

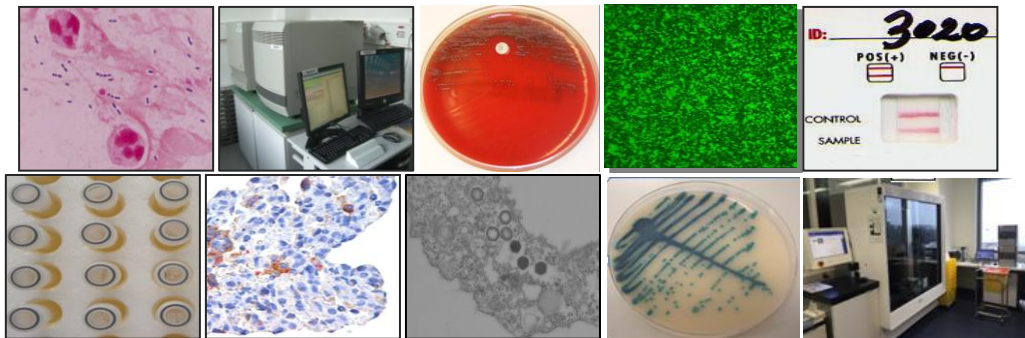
B2.2

2016-2017

Cours

MICROBIOLOGIE

"Sang, immunité, infection"



**Institut de Microbiologie
Médecine préventive hospitalière**

**Gilbert Greub
Pascal Meylan
Giorgio Zanetti**

Cours B2.2

Microbiologie : Sang, immunité, infection

Lieu : **CHUV, Bugnon 46, BH-08, Auditoire César-Roux**

Sommaire

Modules

Intervenants

Le monde microbien

G. Greub

Infection, colonisation et défense constitutive

G. Greub

Structure des bactéries

G. Greub

Classification et taxonomie bactériennes

G. Greub

Méthodes diagnostiques en microbiologie

G. Greub

Diagnostic microbiologique de la pneumonie

G. Greub

Facteurs de virulence : toxines

G. Greub

Facteurs de virulence : adhésines

G. Greub

Echanges génétiques et génomique

G. Greub

Champignons et parasites

G. Greub

Virologie : introduction et diagnostic

P. Meylan

Epidémiologie des maladies infectieuses

G. Zanetti

B2.2 Sang, immunité, infection

Le monde microbien

Gilbert GREUB

« Peu importe le voyage pourvu que l'horizon
soit vaste »
(Inconnu)

Objectifs d'apprentissage

- Connaître quelques personnes et étapes importantes dans le développement de la microbiologie médicale ;
- Comprendre l'importance des microbes dans l'environnement, ainsi que la grande diversité de symbiontes.

Rappel historique

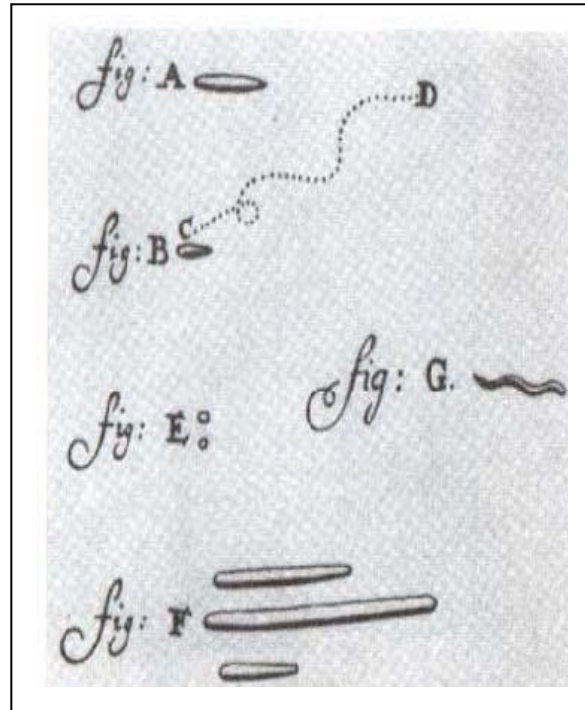
Les microbes, aussi parfois appelés germes ou microorganismes, sont omniprésents dans notre environnement et nous colonisent largement. Il existe quatre groupes principaux de microbes : les parasites, les champignons, les virus et les bactéries.

Les vers intestinaux et les amibes sont deux exemples de parasites qui montrent la variété de taille et de forme observées parmi ces eucaryotes. Parmi les champignons, on distingue notamment les moisissures que vous trouvez parfois dans vos pots de confitures, ainsi que les levures, dont celles du boulanger. Enfin, les virus et les bactéries sont les deux autres groupes principaux de microbes dont l'observation nécessite l'utilisation de microscopes. En effet, les bactéries et les virus sont des microbes qui, comme le nom l'indique, sont microscopiques. Les bactéries ont une taille d'environ 1 micron, c'est-à-dire 1 millième de millimètre.

Ainsi, la naissance de la microbiologie, la science qui étudie les microbes, date du XVII^{ème} siècle, lorsqu'**Anton van Leeuwenhoek** a construit un microscope et a pu, à l'aide de cet instrument, observer des microbes en mouvement. A cette époque, il a décrit différentes formes de microbes et les a appelés des "*animalcules*", contraction de l'expression "*animal minuscule*" (Figure 1).

Figure 1. Quelques exemples de microbes observés par Anton van Leeuwenhoek en 1674.

<https://www.google.ch/search?q=animalcules+antoni+van+leeuwenhoek&espv=2&biw=1920&bih=966&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwii942bvOHPAhUicBoKHamYB9MQsAQIJQ>



Il fallut ensuite attendre deux siècles pour que l'on s'intéresse de plus près à ces microbes et qu'on réussisse à les cultiver, c'est-à-dire à obtenir leur multiplication dans un bouillon de culture. Cette prouesse fut réalisée par **Louis Pasteur**, qui découvrit la cause de la fermentation lactique : le lactobacille, ainsi que son remède, la pasteurisation. Outre les bouillons de culture, Pasteur et les autres microbiologistes de son temps utilisaient aussi l'inoculation à l'animal pour permettre la multiplication des microorganismes.

Louis Pasteur a fait d'autres découvertes importantes. Il a notamment réfuté la théorie de la génération spontanée, et développé plusieurs vaccins. Il a également démontré la transformation de la matière organique par des bactéries.

Quelques années plus tard, **Robert Koch** fit plusieurs découvertes majeures. Tout d'abord, il décrit le bacille de Koch, causant la tuberculose, appelé *Mycobacterium tuberculosis*, et il découvrit la notion de culture pure, en découvrant par hasard une pomme de terre sur laquelle avaient poussé des colonies de bactéries de couleur et d'aspect différents. Il comprit alors que chaque type de colonie est composé d'un seul type de microbe, c'est-à-dire qu'une colonie représente une culture pure d'un microbe donné.

A l'époque, Robert Koch avait compris que « la culture est le fondement de la recherche en maladies infectieuses ». D'ailleurs, la culture pure est la base des célèbres postulats de Koch, qui permettent de confirmer la cause et l'étiologie d'une maladie infectieuse. Vu l'importance de ces postulats, ils sont rappelés ci-dessous :

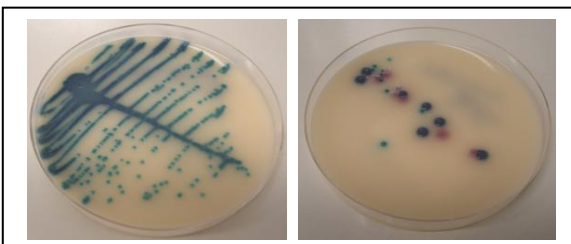
- **Premièrement**, « Le microbe doit être présent chez les malades et absent des organismes sains »
- Le **deuxième postulat** dit que pour incriminer un microbe isolé d'un malade comme la cause de la maladie, il faut que « Le microbe puisse être cultivé en culture pure à partir des personnes malades »
- Le **troisième postulat** est la reproduction de la même maladie chez l'animal : « Un animal sain inoculé avec cette culture pure doit développer la même maladie »
- Enfin, le **quatrième postulat** dit que « Le même microbe peut être re-isolé en culture pure de l'animal malade ».

Robert Koch avait compris, grâce à la pomme de terre, qu'il lui fallait utiliser un milieu solide en lieu et place du traditionnel bouillon de culture, afin de pouvoir plus facilement vérifier la pureté de la culture.

En 1887, l'assistant de Robert Koch, **Julius Petri**, inventa la boîte de Petri : une boîte circulaire en verre, d'environ 9 cm de diamètre, dans laquelle était coulé un milieu semi-solide constitué de gélatine de bœuf.

Aujourd'hui encore, plus de 120 ans plus tard, la boîte de Petri reste la base de travail du bactériologiste, lui permettant d'obtenir une culture pure de bactéries, c'est-à-dire un ensemble de colonies qui sont toutes d'aspect identique. Cette notion de culture pure, et qui correspond à la présence d'une seule espèce de bactérie sur le milieu gélosé, est essentielle à comprendre puisqu'elle est la base du diagnostic en bactériologie clinique. Par opposition, une culture mixte est composée de plusieurs espèces bactériennes différentes (Figure 2).

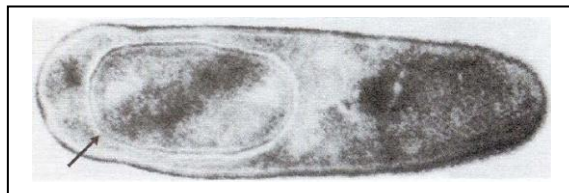
Figure 2. Culture pure (à gauche) **et culture mixte** (à droite) obtenues par inoculation d'urine sur une gélose de type URID, gélose dite chromogène permettant aisément de différencier les morphologies coloniales et utilisée en routine pour la recherche de bactéries lors de suspicion d'infection urinaire.



Aujourd'hui encore, la boîte de Petri est largement utilisée dans les laboratoires diagnostiques, et au CHUV environ 1'000 d'entre elles sontensemencées chaque jour. Ces boîtes de Petri, qui contiennent différents milieux gélosés, seront ensuite incubées et lues le lendemain, et le surlendemain, parfois pendant plusieurs jours, pour détecter d'éventuels germes présents dans les échantillons cliniques. Ainsi, on lit chaque boîte de Petri en moyenne deux fois, soit une lecture de 2'000 boîtes de Petri par jour au CHUV. La lecture consiste en une inspection visuelle des boîtes de Petri afin d'identifier les espèces courantes et de savoir, par exemple, s'il s'agit d'une culture pure ou d'une culture mixte.

John Tyndall (1877) a découvert l'existence d'endospores, un mode d'existence résistant à la pasteurisation, et qui justifie l'utilisation de températures plus élevées (upérisation). Le matériel de laboratoire est d'ailleurs actuellement autoclavé à des températures de l'ordre de 121 à 128°C pour environ 30 minutes, en raison de ces formes de résistance. Seules certaines espèces bactériennes, comme les *Bacillus* et les *Clostridium*, sont capables de faire des spores. Les spores se forment en condition extrême de dessiccation ou de manque de nutriment. Lorsque les conditions sont plus propices (humidité, nutriment, etc.), les endospores germent et donnent naissance à des formes végétatives qui se diviseront par fission binaire.

