la mise en œuvre des mesures prophylactiques des sujets contacts ((Recommandation : [Institut de veille sanitaire](#))).

10. Mesures d'hygiène pour la prise en charge d'un cas de tuberculose

De façon générale dans le cadre des précautions Standard, pour toute personne qui tousse, conformément aux recommandations de la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H) (http://sf2h.net/publications-SF2H/SF2H_recommandations_air-ou-gouttelettes_2013.pdf), il faut couvrir le nez et la bouche avec un mouchoir à usage unique, lors de toux, éternuement, écoulement nasal, ou mouchage puis jeter immédiatement les mouchoirs après usage et réaliser une hygiène des mains après contact avec des sécrétions respiratoires ou des objets contaminés. En milieu de soins (visites, consultation...), le patient doit porter un masque chirurgical.

En cas de suspicion de tuberculose pulmonaire contagieuse (examen microscopique positif ou conviction clinique), des précautions complémentaires **Air** doivent être mises en place dès l'entrée dans l'établissement :

- Le patient suspect ou atteint de pathologie à transmission respiratoire Air doit être en chambre individuelle porte fermée.
- Le personnel et le visiteur en contact avec un patient suspect ou atteint de tuberculose portent un appareil de protection respiratoire (APR). LA mise en place de cet APR se fait avant l'entrée dans la chambre. Le choix du FFP2 est une exigence minimale. Un test d'ajustement doit être réalisé avant d'entrer dans l'atmosphère contaminée (fit check). L'APR est ôté après la sortie de la chambre, une fois la porte refermée.

La durée des précautions Air est d'au moins 15 jours à partir de la mise en route du traitement. On prendra en compte pour lever les précautions Air :

- l'absence de facteurs de risque de multirésistance aux antibiotiques (primo-traitement, observance au traitement, bonne réponse clinique au traitement),
- la diminution de la toux
- l'intensité de l'inoculum de départ (appréciée par l'examen microscopique) et son évolution sous traitement,
- l'environnement du patient et la présence ou non d'immunodéprimés dans le service d'hospitalisation.

En cas de suspicion de tuberculose multi-résistante aux antibiotiques, il faut s'assurer du maintien des

précautions Air pendant toute la durée de l'hospitalisation. Il est préférable de diriger les patients vers une équipe habituée à la prise en charge de ces patients, et de prendre avis/appui d'une de ces équipes. Des mesures complémentaires d'ordre technique sont recommandées :

- assurer un taux de renouvellement de l'air suffisant (\geq à 6 volumes/h)
- disposer de chambre à pression négative dont les caractéristiques aérauliques sont maîtrisées.

Annexes

Glossaire

- **BAAR** : Bacilles Acido-Alcool-Résistants. Ceux sont des mycobactéries qui apparaissent colorées en rose par la fuchsine sur un fond bleu à la coloration de Ziehl-Neelsen. Cette propriété d'acido-alcool résistance est due à la présence d'acides mycoliques, composés spécifiques de la paroi des mycobactéries (cf. figure fiche Mycobactéries)
- **malade bacillifère ou malade contagieux** : Malade bacillifère : malade ayant des BAAR (Bacilles Acido Alcool Résistant) visibles à l'examen microscopique des produits d'expectoration, la contagiosité d'un malade atteint de TB pulmonaire est proportionnelle au nombre de BAAR émis. Le malade expectorant \geq 100 BAAR/champ microscopique est plus contagieux que celui expectorant $<$ 10 BAAR/champ).
- **nécrose caséuse** : foyer de destruction tissulaire (aspect de fromage frais ou de mastic) dans lequel la teneur en oxygène est réduite et qui est très riche en lipides issus de la lyse des macrophages spumeux (macrophages chargés de vacuoles lipidiques) --> multiplication ralentie du bacille tuberculeux, 3 scénarios évolutifs possibles : persistance, ramollissement, calcification
- **Phénomène de Koch** : Le cobaye est l'animal le plus sensible au bacille tuberculeux, il fait une tuberculose progressivement mortelle : 15 jours à 3 semaines après l'inoculation d'un million de bacilles, un nodule se forme au point d'inoculation. Ce nodule s'ulcère et laisse sourdre un pus blanchâtre, le caséum. L'ulcération va persister jusqu'à la mort de l'animal. En 1890, Robert KOCH constate que la réinoculation de bacilles tuberculeux à un cobaye déjà infecté s'accompagne n'est pas suivie des mêmes lésions que la primo-inoculation. C'est le phénomène de KOCH qui se traduit de la manière suivante : d'abord l'ulcération nécrotique se forme plus rapidement en 2 à 3 jours (témoigne de l'hypersensibilité aux constituants du bacille tuberculeux) au point d'inoculation et elle guérit spontanément (traduit une immunité de surinfection à la base de la vaccination par le BCG).

Bibliographie

- **Antoine A, Che D.** : *Les cas de tuberculose déclarés en France en 2010. BEH 2012, N°24-25.*
- **Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR** : *Tuberculosis: radiologic review. Radiographics. 2007. 27:1255-1273.*
- **Fraisse P; Groupe tuberculose de la SPLF** : *Treatment of latent tuberculosis infection. Rev Mal Respir. 2012. 29:579-600.*
- **Fraisse P.** : *Diagnosis of latent tuberculous infections (healthy, currently or potentially immunocompromised subjects) Rev Mal Respir. 2012. 29:277-318.*
- **Herrmann JL, Tailleux L, Nigou J, Giquel B, Puzo G, Lagrange PH, Neyrolles O.** : *The role of human dendritic cells in tuberculosis: protector or non-protector? Rev Mal Respir. 2006. 23: 6S21-6S28.*
- **Mazza-Staldera J, Nicoda L, Janssens J.-P.** : *La tuberculose extrapulmonaire. Revue des Maladies Respiratoires 2012. 29: 566–578.*
- **O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP.** : *The immune response in tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2013. 31:475-527.*
- **Ramakrishnan L.** : *Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Nat Rev Immunol. 2012.*

12:352-366.

- **Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F.** : *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. Nat Immunol. 2009; 10:943-948.*
- **WHO** : 2012, *global report 2012.*

Recommandation

- [Institut de veille sanitaire](#)
- [Vaccinations par le BCG : recommandations actuelles](#)

Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie - Structure

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2014

Table des matières

Préambule.....	3
1. Définition d'une bactérie.....	3
2. Caractéristiques des procaryotes.....	3
3. Méthode d'étude.....	3
4. Les enveloppes.....	4
4.1. La paroi	4
4.1.1. Peptidoglycane.....	4
4.1.2. Paroi des bactéries à Gram positif.....	6
4.1.3. Paroi des bactéries à Gram négatif.....	6
4.1.4. Autres propriétés de la paroi bactérienne.....	6
4.2. La membrane cytoplasmique.....	7
4.2.1. Structure.....	7
4.2.2. Fonctions principales.....	7
5. Contenu bactérien.....	7
5.1. Cytoplasme.....	7
5.2. Nucléoïde ou appareil nucléaire (voir cours génétique bactérienne).....	8
5.3. ADN extra-chromosomique.....	8
5.3.1. Plasmides.....	8
5.3.2. Eléments transposables.....	8
5.4. Ribosomes.....	8
6. Structures inconstantes.....	9
6.1. Capsules.....	9
6.2. Glycocalyx.....	9
6.3. Flagelles	10
6.4. Pili ou fimbriae.....	10
6.4.1. Pili communs.....	10
6.4.2. Pili sexuels.....	10
6.5. Spore bactérienne	11

Préambule

ANATOMIE - STRUCTURE

1. Définition d'une bactérie

Une bactérie est un être unicellulaire (**procaryote**) de petite taille, de morphologie variable qui présente des caractéristiques propres.

La taille d'une bactérie varie entre 1 à 10 μm . Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 g. Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%).

2. Caractéristiques des procaryotes

Principaux caractères distinctifs des procaryotes et eucaryotes

caractéristiques	procaryotes	eucaryotes
Taille habituelle	0,3 – 2,5 μm	2 – 20 μm
Noyau avec membrane	non	oui
Nombre de chromosome	1	> 1
Réplication par mitose	non	oui
Position de l'ADN	nucléoïde ou plasmide	noyau et organites IC
Organites intra-cellulaires	non	mitochondries, Golgi
Membranes avec stérols	non	souvent
Enveloppes cellulaires	hétéropolymère glucido-peptidique	cellulose et polysaccharides chez les plantes
Flagelles, cils	pas de cils	agencement typique

3. Méthode d'étude

Compte tenu de leur taille (de l'ordre du micron), les bactéries sont visualisées au microscope optique sans coloration (état frais) ou après coloration.

Diverses techniques de coloration existent, mettant en évidence des affinités tinctoriales différentes telle la **coloration de Gram**, très utilisée en pratique courante, l'**imprégnation argentique** pour révéler les spirochètes ou celle révélant le **caractère acido-alcool-résistant** de certains bacilles (BAAR ou mycobactéries).

Coloration de Gram

Coloration de Gram : elle est fondée sur l'action successive d'un colorant, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Christian Gram (1853-1938) a été l'inventeur de la coloration en 1884. Son intérêt est de donner une information rapide et médicalement importante, car le pouvoir pathogène et la sensibilité aux antibiotiques sont radicalement différents.

Elle permet de distinguer la paroi des bactéries ayant \pm du peptidoglycane. Coloration en **4 étapes** :

1. coloration par le violet de gentiane ;
2. mordantage avec du lugol (solution d'iode iodo-iodurée) ;
3. décoloration par l'alcool
4. coloration par la safranine

Etapes 1 et 2 = coloration en violet du contenu de la bactérie et fixation par le lugol des structures internes.

Etape 3 = décoloration du cytoplasme des bactéries ayant une paroi pauvre en peptidoglycane qui laisse passer l'alcool pour éliminer le violet de gentiane = bactérie à Gram négatif

Etape 4 = contre-coloration par la safranine teignant en rose les bactéries précédemment décolorées.

Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet (pas de passage à travers la couche de peptidoglycane).

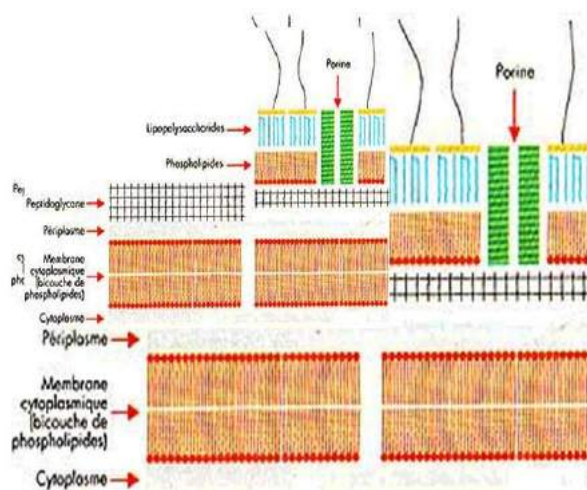
Le nucléoïde ou chromosome est visible grâce à la coloration de Feulgen.

4. Les enveloppes

4.1. La paroi

C'est une **enveloppe rigide** assurant l'intégrité de la bactérie, donc responsable de la forme des cellules. Elle protège des variations de pression osmotique (5-20 atmosphères). Elle est absente chez les Mollicutes (*Mycoplasma*). En dehors des bactéries halophiles et thermophiles, la partie commune à toutes les parois bactériennes est le **peptidoglycane** (ou **muréine**), enveloppe la plus interne.

Figure 1 : La paroi bactérienne



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

4.1.1. Peptidoglycane

C'est un hétéropolymère formé de 3 éléments :

- une épine dorsale alternant des **chaînes N-Acétyle Glucosamine - Acide N-Acétyle Muramique**.
- des **chaînes latérales peptidiques** formées au minimum de quatre aminoacides (par exemple L-Alanine - D-Glycine - L-Lysine - D-Alanine) toujours fixées sur l'acide muramique. L'enchaînement des

aminoacides des **séries D et L** est une constante.

- des **ponts inter-peptidiques**.

Figure 2 : Peptidoglycane

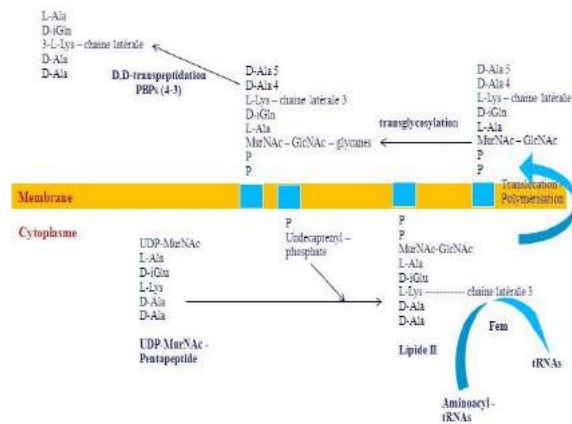
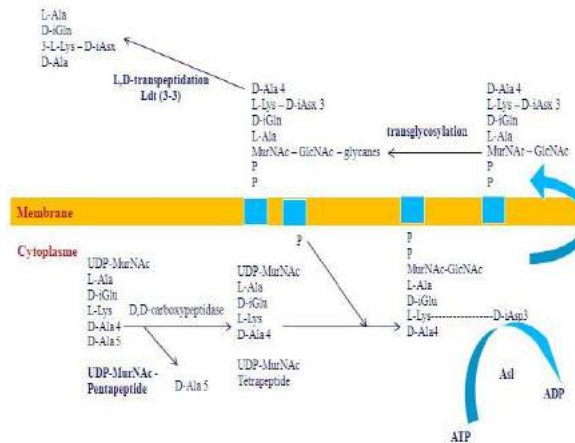


Figure 3 : Peptidoglycane



Le peptidoglycane est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées les unes aux autres par des chaînons pentapeptidique. La macromolécule réticulée tridimensionnelle est ainsi constituée et sa solidité dépend de l'importance des interconnexions. La paroi de la bactérie est ainsi une unique macromolécule.

La biosynthèse du peptidoglycane s'effectue par sous-unités dans le cytoplasme jusqu'à l'assemblage du disaccharide-pentapeptide (N-Acétyle Glucosamine-Acide N-Acétyle Muramique- L-Alanine-D-Glycine-L-Lysine-D-Alanine-D-Alanine) qui traverse la membrane cytoplasmique fixé sur un transporteur phospholipidique puis est attaché à la chaîne glucidique de la paroi pré-existante (réaction de transglycosylation). Les chaînes peuvent être reliées pour former la molécule réticulée finale par liaison covalente entre les peptides (**réaction de transpeptidation**). D'autres enzymes sont nécessaires: hydrolases permettant de couper les chaînes glucidiques du peptidoglycane (rôle essentiel lors de la division), D-carboxypeptidases coupant le dipeptide D-Alanine-D-Alanine et réduisant le nombre des interconnexions.

Certaines étapes peuvent être entravées par certains antibiotiques: β -lactamines, glycopeptides ou encore enzyme (lysozyme).

La composition variant selon l'espèce ou le groupe bactérien, il a été possible de distinguer des affinités tinctoriales différentes par la coloration: Gram + et Gram -.

4.1.2. Paroi des bactéries à Gram positif

Le peptidoglycane est le constituant majeur (90% des constituants de la paroi). Le peptidoglycane est très solide, les liaisons croisées entre chaînes glucidiques sont nombreuses.

Présence d'**acides teichoïques** (A.T.) sont des polymères de glycérol et de ribitol reliés à des groupes PO₄ et dépassent la paroi ; les acides lipoteichoïques s'enchaînent dans la membrane cytoplasmique.

Les A.T. sont connectés au peptidoglycane ou aux lipides de la membrane plasmique (lipoteichoïques). Ils sont chargés négativement. Leur fonction est inconnue mais maintiennent la structure de la paroi.

Les acides LT retiennent le violet lors de la coloration de Gram.

Peu ou pas de protéines, sauf exceptions comme la protéine A de *S. aureus*.

4.1.3. Paroi des bactéries à Gram négatif

Elle est beaucoup plus complexe.

Le peptidoglycane est une **couche mince**, peu dense (< 15% du poids sec).

L'autre constituant essentiel est le lipide complexe (**lipide A**) couplé à la glucosamine et à des résidus phosphore qui est amphiphile, possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Il y a analogie entre les appellations « endotoxine », « lipide A », « antigène O » et « membrane externe ».

Sur les résidus glucosamine, des polysaccharides complexes sont fixés et forment la partie la plus externe de la paroi. Ils sont essentiels pour la physiologie bactérienne dans les processus de pénétration de nutriments ou de toxiques, ils **sont spécifiques de sous-espèces ou de types** et comportent des sucres originaux : antigènes O.

On trouve, à l'intérieur, des **phospholipides**. La membrane est successivement hydrophile (polysaccharide complexe), hydrophobe (lipide A et lipides des phospholipides), hydrophile (têtes hydrophiles des phospholipides).

Des protéines se trouvent enchaînées assurant la cohésion de la membrane, une liaison avec le peptidoglycane et des fonctions diverses de perméabilité sélective ou non. Ces porines, seules structures de transport des composés hydrophiles, sont essentielles à la vie de la bactérie mais aussi à l'action de certains antibiotiques. Enfin d'autres protéines servent à la captation d'ions (fer), ou de vitamines (facteurs de croissance). A noter les **antigènes protéiques M** des streptocoques.

La membrane externe empêche ou diminue l'entrée des sels biliaires, des antibiotiques, etc. Elle a de nombreux sites de contact avec la membrane plasmique.

La **lipoprotéine de Braun** est la protéine la plus abondante. Elle est attachée au peptidoglycane ou elle est fortement liée.

Le **LPS** est constitué du lipide A, du polysaccharide central et de la chaîne latérale O. Les chaînes latérales O peuvent changer rapidement pour échapper à la détection.

Le lipide A est enfoui dans la membrane externe, le reste est projeté à l'extérieur.

4.1.4. Autres propriétés de la paroi bactérienne

Coloration de Gram : cf ci-dessus (§3)

Les morphologies bactériennes sont variées. Les cellules peuvent être courtes, pratiquement sphériques (cocci ou coques) ou allongées (bacilles).

Les bacilles sont essentiellement des cylindres à extrémités hémisphériques mais on en connaît aussi à extrémités fines, pointues (formes en fuseau) ou au contraire planes (bacilles dits « à bouts carrés»). Certains corps bacillaires sont incurvés (*Vibrio*, *Campylobacter*) ou spiralés (*Leptospira*, *Treponema*).

Dans un environnement adapté, les cellules des bactéries peuvent être associées en groupements qui sont caractéristiques de l'espèce.

L'absence de paroi est habituellement létale pour les bactéries (Mollicutes exceptés). Les bactéries dépourvues d'enveloppes extérieures sont les « formes L » et les protoplastes, suite à l'action des antibiotiques (β -lactamines) ne semblent pas avoir un intérêt médical.

Les **protoplastes** sont observés chez les bactéries à **Gram positif**. L'action du lysozyme entraîne leur formation. Ils ne peuvent se diviser.

Les **sphéroplast**s sont observés chez les bactéries à **Gram négatif**. Ils sont dus à l'action des antibiotiques. Une partie de la paroi cellulaire est toujours présente après traitement par une pénicilline. Ils peuvent se diviser et revenir à l'état ante au contact de substances hypertoniques. Ce sont les formes L.

La paroi est le site d'action d'enzymes exogènes (lysozyme) ou endogènes (autolysines) ou d'antibiotiques qui inhibent la synthèse du peptidoglycane.

Le LPS et le peptidoglycane ont un **rôle non spécifique contre l'infection** en activant le complément par la voie alterne libérant les fractions C3a et C5a (effet chimiotactique) et C3b (effet opsonisant).

4.2. La membrane cytoplasmique

4.2.1. Structure

C'est une structure interne à l'interface entre le cytoplasme et les structures externes.

C'est une **membrane trilamellaire** formée d'une double couche de phospholipides dont les pôles hydrophobes sont face à face, associée à des protéines.

Certaines protéines, les **perméases**, ont un rôle important dans les échanges.

D'autres ont un rôle dans la synthèse du peptidoglycane et sont des **protéines de liaison aux pénicillines (PLP ou PBP)**.

D'autres protéines sont des enzymes respiratoires ou impliquées dans la production d'énergie (**ATPase**).

La membrane cytoplasmique ne possède pas de stérols (différent des eucaryotes).

4.2.2. Fonctions principales

La membrane a un rôle métabolique majeur: on y trouve la plupart des activités associées aux mitochondries dans la cellule supérieure :

- **Perméabilité sélective et transport des substances solubles** vers l'intérieur de la bactérie ; rôle de barrière osmotique et de transport grâce aux perméases.
- **Fonction respiratoire** par transport d'électrons et de phosphorylation oxydative pour les bactéries aérobies.
- **Excrétion d'enzymes hydrolytiques**

Les **flagelles bactériens** y sont fixés. C'est là que se génère leur mouvement tournant. Elle est détruite par certains antibiotiques (polypeptides, antiseptiques).

5. Contenu bactérien

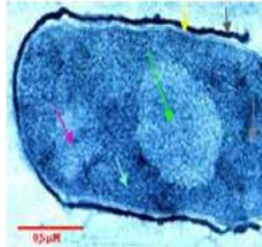
5.1. Cytoplasme

Présence d'**ARN solubles** (ARN messenger et ARN de transfert), et ARN ribosomal.

Présence d'environ **15.000 ribosomes** (40% du poids de la bactérie, 90% de l'ARN) constitués de protéines ribosomales et d'ARN (16S, 23S, 5S) divisés en sous-unités : sous-unité 30S contient de l'ARN16S, sous-unité 50S constitué d'ARN23S.

Une variété importante d'inclusions existe dans le cytoplasme. Elles servent à emmagasiner des **réserves organiques** (glycogène, poly-B-hydroxybutyrate) ou inorganiques (granules de polyphosphate ou métachromatique, magnétosomes).

Figure 4 : Cytoplasme



5.2. Nucléoïde ou appareil nucléaire (voir cours génétique bactérienne)

Le chromosome de la cellule procaryote est situé dans une région de forme irrégulière appelée **nucléoïde**. Le chromosome est le plus souvent unique (*V. cholerae* en possède plusieurs)

C'est le support de l'information génétique. Il s'agit d'une formation en **double hélice circulaire** (parfois linéaire), surenroulée grâce aux topo-isomérases. Longueur 1 mm.

Il est composé d'**ADN (60%)**, d'**ARN (30%)** et de **protéines (10%)**.

5.3. ADN extra-chromosomique

Non indispensable à la vie de la bactérie.

5.3.1. Plasmides

Ce sont des molécules d'ADN double brin qui se **répliquent indépendamment** du chromosome, qui **peuvent s'intégrer** à celui-ci et qui sont **transmissibles**.