Figure 3. Endospore, visualisé par microscopie électronique.



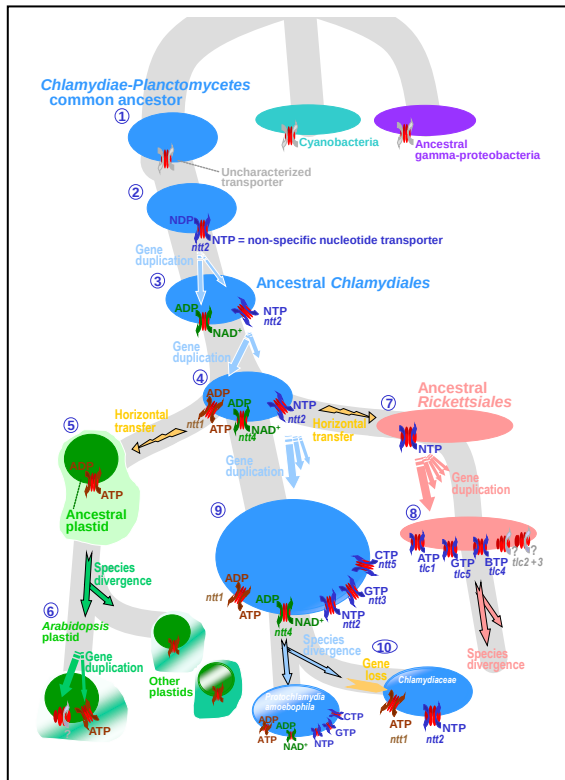
Evolution des bactéries

Les bactéries ont une longue histoire évolutive. Ainsi, les bactéries, aussi appelées procaryotes, existent depuis plus de 2.5 milliards d'années. Par opposition, les eucaryotes sont apparues il y a un peu plus d'1 milliard d'années, et ont divergé en algues, plantes et animaux il y a environ 1 milliard d'années.

Avant cette divergence des eucaryotes, les procaryotes étaient, pour certains, déjà intracellulaires, comme le témoigne, d'une part, la présence de mitochondries (qui sont des bactéries progressivement devenues prisonnières des eucaryotes) dans les différents lignées d'eucaryotes. Un autre argument est la découverte de deux gènes impliqués dans le parasitisme de la cellule hôte, similaires chez des *Chlamydia*, qui se sont

dupliqués avant leur transfert aux plantes (cf. Figure 4), et qui se retrouvent chez les plantes vertes et également chez les algues rouges. Les algues rouges ont une divergence des plantes vertes estimée à 1 milliard d'années. Ainsi, certaines bactéries ont une longue histoire d'évolution et d'interaction avec les eucaryotes, dont ils étaient des parasites intracellulaires il y a environ 1.3 milliard d'années (Greub & Raoult AEM 2003).

Figure 4. Evolution d'une protéine (l'ATP-ADP translocase) impliquée dans le parasitisme énergétique (Greub, unpublished).

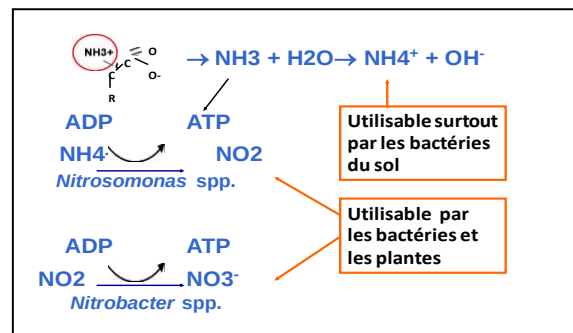


Les bactéries dans l'environnement

Le monde bactérien joue un rôle essentiel dans l'équilibre de la vie à la surface du globe. Les bactéries ont un pouvoir de multiplication exceptionnel, et une activité biochimique extraordinaire, tant en terme de biodiversité que d'efficacité. En effet, en ayant une activité biochimique à partir des éléments précurseurs, ils ont des voies métaboliques directes et une capacité répliquative impressionnante. D'autre part, certaines bactéries sont autotrophes, et peuvent produire de l'énergie à partir de substrats minéraux, notamment a) par oxydation de l'ammoniaque en acide nitreux, puis transformation de l'acide nitreux en acide nitrique (implication dans la nitrification des sols), b) par transformation de l'hydrogène sulfuré des sulfures en sulfites ou sulfates (utilisés par les plantes).

La relation des bactéries avec le monde végétal ne se limite pas à la production de sulfites et sulfates, mais également à une relation symbiotique extrêmement importante, principalement au niveau des racines des plantes, à la capacité des bactéries de synthétiser de l'azote ou de le fixer dans l'air, à leur capacité d'élaborer des substances minérales assimilables par les végétaux, et à transformer les déchets végétaux notamment en protéines, en polypeptide acide aminé, puis ammoniacque (acide carbonique et eau).

Figure 5. Le cycle de l'azote : ammonification et nitrification.



L'importance des bactéries globalement dans le cycle de l'azote, explique que les procaryotes ont précédé la vie eucaryote sur Terre et ont probablement favorisé son développement, notamment en décomposant l'acide carbonique et en libérant l'oxygène.

La symbiose

La symbiose est l'association entre deux êtres vivants pendant une certaine durée de leur existence. La symbiose est un facteur-clé dans l'évolution des bactéries, comme le montre la co-évolution des pucerons avec leurs symbiotes. Parmi la symbiose, on distingue le commensalisme, le mutualisme et le parasitisme.

Le commensalisme est l'association entre deux organismes, l'un bénéficiant et l'autre n'étant ni gêné ni avantage. On parle souvent de bactéries commensales pour la flore dite physiologique, par exemple, celle qui se trouve dans notre intestin (*Escherichia coli*, ...).

Le mutualisme est une symbiose au sens strict, puisqu'il y a un avantage réciproque. Un exemple classique de symbiose stricte est l'association entre champignons et algues, qui s'appellent les lichens, les champignons procurant de l'eau et des sels minéraux à l'algue et protégeant cette dernière de la dessiccation, alors que les algues procurent les glucides élaborés lors de la photosynthèse.

Le parasitisme est un autre exemple d'interaction, un des partenaires vivant aux dépens de l'autre. Il est important de différencier le parasitisme de la prédation, la prédation n'étant pas une interaction pendant une certaine durée, mais une interaction très courte qui amène à la destruction du partenaire. On a de nombreux exemples de parasites, que ce soit les vers parasites ou les ectoparasites (puces ou tiques).

La symbiose est donc un élément important dans l'évolution, et l'évolution n'est pas uniquement le fruit de compétition. Il a y aussi eu des coopérations, interactions et dépendances mutuelles. De plus, les bactéries (procaryotes) existent depuis plus de 2,5 milliards d'années, alors que les eucaryotes ont divergé entre algues, plantes et animaux il y a environ 1 milliard d'années. Ainsi, les bactéries ont joué un rôle majeur dans l'évolution des eucaryotes, puisqu'ils sont même à l'origine de nos organelles. Les chloroplastes, organelles essentielles pour la photosynthèse, sont dérivés de cyanobactéries ancestrales, alors que les mitochondries sont dérivées de bactéries proches des rickettsies. Les bactéries rickettsies sont d'ailleurs des parasites d'énergie, puisqu'elles peuvent voler l'ATP, molécule riche en énergie, à la cellule hôte. Ces bactéries sont d'ailleurs des parasites de tiques, qui eux-mêmes sont des parasites de différents mammifères, dont par exemple, le raton laveur.

On note donc des interactions entre bactéries et cellules à différents niveaux. Un exemple est l'interaction entre procaryotes (bactéries) et eucaryotes unicellulaires, les amibes (protozoaires). Les amibes jouent un véritable rôle de réservoir pour les bactéries internalisées, telles que les « *Chlamydia* ». Ce réservoir a également été documenté pour des bactéries dangereuses pour la santé, comme les légionelles. Ainsi, au CHUV par exemple, la probabilité d'avoir des légionelles dans un échantillon d'eau du robinet des chambres des patients, était 10 fois plus importante en présence d'amibes qu'en absence d'amibes. Cette présence d'amibes dans les réseaux d'eau est d'ailleurs due à la présence d'un biofilm qui est largement constitué de bactéries, servant de nourriture aux amibes.

Outre les symbiontes d'amibes, les symbiontes d'insectes sont extrêmement importants. Ils sont présents chez 10% des insectes, et ceux-ci dépendent de l'association avec une bactérie pour leur survie ou pour la fécondité de leur hôte. Il existe de nombreux exemples de symbiontes d'insectes, dont par exemple, ceux infectant les pucerons, les staphylins, les drosophiles ou les papillons.

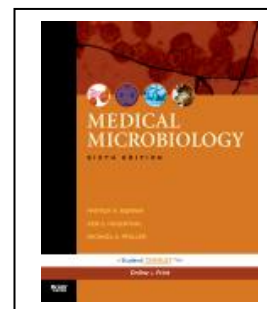
Outre les symbiontes d'insectes discutés ci-dessus, on distingue aussi des symbiontes de vers, dont l'importance médicale est majeure, puisque si l'on

prend l'exemple de la filaire *Brugia malayi*, celle-ci est particulièrement sensible à un traitement antibiotique qui va éliminer le symbionte (la doxycycline), alors que le vermifuge (Albendazole-Ivermectine) est nettement moins efficace.

En conclusion, les bactéries sont partout dans l'environnement, et jouent un rôle majeur dans l'évolution, mais également dans le métabolisme de différents substrats. Les bactéries ne sont pas toujours délétères, comme le montre l'exemple des symbioses où ils sont généralement bénéfiques à leur hôte.

Lecture recommandée:

Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, Mosby-Elsevier 2009. Chapter number 7.



B2.2 Sang, immunité, infection

Infection, colonisation et défense constitutive

Gilbert GREUB

« L'homme, véritable autobus pour les bactéries »

Objectifs d'apprentissage

- Réaliser le contraste entre les effets bénéfiques et néfastes des bactéries sur l'être humain et son environnement ;
- Comprendre l'importance des défenses constitutives contre le monde bactérien qui nous entoure.

Interaction entre microbes et êtres humains

Les êtres humains sont largement colonisés par des bactéries et l'homme peut être considéré littéralement "comme un autobus à bactéries". Cette colonisation importante, de l'ordre de 10^{14} à 10^{15} bactéries par être humain, contrastant avec les 10^{12} – 10^{13} cellules qui nous composent, nécessite un équilibre écologique finement régulé. D'autre part, ce nombre élevé de bactéries explique l'importance de la colonisation bactérienne comme possible prélude à certaines infections et maladies infectieuses.

La colonisation est un état physiologique compatible avec un état de parfaite santé physique, mentale et sociale. L'infection, quant à elle, est définie comme l'entrée du microorganisme ("*inficire*" en latin signifie "infiltrer, entrer"). L'infection, qui peut être totalement asymptomatique, doit être différenciée de la maladie infectieuse, qui s'associe à une modification d'un organisme ou de ses organes, et qui perturbe leurs fonctions.

Pour compléter un cycle infectieux, une bactérie doit être capable d'entrer, de se multiplier, puis de sortir de son hôte.