Ils sont porteurs de caractères de fertilité (**Facteur F**), de résistance aux antibiotiques (**Facteur R**), de bactériocines (**plasmides Col**), de **virulence**, de résistance aux antiseptiques, de caractères métaboliques, entre autres. Les plasmides peuvent donner un avantage sélectif à la bactérie.

Les plasmides peuvent être **éliminés spontanément** de la cellule hôte.

5.3.2. Eléments transposables

Ce sont des fragments d'ADN qui se déplacent dans le génome de la bactérie par transposition, d'où le nom de **transposon**. Le transposon est **incapable de se répliquer**.

Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (IS) ayant une courte séquence d'ADN.

5.4. Ribosomes

Ils sont constitués d'ARN et de protéines. Les ribosomes bactériens comprennent **deux sous-unités (30S, 50S)**.

Fonctionnellement, il y a deux sites essentiels pour la synthèse des protéines : le **site aminoacyl** qui accueille l'acyl-tARN et le **site peptidyl** qui accueille la chaîne d'acides aminés en cours de constitution.

Ils sont particulièrement présents à proximité de la membrane cytoplasmique, site de synthèse de la paroi et des protéines exportées. Ils n'ont pas la structure des ribosomes des eucaryotes expliquant la spécificité propre au monde bactérien. Des antibiotiques perturbent la synthèse des protéines à leur niveau (tétracyclines).

6. Structures inconstantes

6.1. Capsules

Ce constituant inconstant est le plus superficiel. Sa mise en évidence s'effectue par coloration négative (le colorant, encre de Chine ou Nigrosine est repoussé par la capsule et apparaît en clair sur fond noir).

Constitué de **polysaccharides acides** (sucres sous forme d'acides uroniques tel l'acide galacturonique, l'acide glucuronique, mais aussi sous forme de sucres phosphorés), ce composant est lié à certains pouvoirs pathogènes, car il **empêche la phagocytose**. La capsule de *Bacillus anthracis* est constituée d'un polypeptide d'acide D-glutamique.

Elle peut se trouver à l'**état soluble** dans les liquides de l'organisme (emploi dans le diagnostic = recherche d'antigène soluble).

Elle intervient dans l'**identification infra-spécifique**. Ce typage est une des méthodes de reconnaissance des épidémies.

Les polymères capsulaires purifiés sont la **base de certains vaccins** (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*).

Figure 5 : Capsule



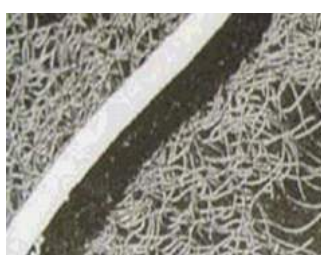
6.2. Glycocalyx

Ce sont des polymères de **nature polysaccharidique** extrêmement fréquents entourant la bactérie et difficiles à visualiser, sauf en microscopie électronique. Le **feutrage des fibres de glycocalyx** est constant dans le cas de bactéries vivant en biofilm dans les conditions naturelles.

Le glycocalyx est aussi appelé **slime** car il engluie les cellules.

Il est **responsable de l'attachement des bactéries** aux cellules (cellules buccales, respiratoires, par exemple), à des supports inertes (plaque dentaire sur l'émail dentaire, biofilms sur les cathéters, ou les prothèses dans le cas de bactéries d'intérêt médical). Il **protège les bactéries** du biofilm de la dessiccation, sert à concentrer ou à modifier les éléments nutritifs exogènes et rend les bactéries résistantes: antiseptiques, désinfectants, antibiotiques.

Figure 6 : Glycocalyx



6.3. Flagelles

Ce sont des structures inconstantes.

Ils sont de nature protéique (**flagelline**), long de 6-15 µm.

Ils sont ancrés dans le cytoplasme par une structure complexe.

La synthèse des flagelles nécessite 20 à 30 gènes. Le mécanisme est très compliqué.

1 gène pour la flagelline, 10 gènes ou plus pour les protéines du crochet et du corps basal.

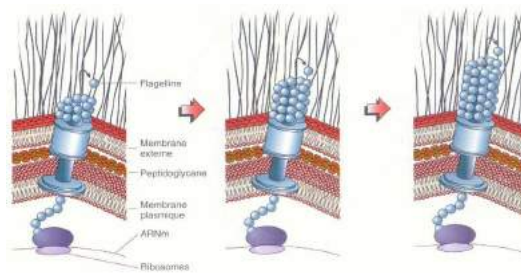
D'autres gènes existent pour le contrôle de la synthèse et la fonction du flagelle. Les unités de flagelline seraient transportées au travers du tube creux du filament.

A l'extrémité, elles s'assemblent spontanément.

Ils ont un rôle :

- dans la **mobilité** de la bactérie (implantation **monotriche/polaire** ou **péritriche**)
- **antigénique** utilisé (sérodiagnostic) pour la différenciation des espèces bactériennes.

Figure 7 : Croissance des filaments flagellaires



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

6.4. Pili ou fimbriae

Chez les **bactéries à Gram négatif** (exceptionnellement à Gram positif) peuvent exister des structures fibrillaire et rigide situées à la surface, plus fines que des flagelles : les pili ou fimbriae.

Il s'agit de la polymérisation d'une sous-unité polypeptidique (**piline**) assemblée à des polypeptides mineurs comme l'**adhésine**.

6.4.1. Pili communs

Ils peuvent attacher spécifiquement des bactéries à la surface de cellules eucaryotes, phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes (*Escherichia coli* au cours de certaines infections urinaires, *Vibrio cholerae* sur les entérocytes).

6.4.2. Pili sexuels

Ils sont plus longs et sont codés par des plasmides (**facteur F**).

Ils ont un rôle dans l'attachement des bactéries entre elles (conjugaison) et sont le récepteur de virus bactériens ou bactériophages spécifiques

Chez les bactéries à Gram positif, des protéines de surface assimilées aux fimbriae jouent un **rôle dans l'adhérence bactérienne**. C'est le cas de la protéine M de *S. pyogenes* et de la protéine A de *S. aureus*.

6.5. Spore bactérienne

Certaines bactéries, entre autres d'intérêt médical (genre *Clostridium* et *Bacillus*), ont la propriété de se différencier en **formes de survie** appelées **spores**. Elles se présentent sous une forme végétative métaboliquement active et potentiellement pathogène ou métaboliquement inactive et non pathogène (forme sporulée).

La transformation de la forme végétative en spore est la sporulation:

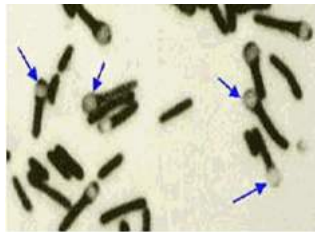
- Temps : 6 à 8 heures à 37°C pour *Bacillus subtilis*.
- Conditions : déclenchée par des modifications de l'environnement tel épuisement en matières nutritives.
- Etapes : déshydratation progressive du cytoplasme, par l'apparition de composés (dipicolinate de calcium), une densification des structures nucléaires et enfin la synthèse d'une paroi sporale épaisse et imperméable, donc hautement résistante (chaleur).
La spore intra-bactérienne est libérée dans le milieu extérieur et y survit des années.

Dans des conditions favorables (nutritives, thermiques et chimiques), elle redonne une cellule végétative (germination).

Intérêt médical :

- conserves familiales (Botulisme) (*Clostridium botulinum*).
- plaies souillées par de la terre (Tétanos) (*Clostridium tetani*).
- chez l'animal : mange des chardons (Charbon) (*Bacillus anthracis*).

Figure 8 : Spore bactérienne



Croissance des bactéries

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2014

Table des matières

Préambule.....	3
1. Division bactérienne.....	3
2. Dynamique de la croissance.....	3
2.1. Courbe de croissance	3
2.2. Croissance in vitro (milieux liquide et solide).....	4
2.3. Croissance in vivo.....	4
2.4. Croissance en culture continue.....	4
2.5. Croissance en culture synchrone.....	4
2.6. Croissance en biofilm.....	5
2.7. Effets de carence et de stress.....	5
3. Conditions favorables à la croissance.....	5
3.1. Sources d'énergie.....	5
3.2. Sources de carbone.....	6
3.3. Sources d'azote et besoins en soufre.....	6
3.4. Besoins inorganiques.....	6
3.5. Autres éléments.....	6
3.6. Perception du quorum (quorum sensing ou auto-induction).....	6
4. Conditions psycho-chimiques de la croissance.....	7
4.1. Effet de l'oxygène.....	7
4.2. Effet de la température.....	7
4.3. Effet du pH.....	7
4.4. Effet de la pression osmotique.....	8
4.5. Effet de l'eau libre.....	8
4.6. Métabolisme énergétique.....	8
5. Absorption des nutriments.....	9
5.1. Diffusion passive et facilitée.....	9
5.2. Transport actif.....	9
5.3. Translocation de groupe.....	10
5.4. Capture du fer.....	10
6. Applications.....	12
6.1. Milieux de culture.....	12
6.2. Apparence des colonies.....	12
6.3. Recherche des caractères biochimiques.....	13

Préambule

Loi de Shelford : il y a des limites dans les facteurs environnementaux au-dessous ou au-dessus desquelles un organisme ne peut pas survivre et se développer, quel que soit l'apport en nutriments.

1. Division bactérienne

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.

2. 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.

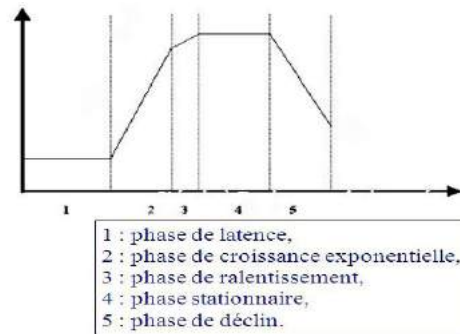
Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance peut être étudiée en milieu liquide ou solide.

2.1. 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 ($\mu = \max$). 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. Il se produit une modification de l'expression des gènes. Les bactéries en état de déprivation synthétisent des protéines de manque qui rendent la cellule plus résistante aux dommages : augmentation du pontage du peptidoglycane, fixation des protéines à l'ADN des cellules de manque, chaperones qui empêchent la dégradation protéique et renaturent les protéines endommagées ;
- **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**). La mort cellulaire est caractérisée par l'absence de réplication irréversible.

Figure 1 : Courbe de croissance



2.2. Croissance in vitro (milieux liquide et solide)

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide, solide et semi-liquide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries pures. Les milieux solides ou semi-solides, à base d'agar, sont utilisés pour l'isolement de bactéries. Dans ces milieux, ont été ajoutés des nutriments favorisant la croissance des bactéries étudiées.

2.3. 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 in vitro et in vivo de quelques bactéries

Bactéries	TG in vitro (min)	TG in vivo (h)
<i>Escherichia coli</i>	20-40	5
Salmonella Typhimurium	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

2.4. 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.

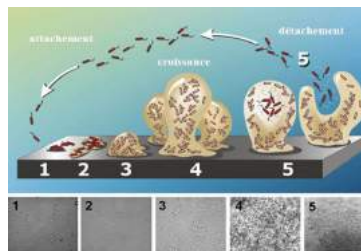
2.5. Croissance en culture synchrone

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.

2.6. 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.

Figure 2 : Croissance en biofilm



2.7. 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 d'*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).

3. Conditions favorables à la croissance

3.1. 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**.

3.2. 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).

3.3. 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.