L'entrée se caractérise généralement par une étape d'adhérence aux muqueuses suivie d'une invasion, qui définissent indirectement la virulence d'une bactérie (cf. chapitre 7). La multiplication est aussi fonction de la virulence du germe, qui elle-même traduit un certain degré de pathogénicité et de capacité de dissémination de la bactérie (cf. chapitre 8). Enfin, la sortie du microorganisme complète le cycle infectieux et rend compte de la contagiosité d'une personne infectée. La sortie va être également dépendante de la réponse immunitaire et de la durée de la maladie (infection aiguë ou chronique).

D'une manière générale, une espèce bactérienne peut coloniser, puis infecter un hôte, causant des lésions (maladie infectieuse). Il est rare qu'une espèce bactérienne ne cause qu'un type précis d'infection. En général, une espèce bactérienne peut donner de multiples formes d'infections. Ainsi, à titre d'exemple, *Escherichia coli* peut causer des cystites (infection urinaire), mais peut également causer des infections gastro-intestinales, des infections de plaies, etc. Certaines souches sont plus à risque de causer des infections urinaires, par exemple en raison de la présence de facteurs de virulence particulier (présence de *fimbriae*) permettant l'adhésion à l'urothélium.

Le grand dilemme est de préserver une interaction symbiotique avec notre flore commensale qui permet d'empêcher l'invasion par les germes pathogènes. En effet, comme on le verra plus tard (page 4, Défenses constitutives), les bactéries servent de barrière biologique contre les infections. Cet équilibre précaire entre interaction symbiotique et risque d'infection est obtenu grâce aux défenses immunitaires : globules blancs (leucocytes), macrophages (qui peuvent englober et digérer les germes par phagocytose), défenses humorales (anticorps dirigés contre les bactéries elles-mêmes, les toxines bactériennes, ou certaines structures bactériennes comme les flagelles). Par ailleurs, les défenses constitutives, non immunes, permettent de compléter ces différents axes de défense.

De manière thérapeutique ou préventive, il est possible de renforcer les défenses de l'hôte. On distingue la vaccination (immunothérapie active), qui consiste en l'injection de bactéries atténuées ou tuées, ou de toxines inactivées (anatoxines). La vaccination permet de développer une immunité de longue durée, de l'ordre d'années, et se développe en quelques mois. Elle n'a qu'une utilisation préventive. Par opposition, la sérothérapie (immunothérapie passive) consiste en l'injection d'anticorps (sérum hyper-immun) dirigés contre une bactérie ou une toxine. Elle procure une immunisation de courte durée, mais qui confère une protection immédiate et a donc une utilité thérapeutique (et/ou préventive).

Les relations entre hôte et bactérie sont complexes et, outre le risque de causer des infections, les bactéries qui nous colonisent (notre microbiota) peuvent être impliquées dans la pathogénèse d'une maladie non-infectieuse, telles que l'obésité, le diabète, les allergies, l'asthme, les maladies cardiovasculaires et les maladies inflammatoires. On note d'ailleurs certains effets néfastes de probiotiques, et le rôle non négligeable des antibiotiques sur la prise pondérale, et ceci est directement lié à des changements de la flore digestive.

Flore normale: rôles bénéfiques et délétères

Comme discuté ci-dessus, nous sommes colonisés par une flore relativement nombreuse, dont la composition sera détaillée dans un cours ultérieur (chapitre 7). Cette flore a des rôles bénéfiques et des rôles délétères.

Dans les rôles bénéfiques on peut noter la prévention de la colonisation par des pathogènes, grâce à la présence de bactéries dites commensales (*cum mensa* signifiant "manger avec"). Le commensalisme est une association de deux êtres vivant pendant une certaine durée de leur existence, dans laquelle un organisme bénéficie de l'association, l'autre n'étant ni gêné, ni avantagé.

En pratique, on peut citer trois exemples des effets bénéfiques de cette flore normale :

- **Peau** : au niveau de la peau, la production d'acides gras par certaines bactéries empêche la colonisation et/ou l'invasion par d'autres bactéries ;
- **Tube digestif** : la présence de substances antibactériennes (bactériocine, colicine) inhibe la croissance d'autres espèces. Un traitement antibiotique qui modifiera la composition de la flore peut s'associer à une colite post-antibiotique, démontrant l'importance de cette flore commensale digestive dans la régulation de la quantité de *Clostridium difficile*, agent étiologique de la colite post antibiotique ;
- **Vagin** : l'environnement acide obtenu grâce à la production d'acide lactique et de bactériocines par les lactobacilles (bacilles Gram positif) permet la suppression de la croissance d'autres espèces et réduit le risque de colonisation par une trop forte quantité de germes pathogènes.

Les rôles délétères de la flore humaine sont relativement peu nombreux, sauf lorsque les bactéries pénétreront dans des sites normalement stériles suite, par exemple, à une blessure cutanée (invasion des tissus sous-cutanés), une perforation intestinale (risque de péritonite), ou à une extraction dentaire (pouvant conduire à des bactériémies, circulation de bactéries dans le sang). Enfin, la flore péri-urétrale, présente au niveau du périnée et fortement influencée par la flore fécale, peut conduire à des infections urinaires, expliquant la

fréquence des cystites chez les femmes, dont l'urètre est plus court que celui des hommes.

Défenses constitutives

Parmi les défenses constitutives, on distingue les défenses **biologiques** (cf. ci-dessus ; effets bénéfiques de la flore bactérienne), les défenses **anatomiques**, les défenses **physiques** et les défenses **chimiques**.

Les défenses anatomiques comprennent : sourcils (Figure 6), paupières, larmes (lavage), salive (lavage), transit intestinal (péristaltisme), turbulence de l'air dans les cavités nasales, épithélium respiratoire (cils vibratiles), réflexe de la toux, sphincter urétral, col de l'utérus, desquamation cutanée.

Figure 6. Les sourcils, les cils, les paupières et les larmes sont autant de défenses "anatomiques" protégeant les yeux des bactéries.



Outre ces défenses naturelles anatomiques, on a également des défenses "physiques". On peut donner deux exemples : la sécrétion de mucus (col) et la sécheresse de la peau, ainsi que sa température plutôt basse. Cette barrière physique importante qu'est la peau grâce à l'épaisseur de son épithélium kératinisé, peut être insuffisante lors de blessure ou lors d'inoculation de bactéries par des piqûres d'arthropodes (tiques, poux, puces).

Les défenses chimiques sont également importantes. On distingue les chélateurs du fer, des peroxydases (génération des superoxydes), le lysozyme (présent dans la salive et dégradant le peptidoglycane), le pH acide (présent au niveau vaginal, urinaire et au niveau de l'estomac) et enfin, les glandes sébacées de la peau, permettant la production de lipides.

Malgré le pH extrêmement acide de l'estomac, qui constitue une défense chimique optimale, certaines bactéries ont réussi à trouver, au cours de l'évolution, des solutions pour persister au niveau de l'estomac. Ainsi, *Helicobacter pylori* est capable de produire du NH_4^+ (ammonium), qui permet de tamponner le pH très acide de l'estomac dans la périphérie immédiate de la bactérie. Les mycobactéries peuvent également résister au pH

acide de l'estomac grâce à leur paroi particulière qui comprend des acides mycoliques.

Conclusions

En conclusion, la bactériologie a réellement été développée à la fin du XIXème siècle, principalement grâce à Louis Pasteur et Robert Koch.

Bien que dans les cours suivants nous allons nous intéresser particulièrement aux bactéries d'importance médicale, les bactéries sont également essentielles pour le développement de la vie sur Terre, ayant précédé les eucaryotes, étant capables de recycler l'azote et étant à l'origine des mitochondries et des chloroplastes. Sur un plan plus médical, il faut se rappeler des effets bénéfiques de notre flore normale et de l'importance des défenses constitutives, biologiques, anatomiques, physiques et chimiques, qui permettent un état de parfaite santé malgré une colonisation massive par des bactéries.

Lecture recommandée:

Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, Mosby-Elsevier 2009. Chapter number 7.

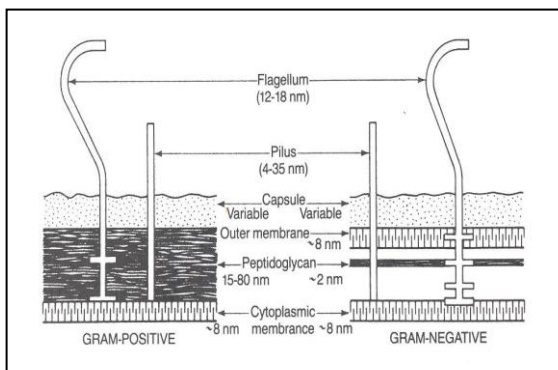


Paroi des bactéries

Les différentes espèces bactériennes présentent des parois dont la structure est très différente. Ces différences sont largement utilisées au laboratoire pour différencier ces espèces.

Ainsi, les bactéries dites Gram positif, qui se colorent en violet par le complexe violet de gentiane et lugol, comportent une paroi présentant au-dessus de la membrane cytoplasmique (couche bi-lipidique de phospholipides) une épaisse couche de peptidoglycane d'environ 10 à 80 nanomètres d'épaisseur (Figure 3). Certaines bactéries Gram positif présentent également une capsule (par ex. le pneumocoque), alors que d'autres présentent des pili ou des flagelles. Dans la paroi épaisse, composée principalement de peptidoglycane, on peut noter la présence d'acide teichoïque et lipoteichoïque. Différentes protéines peuvent être exprimées à la surface du peptidoglycane ou localisées au sein de la membrane cytoplasmique.

Figure 3. Comparaison entre paroi des bactéries Gram positif et Gram négatif.

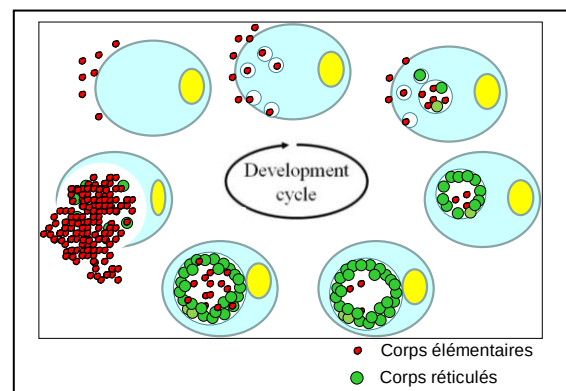


Les bactéries dites Gram négatif, qui seront colorées en rose par la coloration de Gram, présentent également une membrane cytoplasmique (phospholipides). Elles présentent par ailleurs une membrane externe, ainsi qu'une couche de peptidoglycane beaucoup plus mince que celle retrouvée chez les Gram positif (env. 2 nanomètres, cf. Figure 3). Certaines bactéries Gram négatif peuvent présenter une capsule (*Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). La présence de pili et de flagelles est variable. Entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe on note la présence d'un espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif, au sein duquel certaines protéines sécrétées à l'aide d'un signal peptidique vont être maturées avant leur sécrétion. La membrane externe présente à sa surface externe un lipopolysaccharide, composé à sa base du lipide A (acide gras et glucosamine).

Enfin, certaines bactéries fastidieuses ou intracellulaires présentent une paroi particulière.

Les mycoplasmes ne présentent pas de peptidoglycane, et sont donc de facto résistants aux antibiotiques ciblant cette structure (p.ex. dérivés de la pénicilline). Les *Chlamydia*, quant à elles, présentent un cycle de développement très particulier fait de corps élémentaires condensés (résistant aux pressions osmotiques), permettant la dissémination extracellulaire et des corps réticulés, métaboliquement actifs et capables de réplication par fission binaire (Figure 4). Ces bactéries strictement intracellulaires ne poussent pas sur des géloses ou dans des bouillons de culture.

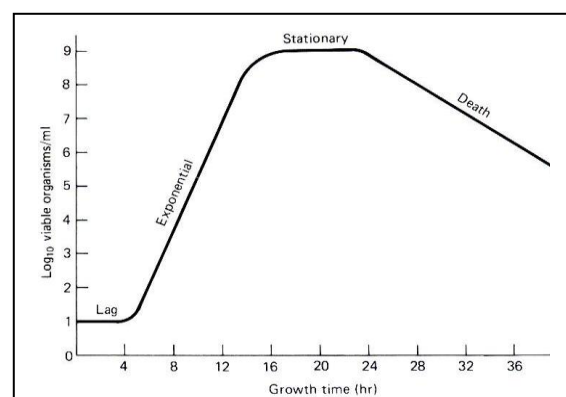
Figure 4. Cycle de développement des chlamydia comportant deux stades distincts et expliquant la phase de latence prolongée (8h environ) précédant le début de la phase de réplication exponentielle (adapté de Croxatto et al., Pathogen and Disease 2013).



Croissance bactérienne et voies métaboliques

La croissance bactérienne, extrêmement rapide, se caractérise généralement par une phase de latence (lag phase), ensuite une phase exponentielle, puis une phase stationnaire (Figure 5). Pour certaines espèces bactériennes dont le cycle de développement est bi-phasique, comme les *Chlamydia*, la phase de latence initiale peut être plus longue en raison de la nécessité d'une différenciation des corps élémentaires infectieux en corps réticulés qui vont se diviser (cf ci-dessus).

Figure 5. La croissance des bactéries se caractérise par une phase de latence initiale, suivie d'une croissance exponentielle, puis d'une phase stationnaire.



De manière générale, on peut dire qu'à partir d'un petit nombre de précurseurs métaboliques que sont les acides aminés, les nucléotides, les sucres et les acides gras, les bactéries sont capables –à l'aide d'un certain nombre de cofacteurs dont NADPH, l'ATP, des nitrosamines et des sulfures–, les procaryotes sont capables de fabriquer l'ensemble des macromolécules indispensables à leur fonctionnement (Figure 6).

The diagram illustrates the flow of precursors and building blocks for macromolecules. It is organized into several stages:

- Energy and Fueling:**
 - ATP (~P)** is shown as a precursor.
 - Glucose** is converted to **Fueling reactions** (releasing PO_4^{3-}) and **Reducing power**.
- Precursor Metabolites:**
 - A central box lists various metabolites: Glucose-6-P, Fructose-6-P, Pentose-5-P, Glyceraldehyde-3-P, Triose-P, 3-P-Glycerate, Phosphoenolpyruvate, Pyruvate, Acetyl-CoA, α -Ketoglutarate, Succinyl-CoA, and Oxaloacetate.
 - These metabolites are converted to **Building Blocks** via **Biosynthesis**, which is coupled with SO_4^{2-} input and H_2S output.
- Building Blocks:**
 - Fatty acids ~8**
 - Sugars ~25**
 - Amino acids ~20**
 - Nucleotides ~8**
- Macromolecules:**
 - Lipid** (from Fatty acids)
 - Lipopolysaccharide** (from Sugars and Lipid)
 - Glycogen** (from Sugars)
 - Peptidoglycan** (from Sugars and Amino acids)
 - Protein** (from Amino acids)
 - RNA** (from Nucleotides)
 - DNA** (from Nucleotides)
- Assembly and Function:**
 - Assembly reactions** lead to **Inclusions**, **Envelope**, **Flagella**, **Pili**, **Cytosol**, and **Polyribosomes**.
 - Nucleoid** is associated with DNA.

Atmosphère de croissance

Les bactéries aérobies strictes (*M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*) ont besoin d'oxygène pour leur croissance et ne sont pas capables de fermenter les sucres. Elles présentent généralement des enzymes

Les bactéries anaérobies strictes sont sensibles à l'oxygène, sont tuées par l'oxygène et utilisent la fermentation pour leur production d'ATP. Des exemples d'anaérobies stricts sont les *Clostridium* et *Bacteroides fragilis*, notamment.

Les bactéries aérotolérantes, telles que les streptocoques, poussent mieux en l'absence d'oxygène mais sont parfaitement capables de pousser en présence d'oxygène. Ces bactéries, moins exposées à l'oxygène, ne possèdent pas de catalase mais une superoxyde dismutase. Enfin, *Campylobacter* est une bactérie microaérophile dont la croissance est optimale en présence d'une faible concentration d'oxygène (Tableau 1).

Type de bactéries	Croissance		Catalase/ superoxyde dismutase	Comportement	Exemples
	Aérobe	Anaérobe			
Aérobies (strict)	+	-	+/+	O ₂ nécessaire Ø fermentation	<i>M.tuberculosis</i> <i>P.aeruginosa</i>
Anaérobies (strict)	-	+	-/-	tués par O ₂ fermentation	<i>Clostridium</i> <i>Bacteroides</i>
"Facultatives"	+	+	+/+	respiration (O ₂) fermentation (sans O ₂)	<i>E.coli</i> <i>S.aureus</i>
Aérotolérantes	+	+	-/+	fermentation (avec ou sans O ₂)	<i>S.pneumoniae</i> <i>S.pyogenes</i>
Microaérophiles	(+)	+	(+/+)	croissance optimale si conc. O ₂ basse	<i>Campylobacter</i>

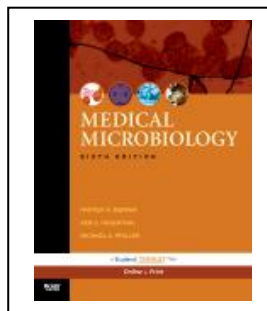
En conclusion, les bactéries ont une structure et un métabolisme très différents de celui des eucaryotes, ce qui permet, d'une part, d'avoir des cibles thérapeutiques spécifiques et, d'autre part, témoigne d'une longue histoire évolutive ayant permis aux bactéries de coloniser des niches écologiques très variées, et de pousser en présence -ou en absence- d'oxygène. La capacité des procaryotes à utiliser divers précurseurs métaboliques grâce à des voies

de biosynthèse très directes, leur permet également une croissance particulièrement rapide.

La connaissance de la structure des bactéries est le pré-requis à une bonne compréhension des facteurs de virulence (capsule / endotoxines, p. ex.) des bactéries et à une bonne connaissance de la classification des procaryotes.

Lecture recommandée:

Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, 2009. ISBN 9780, 323054706.
Chapters 2 and 3.



B2.2 Sang, immunité, infection

Classification et taxonomie bactériennes

Gilbert GREUB

« Dis-moi qui tu es et je te dirai comment tu t'appelles »
(Inconnu)

Objectifs d'apprentissage

- Comprendre les principes et l'utilité de la taxonomie phénotypique et moléculaire ;
- Connaître les divers niveaux hiérarchiques de la taxonomie microbienne ;
- Connaître les étapes de la classification pratique des bactéries utilisée en microbiologie médicale.

Définitions

Classer permet d'attribuer une identité à un individu. Ainsi, la classification bactérienne permet d'identifier une bactérie donnée.

La **taxonomie** est l'ensemble des règles permettant de classer des individus en groupes (taxons) à différents niveaux hiérarchiques (ordre, famille, genre, espèce). Le mot « taxonomie » dérive du grec « *taxis* » = classement, et « *nomos* » = loi. Ainsi, littéralement, la taxonomie est l'utilisation de règles ou de lois permettant de classer une bactérie donnée.

La **nomenclature** est un ensemble de termes permettant de donner un nom sans ambiguïté dans un domaine donné. Le choix du nom d'un genre bactérien, ou d'une espèce, peut se faire sur la base de différents critères, par exemple en l'honneur d'une personne célèbre (*Pasteurella*, pour Louis Pasteur, *Yersinia pestis* pour Alexandre Yersin). Les noms reflètent aussi parfois l'endroit, ou la région, où une bactérie a été trouvée (*Estrella lausanaensis* a été cultivée à Lausanne). Enfin, les noms peuvent refléter des caractéristiques structurales des bactéries ; ainsi, dans l'exemple précédent, *Estrella* est une bactérie dont la forme est celle d'une étoile (Lienard et al. 2011). Le nom de genre *Stella* (étoile en latin) ayant déjà été attribué à un autre genre, c'est le nom hispanique qui a été latinisé et utilisé pour décrire cette bactérie.

Utilité de la classification bactérienne

Il est très utile de pouvoir classer les bactéries puisqu'à une espèce donnée, ou à un genre donné, s'associent des caractéristiques écologiques, épidémiologiques et thérapeutiques particulières. Ainsi, toutes les bactéries du genre *Clostridium* sont des anaérobies stricts et ces bactéries se retrouvent généralement dans le tractus digestif des mammifères. Un autre exemple de caractéristique écologique est la localisation sur l'épiderme des *Staphylococcus epidermidis*.

En guise d'exemple de caractéristique épidémiologique, on peut mentionner que la seule évocation du nom de certaines espèces bactériennes tel que l'agent de la coqueluche (*Bordetella pertussis*), est associé à un risque de transmission interhumaine significative puisque la contagiosité de cet agent est bien connue. Une épidémie de coqueluche a d'ailleurs été documentée dans le canton de Neuchâtel durant l'été 2012.

Enfin, la sensibilité à différents agents thérapeutiques est clairement différente d'une espèce à l'autre ; par exemple, la vancomycine est un traitement efficace sur les bactéries Gram positif, les streptocoques sont généralement sensibles aux dérivés pénicilline.

Il est particulièrement utile de pouvoir classer et identifier les 30 millions d'espèces bactériennes présentes sur Terre pour mieux connaître l'origine de la vie et mieux comprendre l'évolution des espèces. Parmi ces 30 millions d'espèces, seulement environ 3 millions (10%) sont connues.

Une des raisons les plus importantes de classer les bactéries en microbiologie médicale est de mieux préciser quelles sont les maladies associées à une espèce bactérienne donnée. En effet, la virulence d'une bactérie est parfois l'attribut d'un genre donné, voire d'une espèce au sein d'un genre (le staphylocoque doré est plus virulent que le staphylocoque *epidermidis*).

De même, il est utile de classer les bactéries parfois au niveau de sous-espèce ou de type, puisque la pathogénicité de diverses souches d'une même espèce peut parfois être extrêmement différente. Ainsi, à titre d'exemple on peut mentionner *Escherichia coli*, qui est une bactérie non pathogène commensale largement présente au sein de notre tube digestif et qui parfois peut se montrer pathogène par des manifestations toxinogènes (ETEC), entéro-invasives (EIEC), ou entéro-hémorragiques (EHEC).