3.4. Besoins inorganiques

Le phosphore est présent dans les acides nucléiques et est utilisé dans 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.

3.5. 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).

3.6. Perception du quorum (quorum sensing ou auto-induction)

Les bactéries communiquent entre elles et ont un comportement coopératif. Les bactéries contrôlent leur propre densité de population en percevant le niveau de **molécules signals** ou **auto-inducteurs**.

Par exemple, grâce à la perception du quorum, les bactéries atteignent une haute densité de population avant de libérer leurs enzymes.

Exemples :

Synthèse et libération de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*

Stimulation de la sporulation chez *Bacillus*

Production de toxines et de facteurs de virulence chez *S. aureus*

Maturation du biofilm chez *P. aeruginosa*

4. Conditions psycho-chimiques de la croissance

4.1. Effet de l'oxygène

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

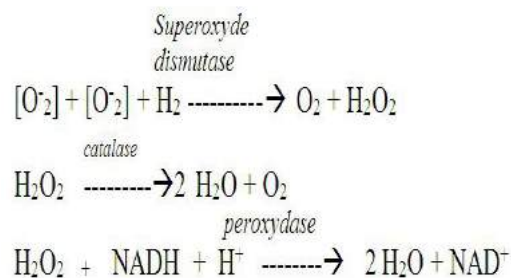
Les bactéries **aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*).

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

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.

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 production d'énergie se fait grâce aux cytochromes membranaires couplés à des phosphorylations oxydatives mais en l'absence d'oxygène moléculaire. 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.

Action de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la peroxydase



4.2. 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. : *Pseudomonas*) : Températures proches de 0°C (optimum à 10-15°C)
- Bactéries **psychrotrophes** (Ex. : *Pseudomonas*) : températures de croissance proches de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles

4.3. 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** se développent pour des pH sont compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7.
- Les bactéries **alcalophiles** préfèrent les pH alcalins: cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*.
- Les bactéries **acidophiles** se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*.

Pour garder un pH interne neutre, le mécanisme de résistance des bactéries est :

- Membrane cytoplasmique devient imperméable aux protons,
- Bactéries neutrophiles : échange de potassium contre des protons,
- Bactéries alcalophiles : échange d'ions sodium contre des protons,
- Production de déchets métaboliques acides ou alcalins.

4.4. Effet de la pression osmotique

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

4.5. 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** (A_w) 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 jusque 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (*Halobacterium*). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement.
 - 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.
 - Les **bactéries osmotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.
 - Les **bactéries xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

4.6. 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 de type respiratoire**, 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.

5. Absorption des nutriments

5.1. Diffusion passive et facilitée

Il s'agit d'une **diffusion passive à travers la membrane plasmique**. Il y a passage d'une concentration élevée à une concentration plus faible.

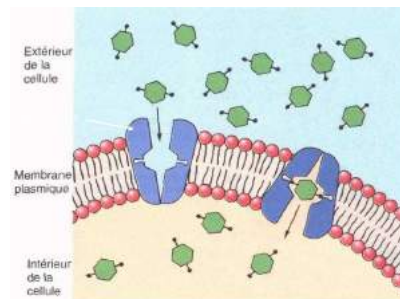
C'est le cas des petites molécules comme le CO_2 , H_2O , O_2 , le glycérol.

La vitesse de diffusion peut être augmentée grâce à la présence de perméases présentes au niveau de la membrane cytoplasmique. La concentration en nutriments peut atteindre un plateau en raison de la saturation du transporteur.

Le transporteur est vraisemblablement une protéine transmembranaire. Le mécanisme est réversible.

La diffusion passive et facilitée est peu fréquente chez les bactéries.

Figure 3 : Modèle de diffusion facilitée



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

5.2. Transport actif

Il s'agit d'un transport de molécules contre un **gradient de concentration** qui utilise de l'énergie métabolique.

Les perméases ont une grande spécificité vis-à-vis des molécules.

Il peut y avoir aussi une saturation du transporteur.

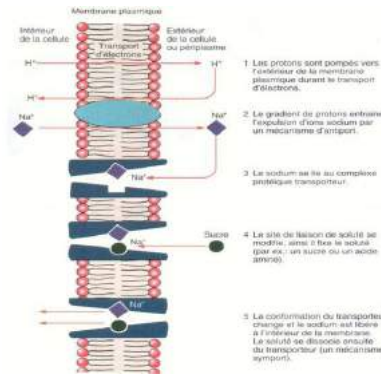
Le système de transport « **ABC transporter** » est présent chez les bactéries (ATP binding cassette transporters) : il s'agit d'un transporteur avec **deux domaines trans-membranaires** hydrophobes associés du côté cytoplasmique à deux domaines de liaison de nucléotide.

Les domaines transmembranaires forment un pore et les domaines de liaison de nucléotide fixent et hydrolysent l'ATP pour entraîner le transport.

Les protéines fixatrices sont dans le périplasma des bactéries à Gram négatif ou attachées aux lipides membranaires de la face externe de la membrane plasmique des bactéries à Gram positif.

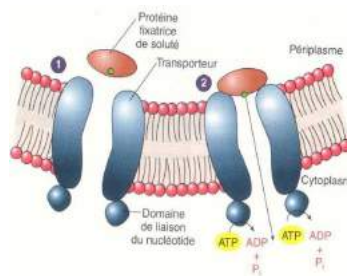
Les bactéries utilisent aussi la force proton-motrice sous la forme d'un gradient de protéines généré durant le transport d'électrons.

Figure 4 : Mécanisme du transport actif



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

Figure 5 : Transporteur ABC



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

5.3. Translocation de groupe

Il s'agit d'un transport de molécules qui sont chimiquement modifiées. Le système le plus connu est celui de la phosphotransférase des sucres dépendant du phosphoénolpyruvate. Les sucres sont phosphorylés par le PEP.



5.4. Capture du fer

Nécessité d'utiliser le fer pour les cytochromes et les enzymes.

Capture difficile en raison de l'insolubilité des ions ferriques.

Synthèse de **sidérophores** de nature hydroxamates (aérobactine, pyoverdine, mycobactine) ou phénolates (entérochéline, pyochéline, vibriobactine). Leurs poids moléculaires sont compris entre 300 et 1000 Da. Forte affinité pour le fer trivalent : 10^{-38} M.

Transport du complexe fer-sidérophore par un système ABC-Transporter. D'autres voies de captation du fer par la bactérie existent : hème, haptoglobine-hémoglobine, hémopexine, transferrine, lactoferrine.

Figure 6 : Capture du fer

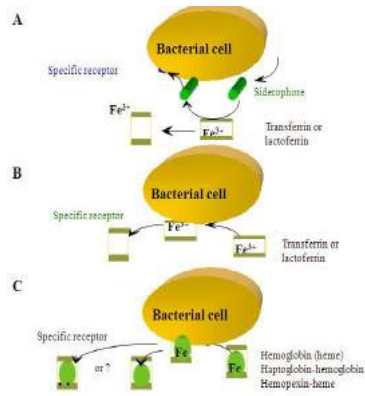


Figure 7 : Capture du fer

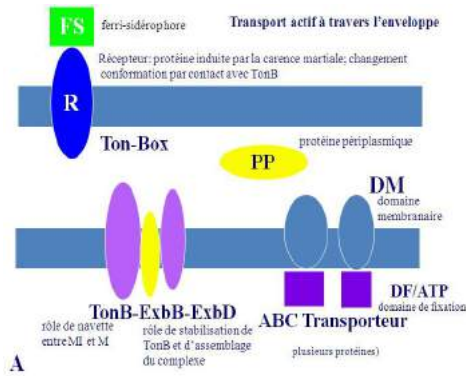


Figure 8 : Capture du fer

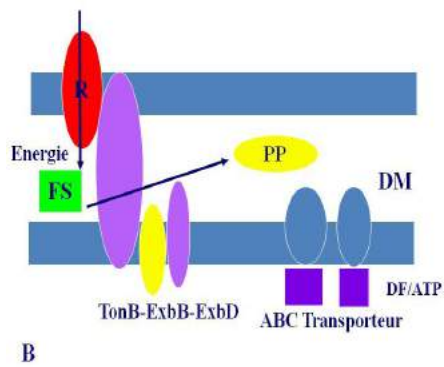
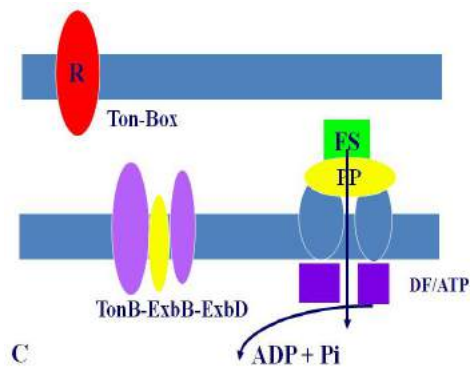


Figure 9 : Capture du fer



6. Applications

6.1. 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 et de composition simples pour permettre le développement de plusieurs espèces bactériennes.
- Les milieux sélectifs qui favorisent artificiellement la croissance d'une espèce au détriment des autres.
- Les milieux d'identification permettent de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés d'une bactérie pour l'identifier.

6.2. Apparence des colonies

L'aspect des colonies est le caractère primaire utilisé pour orienter le diagnostic effectué par le bactériologiste.

La forme des colonies dépend de :

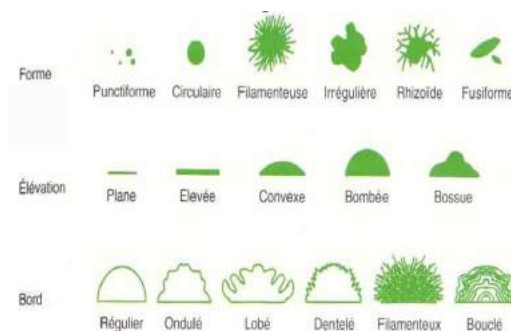
A) facteurs intrinsèques à la bactérie :

- **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

Figure 10 : Morphologies des colonies bactériennes



(L.M. Prescott, J.P. Harley, D. A. Klein)

6.3. 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 activité physiologique (ex : fermentation) ou enzymatique (ex : recherche de la présence d'une uréase).

Par exemple, un milieu type pour fermentation contient un sucre, un indicateur coloré des changements de pH. La fermentation du sucre entraîne un abaissement de pH et donc un changement de couleur de l'indicateur coloré.