La classification bactérienne

La classification des bactéries en microbiologie tient non seulement compte de caractéristiques phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques, mais également de la pathogénicité. La taxonomie

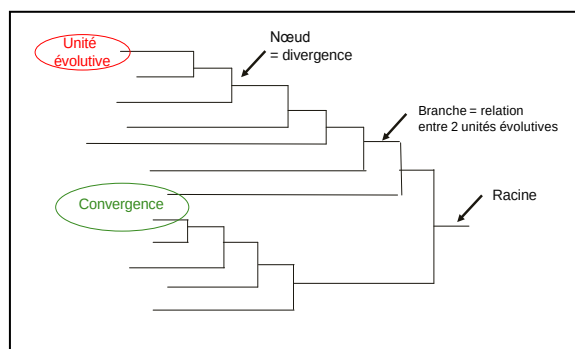
phénotypique se base sur la morphologie (aspect macroscopique des colonies et aspect microscopique des bactéries); la classification phénotypique se base également sur des caractéristiques biochimiques et métaboliques (fermentation des sucres, dégradation de l'urée, catalase, oxydase, ...) (Figure 1).

Figure 1. Galerie biochimique obtenue à partir de 2 bactéries. La fermentation des sucres donne une couleur bleue. La décarboxylation de l'ornithine ou de la lysine donne une couleur rouge (les réactions négatives restent oranges dans ces exemples).



La taxonomie ne peut cependant se baser uniquement sur le phénotype des bactéries, mais doit combiner également une analyse du génotype. On peut analyser les séquences des gènes (génétique), leur nombre et leur organisation (génomique), leur signature nucléotidique (géométrie), ou l'histoire évolutive d'un gène donné (phylogénétique). Les analyses génétique et phylogénétique sont le plus souvent utilisées. L'analyse génétique se base sur le pourcentage de divergence de la séquence d'un gène donné entre différentes espèces, permettant de créer une matrice de distance. Cette matrice de distance peut ensuite être utilisée dans une analyse de méthode phylogénétique (évolution minimale, parcimonie, neighbour-joining) afin de déterminer un arbre phylogénétique. Les arbres phylogénétiques supposent une racine commune aux unités évolutives (espèce bactérienne, par exemple) présentes en bout d'embranchement. A chaque nœud sur l'arbre correspond une divergence entre deux espèces bactériennes données. Une branche commune entre deux espèces (2 unités évolutives) suggère une origine commune à ces espèces (Figure 2).

Figure 2. Arbre phylogénétique



Parfois, l'analyse phylogénétique d'un gène donné n'est pas congruente avec d'autres gènes. En effet, en raison d'une écologie similaire, par exemple, certaines espèces d'origine évolutive très différente peuvent se retrouver à avoir des gènes présentant une séquence similaire par mécanisme de convergence. De plus, certains gènes non-essentiels peuvent être échangés entre des espèces différentes. Ces transferts horizontaux peuvent "fausser" les phylogénies. Il est donc particulièrement important, lors d'analyses phylogénétiques, d'utiliser des gènes très conservés codant pour des fonctions essentielles pour les bactéries, tels l'ARN ribosomique, la DNA polymérase, ou la citrate synthase, par exemple.

Il est également possible de construire un arbre phylétique à partir, non pas de caractéristiques génétiques, mais à partir d'une matrice de distance basée sur la proportion de traits phénotypiques communs entre différentes espèces. Ce type d'arbre phylétique est appelé dendrogramme.

De manière générale, on considère une espèce comme l'ensemble des souches ayant une certaine quantité de gènes et de caractéristiques phénotypiques communes. Les microbiologistes ont défini l'espèce bactérienne comme des souches ayant une homologie de séquence significative sur l'ensemble du génome, avec un taux d'hybridation ADN/ADN élevé (70%).

Nomenclature

La nomenclature, l'ensemble des noms scientifiques attribués aux unités taxonomiques, est un code international accepté par le Comité international de taxonomie des procaryotes. On distingue différents niveaux taxonomiques : royaume, division, classe, ordre, famille, genre, espèce (cf. Table 1).

Table 1. Comparaison de la nomenclature des animaux (*Homo sapiens*) et des procaryotes (*Escherichia coli*).

Royaume	<u>Animalia</u>	<u>Procaryotes</u>
Division	<u>Chordata</u>	<u>Protéobactéries</u>
Classe	<u>Mammalia</u>	<u>Gamma-</u>
Ordre	<u>Primates</u>	<u>Entérobactériales</u>
Famille	<u>Hominidae</u>	<u>Enterobactéries</u>
Genre	<u>Homo</u>	<u>Escherichia</u>
Espèces	<u>Homo sapiens erectus</u>	<u>Escherichia coli</u>

Le pourcentage d'homologie de séquences de la sous-unité 16S ou 23S du ribosome permet grossièrement de savoir si une souche donnée est similaire à une espèce, à un genre, à une famille ou à un ordre déjà connus. Ainsi, une souche qui a moins de 97% de similarités avec toutes les espèces connues représente une nouvelle espèce. De la même manière, une souche qui a moins de 95% de

similarités avec un genre connu représente vraisemblablement un nouveau genre. Enfin, pour confirmer la filiation au sein d'une famille ou d'un ordre, une bactérie devrait présenter généralement plus de 90 et 80% respectivement de similarités de la séquence de son gène codant pour le 16S *rRNA*, ou le 23S *rRNA*. Ces seuils (cut-offs) peuvent varier d'un ordre ou d'une classe bactérienne à l'autre. Bien entendu, il serait erroné de classer une souche bactérienne uniquement sur la base d'un seul gène, et une taxonomie polyphasique comprenant des critères génétiques, phénotypiques et phylogénétiques est indispensable. De plus, un minimum de 5 gènes est requis pour décrire une nouvelle espèce.

Classification pratique en bactériologie médicale

Les microbiologistes cliniques n'utilisent généralement pas les arbres phylogénétiques pour classer les espèces bactériennes. Ils utilisent au contraire, de manière séquentielle, des critères microscopiques, macroscopiques, des caractères de croissance et des caractères métaboliques pour classer une souche poussant sur une gélose donnée.

Les critères macroscopiques en culture sont principalement l'aspect des colonies (taille, morphologie, couleur, pigmentation, consistance, adhérence à la gélose, activité hémolytique). On peut également utiliser l'odeur dégagée par les colonies bactériennes pour affiner la classification de certaines espèces bactériennes. Ainsi par exemple, le streptocoque *milleri* a une odeur typique de beurre.

Les critères microscopiques incluent la forme (coque, bacille) et les arrangements (en grappe, en chaînette) des bactéries, ainsi que leur couleur lors de la coloration de Gram ou de Ziehl, par exemple. Ainsi, le staphylocoque se présente typiquement sous la forme de coques Gram positif, en grappe, alors que les streptocoques sont des coques Gram positif souvent arrangées en chaînettes (sauf le pneumocoque *S. pneumoniae*, qui s'arrange par deux : diplocoques). De même, *Escherichia coli* est un bacille Gram négatif plutôt trapu et régulier, alors que le *Fusobacterium* est un bacille Gram négatif fin, pointu aux extrémités.

Les caractéristiques de croissance, tels que température (30, 37 ou 42°C) et atmosphère (aérobie stricte, aérotolérants, anaérobies, ...), ainsi que les compétences métaboliques, sont très utiles à identifier une souche bactérienne au niveau de l'espèce.

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse permet de réduire l'utilisation de galeries biochimiques étudiant les compétences métaboliques d'un germe. Cette technologie sera discutée dans le cours sur les approches diagnostiques.

Table 2. Table des bactéries.

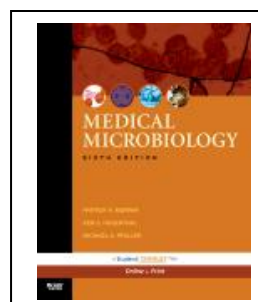
Characteristics	Genus
1. Rigid, thick-walled cells Free-living (extracellular bacteria) 1. Gram-positive a. Cocci <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> b. Spore-forming rods (1) Aerobic (2) Anaerobic <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> c. Non-spore-forming rods (1) Nonfilamentous <i>Corynebacterium</i> <i>Listeria</i> <i>Actinomyces</i> <i>Nocardia</i> (2) Filamentous 2. Gram-negative a. Cocci b. Rods (1) Facultative (a) Straight (i) Respiratory organisms (ii) Zoonotic organisms (iii) Enteric and related organisms <i>Haemophilus</i> <i>Bordetella</i> <i>Legionella</i> <i>Brucella</i> <i>Francisella</i> <i>Pasteurella</i> <i>Yersinia</i> <i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Proteus</i> <i>Campylobacter</i> <i>Vibrio</i> (2) Aerobic (3) Anaerobic <i>Pseudomonas</i> <i>Bacteroides</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Rickettsia</i> (b) Curved <i>Chlamydia</i> 3. Acid-fast Non-free-living (obligate intracellular parasites) <i>Treponema</i> <i>Borrelia</i> <i>Leptospira</i> <i>Mycoplasma</i>	
2. Flexible, thin-walled cells (spirochetes)	
3. Wall-less cells	

Conclusions

La taxonomie est extrêmement utile en microbiologie clinique, puisqu'elle permet de préciser l'écologie des bactéries, leur mode de transmission, définir d'éventuelles maladies associées, donner une notion de virulence, et préciser leur sensibilité aux antibiotiques.

Lecture recommandée:

Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, Mosby-Elsevier 2009. Chapter number 2.



B2.2 Sang, immunité, infection

Méthodes diagnostiques en microbiologie

Gilbert GREUB

« Traquer les microbes, une affaire de culture »

Objectifs d'apprentissage

- Connaître les principales méthodes diagnostiques en microbiologie, leur indication et leurs limites.

Introduction

Le but de la microbiologie diagnostique est de fournir des informations précises sur la présence, dans un échantillon clinique, de microorganismes ou de leur produit (ADN ou antigènes). Il est également important de pouvoir fournir les informations sur l'absence de microorganismes (stérilité de l'échantillon). Enfin, il est utile de fournir des informations sur la sensibilité aux antibiotiques des microorganismes qui ont été identifiés et isolés en culture.

Différentes méthodes sont utilisées en microbiologie diagnostique. La microscopie, tout d'abord, permet de détecter les microorganismes par l'examen direct. Il est également possible de détecter les microorganismes par culture. La sérologie permet de détecter la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre un microorganisme donné, alors que la biologie moléculaire va permettre de détecter la présence d'ADN composant de la bactérie ou du microbe en question. Enfin, des techniques de type sérologique permettent de détecter la présence d'antigènes (protéine de paroi, toxines, etc.) par des réactions de type antigène-anticorps. Ces différentes méthodes auront des sensibilités et une valeur différentes au cours d'une infection. Ainsi, les anticorps se révèlent être positifs plus tardivement, et permettent souvent un diagnostic seulement rétrospectif, alors que la culture ne sera positive qu'en phase initiale, avant traitement antibiotique. La PCR peut rester positive alors même qu'il n'y a plus de bactéries viables dans l'échantillon suite à un traitement antibiotique efficace.

Pré-analytique

On distingue trois grandes étapes dans le diagnostic microbiologique : la **pré-analytique**, l'**analyse** proprement dite, et la **post-analytique** (interprétation du résultat).

Par pré-analytique, on considère trois principales étapes : l'indication à un test, la collection de l'échantillon et son transport ou sa conservation en cas de délai de transport jusqu'au laboratoire. L'indication à un examen est clairement une responsabilité médicale. Si l'on fait un examen non justifié, on peut se retrouver avec un résultat très difficile d'interprétation, parfois gênant. La prise en charge est thérapeutique.