Leptospira

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2014

Table des matières

1. Généralités.....	4
2. Caractères de la bactérie.....	4
2.1. Morphologie (Figure 1).....	4
2.1.1. MO à fond noir (X10 et X25).....	4
2.1.2. Pour améliorer sa visualisation.....	4
2.1.3. Mobilité.....	5
2.1.4. Modifications avec le vieillissement.....	5
2.1.5. Division.....	5
2.1.6. Colorations.....	5
2.2. Structure.....	5
2.2.1. Axostyle.....	5
2.2.2. Cylindre cytoplasmique.....	6
2.2.3. Membrane cytoplasmique.....	6
2.2.4. Enveloppe.....	6
2.3. Caractères cultureux.....	6
2.3.1. Milieux de cultures.....	6
2.3.2. Conditions de cultures.....	6
2.3.3. Croissance.....	7
2.3.4. Aspect des cultures.....	7
2.3.5. Cas des prélèvements contaminés.....	7
2.3.6. Cas des hémocultures.....	7
2.4. Résistance - Vitalité.....	7
2.4.1. Conservation des souches.....	7
2.5. Caractères biochimiques.....	8
2.5.1. Besoins nutritifs.....	8
2.6. Produits élaborés.....	8
2.7. Caractères antigéniques.....	8
3. Pouvoir pathogène.....	8
3.1. Pouvoir pathogène expérimental.....	8
3.1.1. Animaux sensibles.....	8
3.1.2. Tableau clinique.....	8
3.1.3. Autopsie.....	9
3.2. Pouvoir pathogène naturel.....	9
3.2.1. Signes fondamentaux.....	9
3.2.2. Signes facultatifs.....	9
3.2.3. Evolution.....	9
3.3. Physiopathologie.....	10
3.4. Immunité.....	10

3.5. Prophylaxie – Traitement.....	10
3.5.1. Prophylaxie.....	10
3.5.2. Sensibilité aux antibiotiques.....	10
3.5.3. Traitement.....	11
3.6. Epidémiologie.....	11
3.6.1. Répartition géographique.....	11
3.6.2. Cycle épidémiologique (Figure 3).....	11
3.6.3. Mode de contamination.....	11
4. Diagnostic de laboratoire.....	12
4.1. Chronologie des examens en fonction de l'évolution.....	12
4.2. Diagnostic direct.....	12
4.2.1. Prélèvements.....	12
4.2.2. Culture.....	12
4.2.3. Amplification génique.....	12
4.3. Diagnostic indirect.....	12
4.3.1. Réaction macroscopique ou macro-agglutination sur lame.....	13
4.3.2. Méthode par ELISA.....	13
4.3.3. Réaction microscopique d'agglutination-lyse (MAT).....	13
Annexes.....	14

1. Généralités

La leptospirose est une **anthropozoonose** associée à une bactérie qui, émise par les urines d'animaux infectés, survit dans l'environnement (eaux douces). L'homme est un hôte accidentel contaminé soit par voie directe (contact avec un animal infecté) soit, le plus souvent, par voie indirecte (contact avec les eaux douces ou des sols souillés par des urines ou tissus d'animaux infectés). Certaines professions sont plus particulièrement exposées (**maladie professionnelle**). La première description de l'**ictère grave essentiel** due à une Leptospire a été faite par Lancereaux (1882).

Les Leptospires font partie :

- de l'ordre des *Spirochaetales*.
- de la famille des *Leptospiraceae*.
- du genre *Leptospira* (genre unique)

Le genre *Leptospira* comprend 2 taxons:

- *L. interrogans sensu lato* : regroupe les espèces pathogènes.
- *L. biflexa sensu lato* : regroupe les espèces saprophytes mais il existerait 7 espèces génomiques pathogènes par hybridation ADN/ADN qui sont pathogènes pour l'homme et les animaux; 3 espèces saprophytes ; 2 espèces à rôle inconnu.

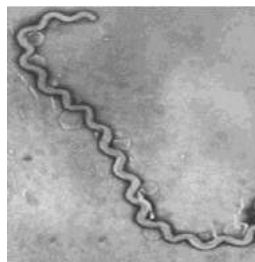
Les sérovars sont regroupés en sérogroupe en fonction des relations antigéniques entre les sérovars.

- *L. interrogans* comprend 23 sérogroupe avec 225 sérovars.
- *L. biflexa* comprend 28 sérogroupe avec 63 sérovars.
- il existe une étroite spécificité entre le tableau clinique, les sérotypes et les réservoirs animaux.

2. Caractères de la bactérie

2.1. Morphologie (Figure 1)

Figure 1 : Morphologie



2.1.1. MO à fond noir (X10 et X25)

Longueur 6 à 20 μm ; diamètre 0,1 μm .

Filament hélicoïdal, plus ou moins rigide, sans souplesse, 18 tours de spires ou plus, longueur d'onde de la spire: 0,5 μm ; pas de la vis à droite.

Corps à 2-3 ondulations lâches.

Extrémités effilées avec inflexions en crochets.

2.1.2. Pour améliorer sa visualisation

Il s'agit de pratiquer une centrifugation douce du sang traité par oxalate de sodium ou héparine: élimination des éléments cellulaires pour supprimer les interférences. Puis une centrifugation à vitesse élevée pour

concentrer les éléments restants qu'on examine.

Il y a une possibilité de faux positifs par présence de fibres ou éléments cellulaires.

Il faut réserver le microscope à fond noir pour les prélèvements riches en Leptospires (sang, liquide péritonéal et foie d'animaux infectés).

L'absence de Leptospires n'élimine pas le diagnostic. A confirmer obligatoirement par cultures ou tests sérologiques.

2.1.3. Mobilité

La mobilité est intermittente, assez rapide. **Les mouvements sont dus à l'axostyle.**

Il y a trois mouvements:

- flexion: disparaît en 1^{er} sous antibiothérapie et avec des anticorps spécifiques.
- rotation, en vrille, très rapide.
- translation: déplacement dans le sens antéro-postérieur.

2.1.4. Modifications avec le vieillissement

Cela se manifeste par la présence de formes bouclées, déroulées, granulaires. Présence de granules spirochétogènes aux extrémités en signes de souffrance de la bactérie.

2.1.5. Division

La division se fait selon un **mode transversal**: épaissement de la zone médiane avec étirement filiforme.

Le rythme de division est très lent : 16 fois inférieur à celui d'une autre bactérie.

2.1.6. Colorations

Elles sont délicates, normalement à Gram négatif.

- par technique de **surcoloration**: Vago (mercurochrome + violet méthyl), Fontana-Tribondeau (**argent**).
- par **fluorescence** avec anticorps spécifiques.

2.2. Structure

2.2.1. Axostyle

L'axostyle est :

- en dessous de l'enveloppe externe.
- en dehors et au contact du cylindre cytoplasmique qui s'enroule autour de lui.
- un double filament rectiligne avec une ligne de fission longitudinale.

L'axostyle est fixé par un système de boucles et disques à la membrane pariéto-cytoplasmique au niveau des extrémités; aspect en "crochets" (Figure 2).

Figure 2 : L'axostyle



2.2.2. Cylindre cytoplasmique

Sa disposition est hélicoïdale autour de l'axostyle. Il contient des ribosomes.

2.2.3. Membrane cytoplasmique

C'est une membrane à **3 feuillets** qui contient certains constituants des parois bactériennes (glucosamine, a. muramique).

Elle assure la rigidité et la résistance du cytoplasme.

Il existe des mésosomes.

2.2.4. Enveloppe

L'enveloppe gaine l'ensemble des structures. Elle est séparée du cylindre cytoplasmique par un espace contenant les filaments axiaux.

Elle possède **5 couches**: 3 couches denses séparées par 2 couches claires.

Les antigènes de type seraient dans cette enveloppe.

2.3. Caractères cultureux

2.3.1. Milieux de cultures

Il n'y a pas de croissance sur milieux ordinaires. La bactérie nécessite des milieux enrichis en :

- sérum de lapin : nature liquide (**Reiter et Ramme**; Stuart) ou semi-solide (Fletcher).
- albumine et acides gras (tween) (**Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris**) +++.

Il est nécessaire d'ensemencer au moins 5 tubes de chacun des 2 types de milieux pour diluer les inhibiteurs (surtout le sang).

Il est possible d'utiliser des flacons d'hémocultures type BacT/Alert MB (**mycobactéries, sans supplément d'enrichissement**) pour la détection des leptospires. Permet une bonne viabilité des leptospires sur 14 jours (temps moyen de détection : 3-4 J).

2.3.2. Conditions de cultures

Les milieux doivent avoir un **pH alcalin**: 7.2 - 7.6.

La température d'incubation de 10° à 30°C; **optimum à 28°C** (lyse rapide à 37°C).

Les milieux sont à placer à l'**obscurité et agités** si possible.

Il faut réaliser un **inoculum abondant** : 1/10 du milieu de culture: ensemencer 1 volume de sang ou urine

pour 10 ml de milieu de culture, puis diluer au dixième avec 5 tubes de milieu afin de diluer les inhibiteurs.

2.3.3. Croissance

- début de croissance au 2^e J; abondante au 3^e- 6^eJ jusqu'au 10^e J.
- croissance maximale au 6^e- 14^eJ.
- conservation des cultures jusqu'à la 4^e- 6^e semaine.
- lecture des cultures tous les 5-7J.

2.3.4. Aspect des cultures

Il y a **peu de modifications macroscopiques** des milieux :

- liquide: très léger trouble: faire les prélèvements de contrôle quelques centimètres en dessous de la surface.
- semi-solide: disque linéaire à 1-3 cm en dessous de la surface: faire les prélèvements de contrôle à ce niveau.

2.3.5. Cas des prélèvements contaminés

Il est nécessaire de mettre en culture le prélèvement sur un milieu contenant de la 5-fluoro-uracile (100 mg/l), néomycine (5-25 mg/l), cycloheximide (0,5 mg/l). Ces prélèvements contaminés doivent être filtrés avec des filtres entre 0,22 µm et 0,45 µm.

Afin d'enrichir le prélèvement en bactéries, il est possible de faire un passage sur animal : hamster ou cobaye jeune; inoculation du prélèvement en intra-péritonéal (0.5-1 ml); après 10-15 min prélèvement du sang au niveau du coeur qui est mis en culture.

La mise en culture des urines est réalisée sur milieux contenant du 5-fluoro-uracile (100 mg/l) ou par filtration des urines sur membranes (diamètre entre 0,22 et 0,45 µm). Nécessité de diluer 10 fois les urines.

2.3.6. Cas des hémocultures

Le prélèvement pour hémoculture ne doit être réalisé uniquement la 1^{ère} semaine de la maladie.

Il est possible d'observer une inhibition de la croissance en présence d'héparine, d'oxalate ou de citrate de sodium. Le broyage du caillot est recommandé avant de le mettre en culture.

2.4. Résistance - Vitalité

La vitalité de la bactérie est importante malgré son apparente fragilité.

Elle survit :

- dans le sol humide (280 J)
- les eaux de pH alcalin (7,7)
- à basse température (- 8°C)

Elle est détruite par :

- dessiccation (en 10 H)
- exposition à 41°C (en 8H), à 55°C (en 5 min)
- exposition à la lumière (en 2H)
- les antiseptiques, les acides dilués (suc gastrique)

2.4.1. Conservation des souches

La conservation se fait avec des milieux de Reiter et Ramme (20% de sérum à 29°C); repiquage 2-3 fois par

an, recouvrir de vaseline ; ou en milieu glycérolé (20%) puis congélation dans l'azote liquide.

2.5. Caractères biochimiques

Il n'est pas possible de distinguer les espèces à partir des caractères biochimiques.

2.5.1. Besoins nutritifs

La bactérie n'utilise pas le glucose et le glycérol.

Les sources de carbone principales sont: utilisation des acides gras à longues chaînes, saturés ou non, acétate, pyruvate.

Les facteurs de croissance: vitamines B1, B12, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺.

La bactérie a un métabolisme **aérobie** (absence de culture en l'absence d'oxygène). Elle possède une cytochrome oxydase et une catalase.

2.6. Produits élaborés

La bactérie produit une hémolysine (**sphingomyélinase**) active sur les hématies humaines et de lapin par certains sérotypes.

Certains sérotypes produisent aussi une **toxine cytopathogène**.

2.7. Caractères antigéniques

Les connaissances sont réduites sur ce sujet.

Elle possède 3 antigènes :

- **antigène H** (flagellaire), de nature protéique, ayant un rôle dans la réaction d'agglutination-lyse.
- **antigène O** (paroi), de nature polysidique, ayant un rôle dans l'immunité.
- **antigène d'enveloppe**, de nature inconnue, ayant un rôle dans la réaction d'agglutination-lyse.

La bactérie entraîne la formation d'anticorps homologues spécifiques pour chaque sérotype.

3. Pouvoir pathogène

3.1. Pouvoir pathogène expérimental

3.1.1. Animaux sensibles

Il s'agit préférentiellement du **cobaye** +++ vis-à-vis de *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *hebdomadis*.

Le rat, souris donnent des infections inapparentes.

Le **hamster jeune** est sensible vis-à-vis de *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *canicola*, *pomona*, *australis*.

Il est possible d'utiliser le jeune chien ou le jeune lapin.

3.1.2. Tableau clinique

Injection en intra-péritonéal de 1-2 ml du prélèvement (sang, urine) à au moins 3 cobayes.

- 4°-5° J: hyperthermie à 41°C, amaigrissement
- 6°-7° J: subictère, congestion des conjonctives, hémorragies puis généralisation de l'ictère.
- 9°-12° J: mort
- autres manifestations: maladie atténuée non mortelle nécessite un passage sur un 2° animal (sang, urine)

3.1.3. Autopsie

A l'autopsie, la coloration est ictérique, jaune safran, généralisée, au niveau des téguments et tissus :

- tâches hémorragiques diffuses
- augmentation de volume du foie et cortico-surrénales
- examen microscopique du sang puis mise en culture des reins.

3.2. Pouvoir pathogène naturel

Les 3 sérogroupes les plus fréquemment isolées en métropole sont *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* et *Australis*.

- **85% des leptospiroses sont anictériques.**
- Elle se manifeste chez l'homme par un syndrome général associant des signes fondamentaux communs et des signes facultatifs.

3.2.1. Signes fondamentaux

Les signes fondamentaux sont :

- **syndrome fébrile** : 40°C en plateau pendant 4 à 8 J.
- **syndrome douloureux** : myalgies, arthralgies, ostéoalgies.
- **syndrome méningé** constant, souvent infra-clinique avec réaction lymphocytaire (pléiocytose + protéinorachie)
- **hépto-néphrite**:
 - ictère intense ou subictère.
 - créatininémie élevée.
 - cytolysé hépatique.
 - albuminurie, cylindrurie, hématurie.
 - leucocyturie.
 - thrombocytopénie, polynucléose sanguine.
 - azotémie -----> mort.
- **syndrome vasomoteur** avec injection conjonctivale intense.

3.2.2. Signes facultatifs

- syndrome hémorragique avec *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*.
- phénomènes exanthématisés avec *L. grippotyphosa*.
- manifestations respiratoires avec *L. grippotyphosa*.

3.2.3. Evolution

- incubation entre 10-12 J (3 à 30 J)
- début brutal, aigu en 24-48 H
- 1^{er} cycle fébrile = stade septicémique

- guérison apparente: dure 2 à 5 J, apyrexie
- rechute fébrile sans nouveaux signes cliniques
- convalescence: asthénie importante et durable
- guérison sans séquelles

3.3. Physiopathologie

La maladie commence par une courte phase de **multiplication locale** au niveau de l'inoculation :

- infection générale par voie hématogène = hémoculture positive au début
- envahissement de tous les tissus: surrénales, foie, reins + localisations secondaires
- élimination ensuite par les urines.

Les mécanismes de virulence sont mal connus :

- les souches virulentes induisent l'apoptose des macrophages et des hépatocytes.
- il existe une activité hémolytique due à des sphingomyélinases (variable selon les sérovars).

Le rôle de ces facteurs n'est pas défini.

3.4. Immunité

Elle entraîne une **protection non totale** après la maladie ou la vaccination. Il existe une immunité spécifique de chaque sérotype.

La réponse immunitaire humaine est détectée dès le 8^{ème} jour chez l'homme. Ces anticorps sont **opsonisants** et mettent en jeu la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires. Les leptospires peuvent être lysées par le système anticorps/complément.

Les vaccins sont constitués de souches tuées.

- 2 injections en 15 J d'intervalle.
- Rappel à 6 mois, tous les 2 ans.
- Durée de l'immunité : 2 ans.

Il existe une allergie cutanée pour dépister les sujets sensibilisés avec la leptospirine.

3.5. Prophylaxie – Traitement

3.5.1. Prophylaxie

Les principales mesures à mettre en œuvre sont :

- lutte contre les rongeurs et animaux sauvages.
- une stérilisation des eaux stagnantes : éviter les baignades.
- une protection des sujets exposés par des bottes et des gants imperméables
- réaliser des enquêtes sérologiques dans les élevages.

Le choix du vaccin est selon la profession et la région : vaccin inactivé anti-*Icterohaemorrhagiae* en France.

Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire et une maladie professionnelle.

3.5.2. Sensibilité aux antibiotiques

La bactérie est sensible à tous les antibiotiques.

Plus particulièrement :

- **pénicilline G IV** (6 M/24h), ampicilline *per os* au début.
- **C3G**.
- **chloramphénicol**.
- **tétracyclines** (doxycycline) pour l'antibioprophylaxie (hebdomadaire).

3.5.3. Traitement

Le traitement est essentiellement symptomatique.

L'antibiothérapie n'est administrée que dans les formes sévères. Son efficacité est réduite si elle est tardive: à débiter précocément pour éviter l'apparition des lésions hépatiques et rénales (avant le 4^{ème} jour).

3.6. Epidémiologie

3.6.1. Répartition géographique

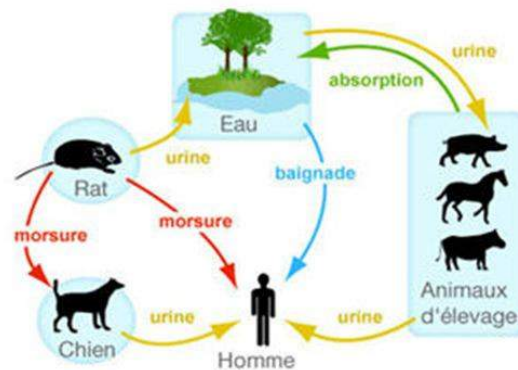
C'est une anthrozoonose: la maladie humaine est rare et accidentelle. La distribution des sérotypes dans les pays d'endémies comporte 5 à 7 sérotypes différents, toujours les mêmes dans un même pays (7 en France).

On dénombre environ **300 cas en métropole** par an. La fréquence est plus grande dans les DOM-TOM.

3.6.2. Cycle épidémiologique (Figure 3)

- 1e étape: infection inapparente surtout chez les rongeurs qui éliminent la bactérie toute leur vie.
- 2e étape: les **eaux de pH neutre ou alcalin**, de **température tiède** assurent la survie des leptospires.
- 3e étape: les victimes sont les animaux et accidentellement l'homme.

Figure 3 : Cycle épidémiologique



3.6.3. Mode de contamination

La contamination professionnelle concerne: égoutiers, équarisseurs, vétérinaires, agriculteurs, rizières.

Il existe une fréquence saisonnière avec les baignades :

- par **transmission indirecte** par immersion ou contact avec des eaux contaminées,
- **transmission directe** par contact avec des animaux infectants.

La pénétration est muqueuse par voie nasale, conjonctivale, digestive haute, transcutanée. Elle n'est jamais digestive en raison de l'acidité gastrique.

4. Diagnostic de laboratoire

4.1. Chronologie des examens en fonction de l'évolution

Il existe 3 phases :

- Phase septicémique: hémoculture et LCR jusqu'au 8ème jour.
- Phase immunitaire: débute au 6ème jour pour les IgM (non spécifique du sérotype en cause).
- Phase d'élimination des leptospires dans les urines du 15ème au 25ème jour en l'absence d'antibiothérapie.

4.2. Diagnostic direct

4.2.1. Prélèvements

Sang : recueil sur héparine ou EDTA (jamais de citrate).
examen en MO à fond noir (spécificité médiocre, nombreux pièges)
ensemencement sur milieux de cultures appropriés (cf Q.S.)
inoculation à l'animal avec prise de température.

LCR : idem.

Urines : en l'absence d'antibiothérapie.
ensemencement rapide car lyse des bactéries en moins de 6 h.
addition de 5 fluoro-uracile pour les urines contaminées.
inoculation à l'animal.

Pour l'amplification génique, les mêmes prélèvements peuvent être utilisés.

4.2.2. Culture

Il est possible de mettre les prélèvements en culture en utilisant des milieux spécifiques : Ellinghausen et McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH), incubé à environ 29°C.

Le temps de génération de ces bactéries étant long, l'incubation est poursuivie pendant 2 mois. L'identification des souches isolées est réalisée par le Centre National de Référence des Leptospires.

La détermination du sérotype se fait avec une batterie de sérums pour recherche d'une micro-agglutination (fonction du titre le plus élevé).

La recherche du sérovar est du domaine des laboratoires de référence (technique d'agglutination – adsorption).

4.2.3. Amplification génique

Diagnostic par PCR : amplification des gènes *rrs* (331 bp) spécifique du genre *Leptospira* associée à une hybridation, *lipL32*, *hap1*(animaux).

Le diagnostic d'espèce utilise les techniques de biologie moléculaire : sondes, MRSP (Mapped Restriction Site Polymorphisms), hybridation ADN/ADN

4.3. Diagnostic indirect

Positivité des réactions sérologiques à partir du 6ème jour.

4.3.1. Réaction macroscopique ou macro-agglutination sur lame

Elle n'est plus recommandée.

4.3.2. Méthode par ELISA

Elle se réalise avec l'antigène *L. biflexa* sérovar patoc. Son intérêt est de détecter les IgM (6^{ème} jour) et les IgG.

Le seuil fixé à 1/400.

Cependant, dans de nombreux cas de leptospirose dus aux sérogroupes *Grippityphosa* et *Australis*, les IgM ne sont pas ou mal détectées. Cette réaction se négative généralement dans un délai de 2 à 3 mois.

4.3.3. Réaction microscopique d'agglutination-lyse (MAT)

C'est la réaction de **Martin - Pettit**, Kolochine-Erber.

Ile met en jeu les propriétés lytiques et agglutinantes du sérum pour le sérotype utilisé: bactériolyse en présence de complément.

Sa lecture associe la présence de leptospires libres, la force d'agglutination, l'intensité de la lyse.

Le titre-seuil \geq à 100. ou augmentation par 4 du titre entre un sérum précoce et tardif.

La limite de la réaction se lit dans la dilution présentant moins de 50% de leptospires demeurées libres entre les agglutinats et non plus celle présentant une moindre différence avec la dilution supérieure.

-La réaction est positive dès le 8^{ème}-10^{ème} jour. On observe une décroissance des titres en 3-6 mois avec quelques fois des taux résiduels au-délà.

Il existe des faux :

- positifs : sujets guéris avec anticorps mais cinétique plate.
- négatifs:
 - prélèvement précoce
 - antibiothérapie précoce.
 - sérotype inhabituel
 - variations individuelles.

Annexes

Bibliographie

- **Cerqueira GM, Picardeau M.** : *A century of leptospirosis strain typing. Infect Genet Evol* 2009; 9:760-768.
- **Griffith, M. E., L. L. Horvath, W. V. Mika, J. S. Hawley, J. E. Moon, D. R. Hospenthal, and C. K. Murray.** : *Viability of Leptospira in BacT/Alert MB media. Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 54:263-266.2006.
- **Haute Autorité de Santé.** : *Diagnostic biologique de la leptospirose. Textes long et court. Juin 2011.*
- **Levett PN.** : *Leptospirosis. Clin Microbiol Rev* 2001; 14:296-326.
- **Picardeau M, Cornet M, Morel V, Sertour N, Chaumet D, Brachet E, Bourhy P.** : *Impact du changement de nomenclature médicale sur le diagnostic et la surveillance de la leptospirose en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 2008 ; 37:329-331.
- **REMIC.** : *Diagnostic biologique de la leptospirose. 4ème édition du Référentiel en Microbiologie de la Société Française de Microbiologie.*2010.
- **Thaidapunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, et al.** : *Diagnostic accuracy of real time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PloS One* 2011; 6:16236.