La collection de l'échantillon est importante. Il faut d'abord choisir un spécimen représentatif du processus infectieux, qui soit de bonne qualité, en quantité suffisante et idéalement prélevé avant administration d'antibiotiques. Ce spécimen peut provenir d'un site normalement stérile, tel que le sang, la moelle osseuse, le liquide céphalorachidien, ou des liquides de cavités normalement stériles (liquide articulaire, liquide pleural, liquide péricardique). Les prélèvements avec une flore contaminante sont notamment les prélèvements provenant de la cavité orale, du tractus respiratoire supérieur, de la peau, du tractus intestinal, du vagin, ou de l'urètre.

Même si le tractus respiratoire inférieur est normalement stérile, il peut parfois être contaminé par de la flore provenant de l'oropharynx. De même, le contenu vésical (urine) est généralement stérile mais peut se contaminer lors du prélèvement d'urine au niveau de son passage au niveau de l'urètre distal.

Partie analytique

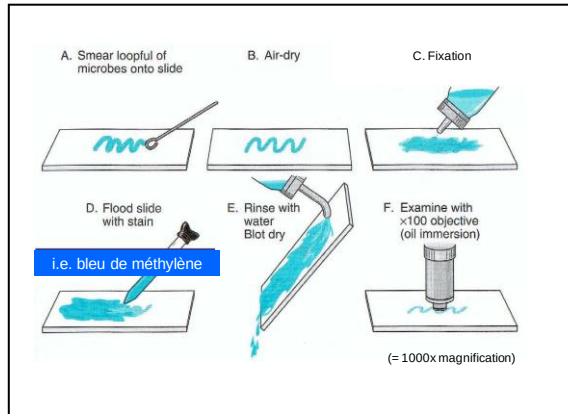
Sur un plan strictement analytique, on considère 4 approches complémentaires : examen direct, culture, sérologie et biologie moléculaire qui sont détaillés ci-dessous et partiellement traité également dans le chapitre sur les approches diagnostiques de la pneumonie.

Examen direct

L'examen direct est une approche rapide mais donnant généralement qu'une indication préliminaire. On distingue l'examen direct natif (par ex parasites), l'examen sur fond noir (spirochètes) et après diverses colorations (bleu de méthylène, Gram, Ziehl, ...). Le Gram est la coloration préférée en bactériologie. L'examen direct permet de préciser la forme des bactéries et leur arrangement (cf cours classification bactérienne), et lors de coloration de Gram, de préciser le type de paroi (cf cours sur la structure), permettant une classification présomptive. Une

étape d'étalement et de fixation précède généralement la coloration (Figure 1)

Figure 1. Etapes principales de la coloration d'un frottis pour examen direct : exemple de coloration au bleu de méthylène.



Culture

La culture consiste à l'inoculation de diverses géloses et à leur incubation pour 24 à 48h. Les bactéries cultivées peuvent être ensuite identifiées par des galeries biochimiques ou par masse spectrométrie.

La spectrométrie de masse permet l'identification en < 5 min. d'environ 95% des colonies isolées en clinique. Véritable révolution, cette technique est basée sur la comparaison du spectre de protéines de bas poids moléculaire (< 20'000 Da), pour la plupart des protéines ribosomales qui sont informatives sur un plan taxonomique, vu leur conservation.

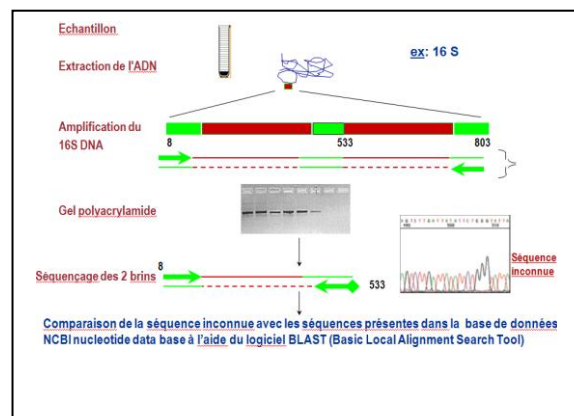
PCR et autres techniques d'amplification moléculaire

Les techniques de PCR sont de plus en plus utilisées en microbiologie pour le diagnostic étiologique des infections. Pratiquement, la PCR consiste à détecter des acides nucléiques ADN ou ARN, en trois étapes : l'extraction des acides nucléiques, l'amplification de la cible, et la détection des produits amplifiés.

L'extraction et la purification de l'ADN (ou ARN) se fait, par exemple, par une lyse des cellules, enzymatique (protéinase K) ou mécanique, précipitation de l'ADN par de l'éthanol, fixation de cet ADN sur un support, par exemple sur des billes ou une membrane de silice, lavage avec un tampon contenant de l'alcool pour que l'ADN reste attaché lors du lavage, puis élution, c'est-à-dire récupération de l'ADN après nettoyage à l'aide d'un tampon qui ne contient plus d'alcool mais principalement de l'eau.

L'étape d'amplification est la plus importante. Elle peut amplifier un gène spécifique d'un microorganisme donné, ou un gène commun à différents microorganismes et, dans ce cas-là, devra être suivi d'une étape de séquençage pour préciser le germe en cause. Pour cibler un seul germe il faut utiliser des amorces (primers) spécifiques. Ces primers seront spécifiques aux séquences présentes uniquement dans le microorganisme recherché. L'inconvénient de ce genre de PCR à spectre réduit est qu'il faut avoir une suspicion clinique du germe potentiellement en cause dans la maladie. Dans les situations où différents germes veulent être recherchés, on utilisera une PCR dite eubactérienne, qui amplifie un gène commun à différentes bactéries, par exemple le gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome (Figure 2). Après amplification, il est nécessaire de détecter le germe en cause. Ceci peut se faire de différentes manières, par exemple en "temps réel", grâce à l'utilisation d'intercalants de base fluorescents (SYBR Green) ou de sondes fluorescentes spécifiques de l'ADN cible amplifié (sonde Taqman, p. ex.). On peut également détecter l'ADN par migration sur gel et marquage, par exemple avec du bromure d'éthidium.

Figure 2.



Les PCR à large spectre, qui permettent la détection d'une large diversité de possibles pathogènes, ne peut cependant être effectuée que sur un prélèvement physiologiquement stérile et est généralement moins sensible que les PCR spécifiques en temps réel à spectre étroit. De plus, il y a un risque accru de faux positif, lié à la contamination occasionnelle des réactifs commerciaux avec des bactéries présentes dans l'eau (*Aeromonas*, *Sphingomonas*, p. ex.).

Il est essentiel que les résultats de PCR soient interprétés et que les médecins praticiens connaissent les limites de ces techniques. Une PCR doit être effectuée sur le prélèvement adapté à la situation. Ainsi, par exemple, si l'on souhaite détecter *Chlamydia trachomatis*, l'agent le plus fréquent d'infection bactérienne sexuellement

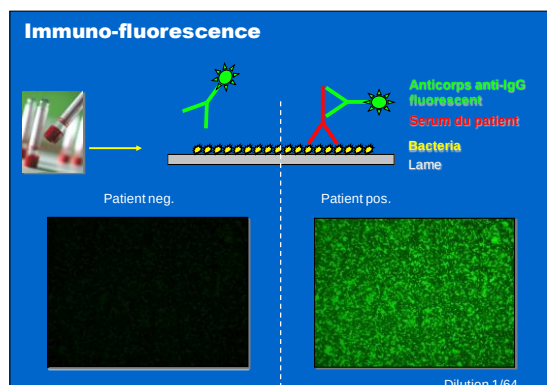
transmise, on peut utiliser les urines. Cependant, en raison de la nature intracellulaire des *Chlamydia*, il faut utiliser les urines de 1^{er} jet afin d'avoir le plus grand nombre de cellules épithéliales dans les urines, puisque la bactérie aura tendance à être à l'intérieur de ces cellules.

La PCR est particulièrement indiquée pour les microorganismes à croissance lente ou bactéries difficiles à cultiver, dont les bactéries intracellulaires. Elle est également utile lorsque les microorganismes ne sont vraisemblablement plus viables suite à un traitement antibiotique préalable et enfin, lorsque les approches diagnostiques n'ont pu apporter une réponse. La biologie moléculaire est également la méthode de premier choix en virologie, et, grâce à l'automatisation et à la numérisation de cet outil, risque de s'implémenter de manière plus large à l'avenir comme test de PCR au lit du malade.

Sérologie

La sérologie permet un diagnostic indirect sur du sérum par la détection des anticorps, par ex par immunofluorescence (Figure 3).

Figure 3.



En résumé, lors d'immunofluorescence, une lame sur laquelle l'antigène microbien est présent (p.ex. bactéries totales ou protéine recombinante) est incubée avec le sérum du patient. Après lavage, seuls d'éventuels anticorps réagissant avec l'antigène microbien resteront fixés. Ces anticorps seront détectés par un 2^{ème} anticorps anti-Ig humaines, couplé à un marqueur fluorescent qui pourra être détecté par microscopie à fluorescence (Figure 3). De nombreuses autres techniques sérologiques existent, dont l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Tests de sensibilité aux antibiotiques

La disponibilité d'une culture pure est la première étape essentielle à l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques d'une souche bactérienne donnée. La sensibilité aux antibiotiques se mesure souvent en

laboratoire par l'utilisation de disques (disk diffusion). On dépose un disque contenant une quantité donnée d'antibiotiques, par exemple 10 mg, sur une gélose sur laquelle a été préalablement ensemencé en tapis complet et dense le germe à tester. Après 24 h. d'incubation, il est possible de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, où la croissance de la bactérie n'a pas eu lieu en raison de la présence de l'antibiotique. Ce diamètre d'inhibition peut être ensuite interprété grâce à l'aide de tables en fonction de l'antibiotique et du germe en cause, pour définir si la bactérie est sensible à l'antibiotique, résistante, ou de sensibilité intermédiaire. On peut également évaluer la sensibilité aux antibiotiques grâce à des doses décroissantes d'antibiotiques. Cette approche permet de déterminer avec précision la plus petite concentration inhibant la croissance, appelée concentration minimale inhibitrice. Initialement, cette mesure se faisait par dilution sérielle d'antibiotiques, de deux en deux, dans des tubes. Actuellement, grâce à la technologie récente, il est possible d'utiliser des bandelettes comportant des concentrations décroissantes d'antibiotiques, bandelettes appelées E-test.

L'interprétation d'un résultat de sensibilité aux antibiotiques doit être toujours faite en relation avec la sensibilité connue dans la région ou dans l'hôpital où l'on travaille. Chaque année, des tables de sensibilité aux antibiotiques sont publiées, décrivant les proportions de résistance des différents germes dans le collectif testé au cours de l'année.

Aspects post-analytiques

Au-delà du laboratoire, il est essentiel que les résultats de microbiologie soient interprétés correctement. L'interprétation des résultats dépend de la question posée par le clinicien, de la probabilité pré-test d'une infection, de la qualité et de la pertinence du prélèvement, des performances des tests utilisés en termes de sensibilité et spécificité, de la présence d'antibiotiques dans le prélèvement, et du status immunitaire du patient.