Francisella tularensis - Tularémie

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2014

Table des matières

1. Généralités.....	3
2. Caractères de la bactérie.....	4
2.1. Morphologie.....	4
2.2. Caractères cultureux.....	4
2.3. Caractères d'identification.....	4
3. Habitat - Epidémiologie.....	4
4. Transmission.....	5
4.1. Transmission directe (Figure 5).....	5
4.2. Transmission indirecte.....	5
5. Physiopathologie.....	5
6. Pouvoir pathogène naturel.....	6
6.1. Incubation.....	6
6.2. Invasion.....	7
6.3. Formes principales (Figures 8-10).....	7
7. Diagnostic de laboratoire.....	8
7.1. Prélèvements.....	8
7.2. Culture.....	8
7.3. Techniques moléculaires.....	9
7.4. Sérologie.....	9
7.5. Interprétation des résultats.....	9
8. Activité des antibiotiques - vaccin.....	9
8.1. Antibiotiques.....	9
8.2. Vaccin.....	9
8.3. Prophylaxie.....	9
8.3.1. Chez l'homme.....	9
8.3.2. Chez l'animal.....	10
Annexes.....	10

1. Généralités

La tularémie est aussi appelée **maladie de Francis**, fièvre de la mouche du daim, maladie de Ohara, Yato-Byo, fièvre de la vallée de Pahvant. C'est une zoonose, mal connue, qui peut être grave.

Cette maladie et son agent ***Francisella tularensis*** ont été étudiés de 1911 à 1924 par Mac Coy, Chapin, Lamb, Francis, Parker et Spencer en Californie dans le **comté de Tulare**. Ils ont montré que l'affection qui sévissait chez les écureuils et les lapins sous la dénomination de «pseudo-peste des rongeurs» ou encore le daim était la même qui sévissait chez l'homme sous des dénominations diverses «fièvre de la mouche du cerf ou deer fly fever», que son agent était identique et que certains vecteurs pouvaient jouer un rôle dans la transmission de la maladie.

Cette maladie sévit dans diverses régions du monde, plus particulièrement dans l'**hémisphère Nord** (Figure 1). En France, elle a été découverte en 1946, mais est suspectée depuis 1932. Elle existe, le plus souvent, sous forme de cas sporadiques aussi bien chez l'homme que l'animal, mais des cas groupés peuvent se manifester (Figure 2).

La maladie a pris une plus grande importance depuis les événements de septembre et octobre 2001 aux Etats-Unis. Cette bactérie fait partie des micro-organismes potentiellement utilisables comme arme biologique étant donné son caractère dangereux et virulent. C'est un **micro-organisme de classe 3** pour *F. tularensis* subsp. *tularensis*. En revanche, *F. tularensis* subsp. *holartica*, la seule isolée en France, appartient à la classe 2.

C'est une **maladie contagieuse et inoculable**.

Trois caractères sont importants :

- Importance cynégétique (réseau de surveillance SAGIR)
- Importance hygiénique (zoo-anthroponose)
- **Bioterroriste** éventuel

Famille des *Francisellaceae*, 2 espèces : *F. tularensis*, *F. philomiragia*.

F. tularensis : 4 sous-espèces : *tularensis*, *holartica* (3 biogroupes), *mediasiatica*, *novicida*.

F. tularensis subsp. *holartica* est la seule espèce/sous-espèce présente en France.

Bactérie de classe 3 sauf *F. tularensis* subsp. *holartica* (classe 2).

Figure 1 : Zoonose de l'hémisphère Nord

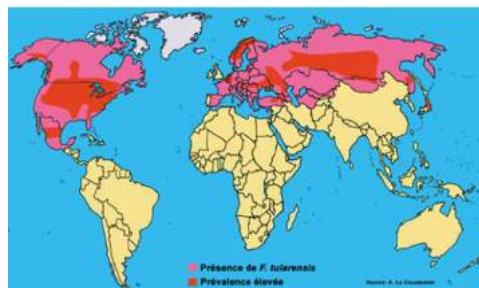
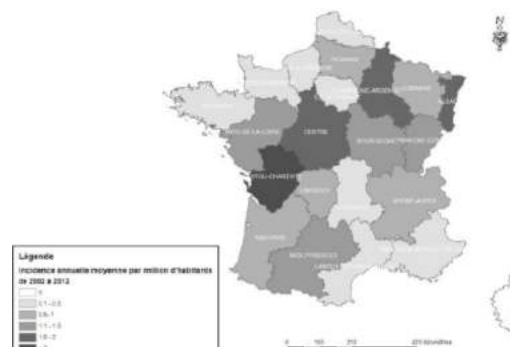


Figure 2 : Incidence des cas de tularémie déclarés par région de France de 2002- à 2012



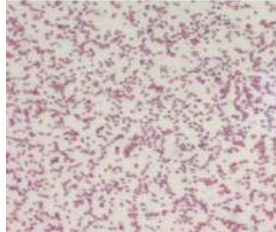
2. Caractères de la bactérie

2.1. Morphologie

Cocco-bacille à Gram négatif, non sporulé (Figure 3)

Immuable, **aérobie strict**

Figure 3 : Cocco-bacille à Gram négatif, non sporulé



2.2. Caractères cultureux

Milieu de Francis (**riche en cystéine**).

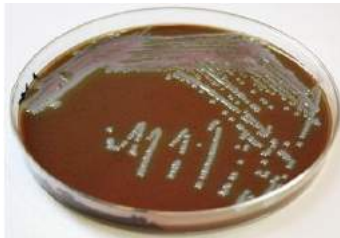
milieu pour *Legionella* : BCYE-a sans antibiotique, gélose chocolat enrichie.

Croissance sur gélose au sang cuit polyvitaminée en 2-4 jours (incubation pendant au moins 10 J) à 37°C sous 5% de CO₂.

Aspect des colonies :

- **aspect nacré, glaireux** (Figure 4)
- absence d'hémolyse

Figure 4 : Aspect des colonies



2.3. Caractères d'identification

Caractères positifs : catalase positive faible

acidification faible des sucres, sans gaz

Caractères négatifs : oxydase

uréase

nitrate réductase

indole

H₂S

gélatinase

3. Habitat - Epidémiologie

Zoonose de l'hémisphère Nord (Figure 1).

En France : Alsace, Franche-Comté, Lorraine, Champagne, Bourgogne, Rhône-Alpes, Massif Central, Gers, pays de Loire (Figure 2).

Isolée chez de nombreuses **espèces animales domestiques ou sauvages** : mammifères, oiseaux, poissons, amphibiens, reptiles, arthropodes.

Les réservoirs de germes sont : rongeurs, lagomorphes, tiques.

Evolution de la maladie chez les animaux sous forme d'une bactériémie massive (présence dans le sang, les excréments et sécrétions animales).

Résistance plus importante à 0°C plutôt qu'à 10°C. 9mois dans les boues, eaux, paille, grains.

Survie de quelques jours sur les cadavres au-dessus de 5°C.

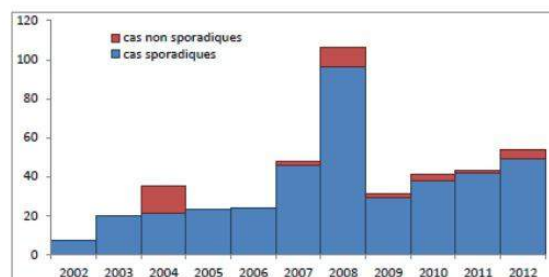
Population touchée : gardes-chasses, forestiers, chasseurs, agriculteurs.

4. Transmission

4.1. Transmission directe (Figure 5)

- **voie cutanée ou muqueuse** à travers la peau saine par manipulation des cadavres ou animaux.
- **voie respiratoire** sous forme d'aérosols lors des autopsies, poussières de fourrage, litière, par exemple.
- **voie digestive** par ingestion de viande crue ou mal cuite. Due à la forme pharyngée ou angineuses car la bactérie est détruite par 10 min à 55-60°C.
- **ingestion d'eau contaminée.**

Figure 5 : Nombre de cas sporadiques et non-sporadiques de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012



4.2. Transmission indirecte

Morsure ou **piqûre** d'arthropodes hématophages (moustiques en Suède, tiques).

Morsure ou griffures de chat.

Le cycle d'entretien est fondé sur la population des micro-mammifères en association avec les arthropodes.

5. Physiopathologie

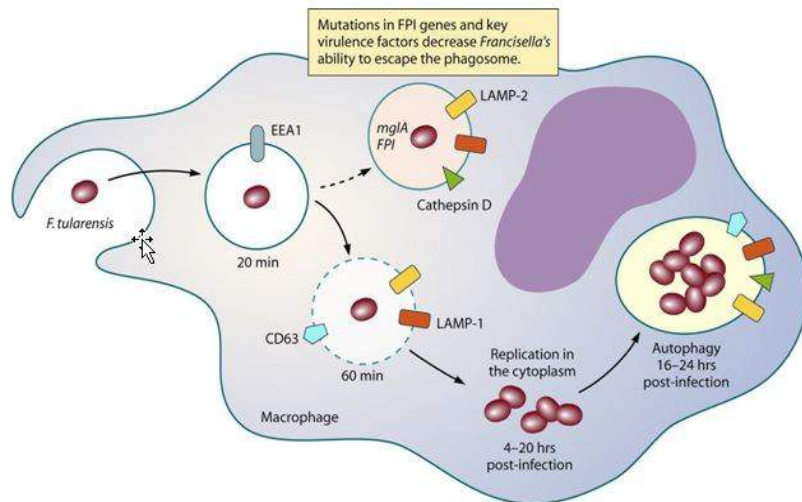
Outre **letropisme d'espèce** très prononcé pour les rongeurs, les lagomorphes et accidentellement l'homme, il convient d'indiquer le **tropisme du derme et d'organes** avec l'atteinte du système réticulo-histiocytaire (ganglions lymphatiques, rate, foie). Il s'agit de **bactéries intra-cellulaires strictes**, du moins *in vivo*.

Après pénétration (cutanée, la plus courante, ou d'une muqueuse), la bactérie se multiplie localement et gagne les ganglions lymphatiques locaux pour passer finalement dans le sang. Après phagocytose par les macrophages, *F. tularensis* **inhibe la fusion phagosomes-lysosomes** mais une acidification des phagosomes est indispensable à la multiplication bactérienne (Figure 6).

Elle se multiplie ensuite dans le **foie** (multiple abcès visibles à l'œil nu) et la **rate** (splénomégalie marquée) (cf image ci-dessus). La réponse immunitaire, principalement à médiation cellulaire, est responsable de la formation de granulomes (cf ci-dessous). Son nouveau passage dans le sang provoque une septicémie, souvent mortelle chez l'animal.