A titre d'exemple, si la question posée par le clinicien est "Est-ce que l'angine que présente mon patient est due au streptocoque du groupe A ?", le laboratoire pourra effectuer l'analyse sur la base d'un frottis de gorge, et rechercher uniquement ce germe. Par contre, si le clinicien demande "Quel est l'agent qui cause l'angine chez mon patient ?", le laboratoire ne pourra répondre, car dans le frottis de gorge, de nombreuses bactéries peuvent être présentes au vu de l'importante colonisation de l'oropharynx. Le streptocoque du groupe A étant le principal agent bactérien d'angine, au laboratoire on va rechercher une hémolyse bêta (lyse totale du sang présent dans la gélose) 24 h. après l'ensemencement de gélose au sang. En cas de

colonie générant une bêta-hémolyse, un typage sera fait par un test d'agglutination au latex. Le résultat pour le médecin sera ou "Absence de streptocoques du groupe A", ou "Présence de streptocoques du groupe A", et l'interprétation dépendra bien entendu de la sensibilité de cette approche. Dans cet exemple, il est également possible de rechercher le streptocoque du groupe A par un test rapide. Cependant, en cas de négativité du test et d'angine avérée, le médecin pourrait envisager de donner un traitement antibiotique et d'effectuer une culture, puisque des faux négatifs du test rapide ont été documentés.

De même manière, pour confirmer le diagnostic d'une possible infection urinaire chez une patiente, on peut prélever de l'urine. On peut également rechercher la présence de nitrites et d'estérase leucocytaire à l'aide d'une bandelette (chimie sèche). On peut également faire un examen du sédiment pour voir s'il y a leucocytes, et effectuer une culture d'urine. Le résultat devra interpréter de manière quantitative, et la présence de plusieurs germes ou d'un nombre de germes inférieur à 10^3 par ml suggère plutôt une contamination. Un autre exemple de l'importance de l'interprétation des résultats microbiologique concerne les hémocultures : si leur résultat est négatif, ceci peut témoigner soit d'une infection non bactériémique, soit d'une infection à un germe ne poussant pas dans les bouillons de culture utilisés, par exemple, bactérie intracellulaire, *Bartonella* ou *Coxiella*

Conclusions

En conclusion, les méthodes utilisées en microbiologie diagnostique sont nombreuses, et comprennent : examen direct, culture, sérologie et biologie moléculaire.

Le diagnostic microbiologique comprend une partie analytique effectuée au laboratoire, mais également des parties pré-analytiques (indication, sampling et acheminement de l'échantillon) et post-analytique (interprétation du résultat), qui sont essentielles et nécessitent une bonne interaction entre médecin en charge du patient et microbiologiste(s).

Lecture recommandée:

Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, Mosby-Elsevier 2009.



B2.2 Sang, immunité, infection

Diagnostic microbiologique de la pneumonie

Gilbert GREUB

« Le vrai défi pour le clinicien n'est pas de poser le diagnostic de pneumonie, mais bien d'en identifier la cause »
(Inconnu)

Objectifs d'apprentissage

- Réaliser l'importance du diagnostic étiologique de la pneumonie;
- Connaître les principaux agents de la pneumonie;
- Être conscient de l'importance de la qualité de l'échantillon;
- Comprendre les principales approches diagnostiques utilisées en microbiologie pour le diagnostic étiologique de la pneumonie;
- Appréhender les avantages et les limites des différentes approches diagnostiques.

Introduction : la pneumonie

La pneumonie est une infection des voies aériennes inférieures se manifestant, par exemple, par (i) des signes d'inflammation locale telles que la toux, des expectorations productives, (ii) des signes d'inflammation générale tels que fièvre, leucocytose, et (iii) caractérisée par la présence d'un infiltrat sur une plage pulmonaire visible à la radiographie thoracique. La présence de cet infiltrat permet de différencier la pneumonie de la bronchite.

La pneumonie est une maladie fréquente associée à une mortalité significative, et possède souvent un certain potentiel épidémique. On distingue les pneumonies atypiques, caractérisées par une inflammation interstitielle épargnant les alvéoles, et les pneumonies lobaires, caractérisées par un comblement des alvéoles (hépatisation du poumon).

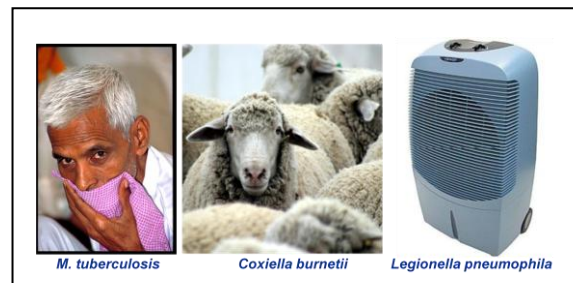
Pourquoi identifier l'agent d'une pneumonie ?

Identifier l'agent étiologique d'une pneumonie permet de choisir le traitement antibiotique

correspondant. Ceci permet une antibiothérapie ciblée, qui aura moins d'effets secondaires qu'une association d'antibiotiques et sera associée à une moindre pression de sélection (moins de développement de résistance bactérienne aux antibiotiques).

Identifier l'agent étiologique d'une pneumonie permet également de déduire le mode de transmission de cet agent et de guider les mesures de santé publique lors d'une épidémie. Ainsi, si l'on identifie par exemple *Mycoplasma pneumoniae* par PCR au niveau d'un prélèvement respiratoire, on saura que la transmission est inter-personnelle. Par contre, si *Coxiella burnetii* est identifiée, la source de l'épidémie est plus probablement liée à l'excrétion de la bactérie par des moutons ou des chèvres. Enfin, si *Legionella pneumophila* est identifiée, les systèmes de climatisation ou l'eau d'humidificateurs contaminés par cette bactérie sont vraisemblablement la source de l'infection (Figure 1).

Figure 1. L'identification d'un germe donne une indication sur son mode de transmission. Ainsi, la transmission de *M. tuberculosis*, l'agent de la tuberculose, est interhumaine et la réduction de la transmission passe par le port de masque, l'isolement des patients et/ou l'éducation des patients à réduire la production des aérosols tant que la maladie est bacillaire (panel de gauche), alors que *Coxiella burnetii* est une zoonose qui peut causer des épidémies dont la source peut être les moutons comme ce fut le cas au printemps 2012 dans le Lavaux (panel du milieu). Enfin, lors d'épidémies due à des légionelles, la source peut être un humidificateur (panel de droite).



Quels sont les agents de pneumonie ?

On distingue deux types principaux de pneumonie : la pneumonie communautaire (acquise hors de l'hôpital) et la pneumonie nosocomiale (acquise à l'hôpital).

Les agents les plus fréquents de pneumonie communautaire sont le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) et l'*Haemophilus influenzae*. *Mycoplasma pneumoniae* est également un agent fréquent de pneumonie, survenant souvent par vagues épidémiques en automne, principalement chez les enfants d'âge scolaire et les adultes exposés (parents, enseignants, ...). Contrairement au pneumocoque qui cause généralement une pneumonie lobaire, *Mycoplasma pneumoniae* est un agent de pneumonie atypique.

Les agents les plus fréquents de pneumonie nosocomiale sont le *Pseudomonas aeruginosa* et diverses entérobactéries (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* et *Citrobacter freundii*, par exemple). D'autres bactéries non fermentatives peuvent, comme *Pseudomonas*, causer des pneumonies nosocomiales, dont notamment *Stenotrophomonas maltophilia*. Plusieurs espèces bactériennes peuvent causer des pneumonies communautaires et des pneumonies nosocomiales. Il s'agit notamment du *Staphylococcus aureus*, de *Klebsiella pneumoniae* et de *Legionella pneumophila*. Enfin, des bactéries strictement intracellulaires (*Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*) et divers virus peuvent également causer des pneumonies communautaires dans des situations particulières.

Comment identifier l'agent d'une pneumonie ?

Prélèvements

Afin d'identifier l'agent étiologique d'une pneumonie, divers échantillons peuvent être utiles. L'expectoration (sputum) est un prélèvement partiellement représentatif du tractus respiratoire inférieur. Ce prélèvement est obtenu de manière indirecte et transite au niveau de l'oropharynx. Lors du passage dans la cavité buccale, le prélèvement peut être souillé (contaminé) par de la flore oropharyngée. Il est donc indispensable que ce type de prélèvement soit examiné par une coloration de Gram afin de juger de sa qualité avant ensemencement (Figure 2). La qualité de l'expectoration sera considérée comme bonne s'il y a présence de beaucoup de leucocytes et peu de cellules épithéliales. Par contre, la qualité sera considérée comme mauvaise s'il y a plus de 25 cellules épithéliales par champ et, dans ce cas, l'expectoration n'est pas mise en culture. La présence d'une flore polymicrobienne est également un signe d'une mauvaise qualité d'expectoration. La qualité de l'expectoration peut être améliorée, par exemple en provoquant des expectorations induites par physiothérapie ou en expliquant l'importance au patient.

Lorsque les prélèvements d'expectoration ne sont pas disponibles, par exemple lors de toux sèche non productive, il est possible d'obtenir des prélèvements par bronchoscopie. On distingue alors 3 types de prélèvements : l'aspiration bronchique, le lavage broncho-alvéolaire et la biopsie transbronchique. L'aspiration bronchique est plus souvent contaminée par de la flore oropharyngée que le lavage broncho-alvéolaire, et la signification clinique d'un germe obtenu dans une aspiration bronchique en faible quantité sera moindre que si ce même germe est obtenu dans un lavage broncho-alvéolaire. La présence de bactéries dans le lavage

broncho-alvéolaire en quantité supérieure à 10^4 bactéries par ml suggère que cette bactérie est en situation pathogène. La présence dans une biopsie permet de confirmer sa signification clinique. De plus, sur de tels prélèvements normalement stériles, il est possible d'effectuer non seulement des examens par culture, mais également des examens par des PCR non ciblées, appelées eubactériennes et qui amplifient n'importe quel ADN bactérien présent dans l'échantillon.

Le diagnostic de pneumonie peut parfois également se faire de manière indirecte, par la présence dans le sang (sérum) d'anticorps dirigés contre une bactérie donnée. De même, il est possible pour certains pathogènes de retrouver les antigènes bactériens au niveau des urines. Enfin, la présence d'une bactériémie dans le contexte d'une pneumonie cliniquement documentée permet parfois de documenter l'agent étiologique par hémoculture.

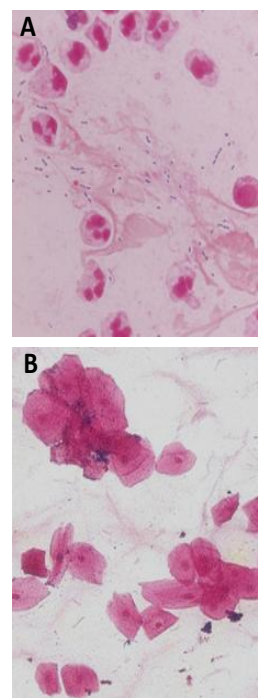
Examen direct

L'examen direct se pratique sur des prélèvements provenant du tractus respiratoire inférieur et permet non seulement d'évaluer la qualité de l'échantillon (cf. ci-dessus), mais également de donner une réponse rapide préliminaire au clinicien. La sensibilité de cet examen est cependant faible, puisqu'on ne détecte qu'environ 1 bactérie par champ microscopique au grossissement de 1000x lorsque 10^5 bactéries par ml d'échantillon sont présentes. De plus, l'examen direct par coloration de Gram ne permet qu'une identification présomptive de l'agent étiologique. Ainsi, par exemple, si l'on retrouve des diplocoques Gram positif avec un halo témoin de la présence d'une capsule, on suspectera qu'il s'agit d'un pneumocoque, mais le diagnostic définitif devra être apporté par d'autres techniques, dont la culture.