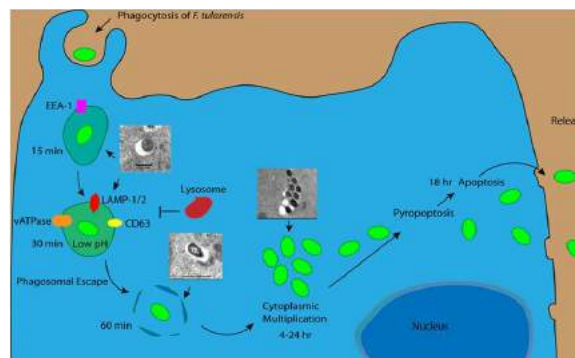
Les **facteurs de pathogénicité** (Figure 7) commencent à être mieux connus avec la mise en évidence de l'excrétion de la **phosphatase acide** qui inhibe rendement ("burst") oxydatif des polynucléaires comme déjà rapporté pour deux autres pathogènes intracellulaires: *Leishmania* et *Legionella*. Elle possède aussi un **LPS** apparemment commun à toutes les souches dont l'activité endotoxinique est faible. Le LPS n'induit pas la synthèse d'IL-1 par les cellules mononucléées et provoque la synthèse de faibles quantités de TNF par les macrophages. Le LPS semble nécessaire pour la croissance intra-macrophagique. La **capsule** joue un rôle dans la virulence, les souches non capsulées étant peu pathogènes. Enfin, celle-ci n'est pas indispensable à la survie dans les phagocytes mais joue un rôle essentiel pour la résistance au pouvoir bactéricide du sérum.

Figure 6 : Acidification des phagosomes



Roger D. Pechous , Travis R. McCarthy, and Thomas C. Zahrt
Microbiol. Mol. Biol. Rev. December 2009; 73:684-711

Figure 7 : Les facteurs de pathogénicité



Rexford Asare and Youssef Abu Kwaik
Front. Microbiol., 13 January 2011

6. Pouvoir pathogène naturel

Entraîne des signes cliniques pour un **très faible inoculum** : 10 bactéries.

6.1. Incubation

2 à 10 jours.

6.2. Invasion

Associe hyperthermie + frissons + myalgies + malaise général + asthénie.

6.3. Formes principales (Figures 8-10)

- **forme ulcéro-glandulaire** : la plus fréquente (75-85% cas). Après inoculation par voie cutanée (mains et ganglions axillaires). Réapparition de la lésion primaire lors de l'apparition de l'adénopathie (signe pathognomonique).
- **forme ganglionnaire** sans lésion cutanée (5-10% cas).
- **forme typhoïde** : (5-10% cas) : fièvre nue ou faisant suite à une des autres formes. Forme septicémique. Evolution courte et sévère
- **forme oculaire** (1-2% cas) **syndrome oculo-glandulaire de Parinaud** : conjonctivite unilatérale et adénopathie.
- **forme angineuse** ou pharyngo-glandulaire après ingestion : amygdalite résistante aux b-lactamines et gg lymphatiques régionaux
- autres formes : pneumonie apparaissant pour un inoculum très faible (environ 10-20 bactéries), méningée.

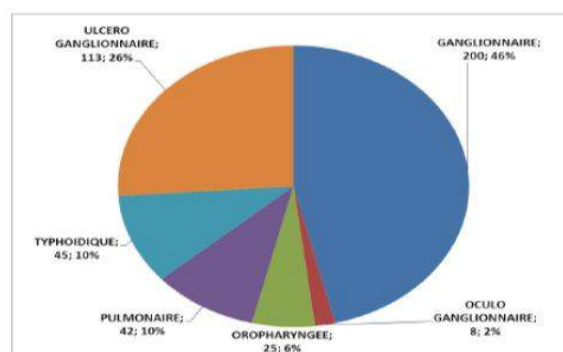
Figure 8 : Formes principales



Figure 9 : Formes principales



Figure 10 : Distribution des formes cliniques parmi les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012

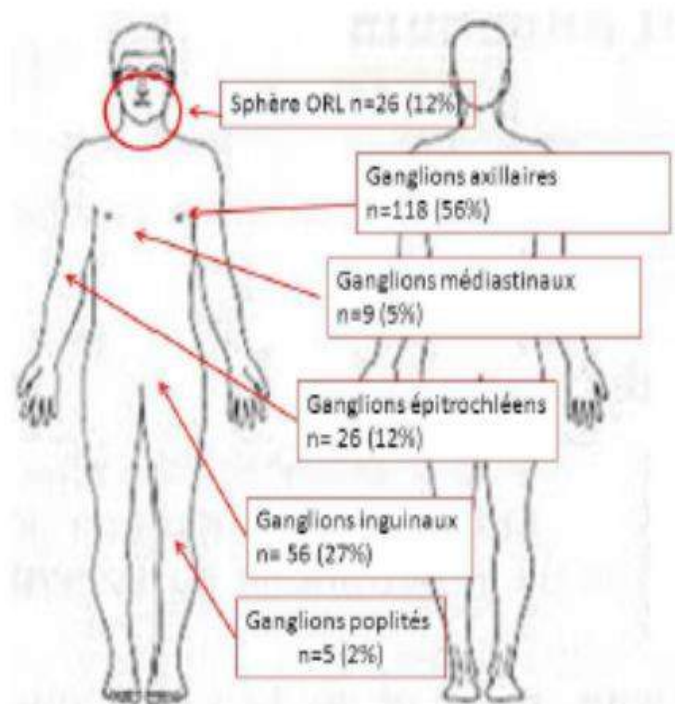


Traiter le plus précocement possible, avant l'apparition des adénopathies (Figures 11-12).

Figure 11



Figure 12 : Distribution des adénopathies chez les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012



Evolution subaiguë ou chronique
Mortalité : 1 à 6 % sans traitement.

C'est une **maladie à déclaration obligatoire**.

Les principales professions à risques sont les agriculteurs, les forestiers, les bouchers-cuisiniers (Figure 13)

Figure 13 : Les principales professions à risques

7. Diagnostic de laboratoire

7.1. Prélèvements

Prélèvements :

- sérosités à partir du site suspect d'inoculation.
- adénopathie (à faire précocement car négativation en moins de 10 jours).
- exsudats niveau conjonctival ou pharyngé, dont rinçage oro-pharyngé
- hémocultures

Ensemencement rapide ou mise à +4°C.

Ecouvillon avec milieu de transport de type Amies ou Cary-Blair (milieu au thioglycolate)

Prélèvement de sérums précoce et tardif.

7.2. Culture

Voir plus haut pour les milieux

Sensibilité < 25%

7.3. Techniques moléculaires

Plusieurs cibles pour PCR sont possibles :

- Gène codant pour l'ARN ribosomique 16S
- Gène d'une protéine de surface 23 kDa
- Gène *Ftu4* codant une protéine de 17kDa
- Séquence d'insertion *ISFtu2*
- Gène *fopA* codant une b-fructofuranosidase

7.4. Sérologie

Recherche des anticorps par micro-agglutination en tube (la plus utilisée), immunofluorescence indirecte ou ELISA.

Apparition des anticorps après 2 semaines, maximum après 3-4 semaines.

En raison de la persistance de titres élevés d'IgG et parfois d'IgM, seule une séroconversion permet d'établir le diagnostic.

7.5. Interprétation des résultats

Faire faire la confirmation par le Centre National de Référence (URMITE 6236, Marseille).

Le CNR fait le typage de la souche.

La PCR permet un diagnostic précoce. Sa sensibilité est meilleure que la culture (> 75%).

En sérologie, le titre significatif est ≥ 160 mais un titre précoce de 40, voire de 20 peut être présomptif de la maladie.

Il existe des phénomènes de zone en sérologie, d'où faire des dilutions.

La sérologie ne permet pas d'identifier la sous-espèce.

Il existe des réactions croisées avec *Brucella*, *Proteus vulgaris* OX19 et *Y. enterocolitica* O9.

N.B. S'agissant d'une bactérie de classe 3, toutes les manipulations doivent être réalisées en laboratoire de confinement de classe 3.

8. Activité des antibiotiques - vaccin

8.1. Antibiotiques

Antibiotiques actifs : **aminosides** (streptomycine, gentamicine)

Antibiotiques actifs avec risque d'échec thérapeutiques : fluoroquinolones, tétracyclines, chloramphénicol.

Echecs thérapeutiques : b-lactamines (pénicillines et céphalosporines).

Synergie entre amoxicilline ou ticarcilline et acide clavulanique.

Résistance du biotype II de *F. tularensis* subsp. *holartica*.

8.2. Vaccin

Immunité essentiellement cellulaire.

Protection de plusieurs années après la maladie.

Vaccin avec la souche *F. tularensis* LVS vivante atténuée.

8.3. Prophylaxie

8.3.1. Chez l'homme

Après exposition : possibilité d'administrer une fluoroquinolone ou une tétracycline pendant 14 J.

Emploi d'insecticides.

Usage de vêtements de protection contre les arthropodes dans les zones d'enzootie.

Emploi de masques, de gants et de lunettes pour manipuler les dépouilles d'animaux sauvages.

Désinfecter le pelage à l'alcool à 70°C avant autopsie.

Ne pas boire d'eau non traitée en zone suspecte ou giboyeuse et bien cuire les viandes d'animaux sauvages en région d'enzootie.

Respecter les règles générales d'hygiène.

8.3.2. Chez l'animal

Prophylaxie sanitaire défensive: Agir sur le réservoir animal par le contrôle des densités de petits mammifères, lutter contre les arthropodes piqueurs, limitation des importations de lièvres d'Europe Centrale.

Protection des élevages: quarantaine de déparasitage des nouveaux animaux, antibioprévention (streptomycine, tétracyclines) lors d'infection déclarée dans un élevage d'ovins ou de primates.

Protection des locaux contre les rongeurs sauvages et séparation géographique, réelle, des espèces (pour éviter une contamination par des puces par exemple).

Prophylaxie sanitaire offensive: La tularémie n'est plus une maladie réputée légalement contagieuse depuis 1996 (MLC) chez toutes les espèces de rongeurs et de lagomorphes domestiques et sauvages. Leurs importations, morts ou vivants, ou celles de leur peau est soumise à contrôle. Ainsi des cas de tularémie ont été récemment observés en Belgique chez des chiens de prairie importés des USA.

Mesures de police sanitaire: Malheureusement, il n'y a plus actuellement obligation de déclarer tout rongeur ou lagomorphe vivant ou mort suspect de tularémie ainsi que toute mortalité élevée de lièvres ou lapins de garenne.

Pour les rongeurs et lagomorphes sauvages, une information est diffusée par l'ONC (<http://www.oncfs.gouv.fr/>) et le réseau SAGIR.

Annexes

Bibliographie

- **Dumas, P. H.** : *La tularémie. Revue Med. Vet.* 156 :43-49.2005.
- **Ellis, J., Oyston PC, Green M, Titball RW.** : *Tularaemia. Clin. Microbiol. Rev.* 15:631-646.2002
- **Farlow, J., D. M. Wagner, M. Dukerich, M. Stanley, M. Chu, K. Kubota, J. Petersen, and P. Keim.** : *Francisella tularensis in the United States. Emerging Infectious Diseases. Vol. 11.*2005.
- **Mailles, A., Vaillant V.** : *Bilan de 10 années de surveillance de la tularémie chez l'homme en France. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire.*2013.
- **Maurin, M.** : *Francisella. In Précis de Bactériologie Clinique. J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, Ph. Riegel eds. Editions ESKA 2007, 1387-1392.*
- **REMIC.** : *Francisella tularensis. Référentiel en microbiologie médicale de la Société Française de Microbiologie. 4ème édition. SFM éditeur.*2010.