Figure 2. Examen direct

A) Expectoration de bonne qualité, avec la présence de nombreux polymorphonucléaires.

B) Expectoration de mauvaise qualité, avec la présence de nombreuses cellules épithéliales.



La culture

En général, pour le diagnostic d'infections respiratoires basses, les microbiologistes vont ensemencer 3 types de géloses afin de cultiver la plupart des agents bactériens de pneumonie (Figure 3). La culture est également un élément indispensable pour l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques.

La gélose au sang de mouton permettra de détecter diverses espèces bactériennes, dont le pneumocoque, qui se caractérise par une alpha hémolyse et une sensibilité à l'optochine. La flore oropharyngée rendant la visualisation et l'isolement des pneumocoques présents dans l'isolement très difficile, on utilise un disque d'optochine mis systématiquement sur la gélose afin d'aisément différencier les *Streptococcus pneumoniae* sensibles à l'optochine des autres streptocoques alpha hémolytiques, largement présents dans la flore oropharyngée et résistants à l'optochine.

Outre la gélose au sang, on ensemence également une gélose au sang cuit (gélose chocolat) contenant un antibiotique, la bacitracine, permettant d'inhiber la croissance des streptocoques et de la plupart des bactéries présentes dans la flore oropharyngée. Cette gélose chocolat bacitracine permet la croissance d'*Haemophilus influenzae* notamment grâce à la présence de cofacteurs indispensables. Cette espèce d'*Haemophilus* peut être différenciée des autres espèces d'*Haemophilus* par un satellitisme (croissance de colonies) autour des facteurs de croissance V et X.

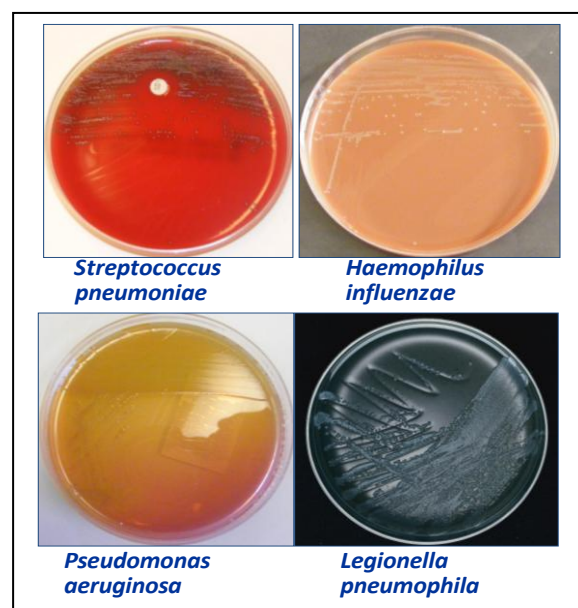
La troisième gélose ensemencée en routine pour des prélèvements respiratoires est la gélose McConkey, une gélose sélective et différentielle qui permet la croissance des bacilles Gram négatif : entérobactéries et germes non fermentatifs.

Enfin, selon la situation clinique et sur demande des médecins cliniciens, il est possible d'ajouter d'autres milieux de culture, dont par exemple la gélose au charbon, contenant de la cystéine et du fer indispensables à la croissance de *Legionella pneumophila*. Des milieux de culture particuliers sont également indispensables pour détecter la présence par culture de l'agent de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Ainsi, même si la culture est une approche non dirigée permettant d'identifier de nombreux germes différents, potentiellement en cause dans la pneumonie d'un patient donné, il est indispensable qu'une bonne communication entre le médecin traitant et le microbiologiste soit assurée afin de faire un ensemencement et des examens complémentaires sur mesure selon le germe suspecté.

Certaines bactéries, dites intracellulaires obligatoires telles *Chlamydia pneumoniae* ou *Coxiella burnetii*, ne poussent qu'en culture

cellulaire. Cette technique complexe est de moins en moins utilisée dans les laboratoires diagnostiques, ayant été largement remplacée par des approches de diagnostic moléculaire et par de la sérologie. Brièvement, rappelons que la culture cellulaire nécessite la production de cellules mammifères immortalisées (lignée continue) qui vont pousser en présence de tampons dans une atmosphère enrichie par 5% de CO₂. Les cellules mammifères adhérentes aux boîtes de culture devront, pour être repiquées, être trypsinisées (détachées de la surface par une enzyme: la trypsine). Lorsque les cellules fraîchement repiquées seront inoculées et incubées, la détection d'un éventuel microorganisme pourra être effectuée soit par des colorations spécifiques (coloration de Gram, coloration de Giemsa, Ziehl-Neelsen) ou par la recherche d'effets cytopathiques. Pour détecter certains germes, la PCR ou l'immunofluorescence sont aussi utilisées.

Figure 3. Culture axénique. a) *Streptococcus pneumoniae*: notez l'alpha-hémolyse (hémolyse incomplète, verdissante) et la sensibilité à l'optochine. b) *Haemophilus influenzae* : croissance sur gélose chocolat-bacitracine. c) *Pseudomonas*: lactose négatif sur gélose McConkey. d) *Legionella pneumophila* : croissance sur gélose au charbon (BCYE).



Biologie moléculaire

Diverses PCR spécifiques de pathogènes respiratoires ont été développées. Ces PCR ont pour but principalement d'identifier des agents bactériens causant des pneumonies atypiques, dont *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Coxiella burnetii*. La PCR est également très utile afin de détecter l'agent de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, en raison de sa croissance lente et de sa nature paucibactérienne. La biologie moléculaire est également largement utilisée pour la détection de divers virus respiratoires qui peuvent causer des pneumonies,

notamment chez des patients immunosupprimés. La recherche de ces virus n'est effectuée généralement que sur demande dûment motivée des cliniciens chez des patients immunosupprimés.

Même si des PCR spécifiques existent pour différents germes pyogènes, dont le *Streptococcus pneumoniae* par exemple, la PCR n'est pas indiquée pour rechercher ce type d'agents dans des prélèvements respiratoires car ces bactéries peuvent se trouver comme de simples colonisants dans les expectorations.

Lorsqu'aucun germe n'a été documenté par les approches de biologie moléculaire et culture classiques, il est possible, sur des prélèvements normalement stériles tels que le liquide pleural ou des biopsies pulmonaires, d'effectuer une PCR eubactérienne ciblant la plupart des bactéries grâce à la conservation de la cible de cette PCR, le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal.

Sérologie

La sérologie est peu utilisée pour le diagnostic de la pneumonie en raison de l'augmentation retardée des anticorps, ne permettant généralement qu'un diagnostic rétrospectif sur le sérum du patient convalescent. De plus, la spécificité de la sérologie est souvent imparfaite en raison de réactions croisées, notamment IgM entre divers agents.

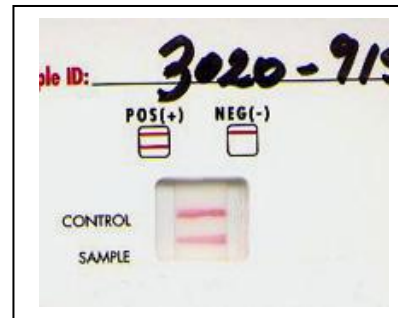
On distingue différents types de tests sérologiques : les ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), les immunofluorescences et les western blot. Tous se basent sur la détection d'anticorps à l'aide d'antigènes spécifiques. Les antigènes peuvent être des protéines ou des fragments de protéines synthétisés in vitro ainsi que l'ensemble des protéines d'un micro organisme. La sérologie sera considérée positive à partir d'un titre donné correspondant à une dilution du sérum du patient. Il est possible aussi de faire des « sérologies » sur d'autres échantillons que le sérum ; par exemple, on peut mesurer la production « intrathécale » d'anticorps en mesurant les anticorps présents au niveau du liquide céphalo-rachidien. Parfois, le test sérologique vise à déterminer la présence d'un antigène (à l'aide d'un anticorps correspondant).

Tests rapides urinaires

Il est possible de rechercher dans les urines la présence d'antigènes de *Streptococcus pneumoniae* et de *Legionella pneumophila* par des tests rapides. Cependant, ces tests immuno-chromatographiques (Fig. 4) n'ont une sensibilité que modeste, de l'ordre de 80%. Ainsi, lors de suspicion de légionellose, il est impératif non seulement de détecter les *Legionella* dans les urines, mais également d'obtenir un prélèvement respiratoire

afin d'effectuer une recherche spécifique par culture sur gélose au charbon et par PCR. De même, une culture d'expectoration et des hémocultures devraient être effectuées en complément à la recherche de pneumocoque dans l'urine. Notons que la sensibilité des tests urinaires est meilleure lors de maladie sévère bactériémique.

Figure 4. Tests immuno-chromatographiques.

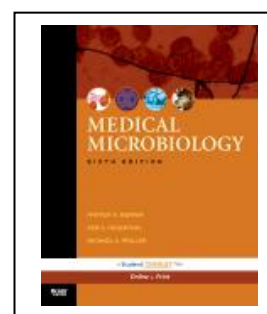


Conclusions

Le diagnostic microbiologique est particulièrement utile au clinicien afin d'adapter l'antibiothérapie au vu de la grande variété d'agents de pneumonie. Les résultats obtenus doivent toujours être confrontés au tableau clinique puisque la présence de certains germes dans les expectorations, dont par exemple, *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*, peuvent n'être que le reflet d'une colonisation par ces espèces bactériennes. La biologie moléculaire peut être utile en complément du Gram et de la culture dans certaines situations et notamment lors de pneumonies atypiques, souvent dues à des bactéries intracellulaires ou germes fastidieux.

Lecture recommandée:

Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, 2008. ISBN 9780, 323054706. Chapter number 7.



B2.2 Sang, immunité, infection

Facteurs de virulence : toxines

Gilbert GREUB

« La vie ne s'est pas développée par des combats, mais par des interactions »
(Margoulis, 1986)

Objectifs d'apprentissage

- Comprendre la notion de facteurs de virulence
- Connaître les définitions de pathogénicité et de virulence, et comment il est possible d'évaluer le pouvoir pathogène et la virulence d'un microorganisme
- Connaître quelques facteurs de virulence impliqués dans le rôle pathogène d'*Escherichia coli*

Introduction

Considérons, à titre d'exemple, un homme qui s'est blessé à une barrière métallique ; il néglige sa blessure et, quelques jours plus tard, on documente l'apparition d'une voussure (tuméfaction) avec rougeurs, douleurs, chaleur, et mobilité réduite de l'articulation en regard de cette collection (Figure 1).

Figure 1. Abscès caractérisé par une voussure et une rougeur importante.



On conclut à une infection pyogène. Le médecin va drainer cet abcès, qui contiendra deux types principaux de cellules : des coques Gram positif et des leucocytes (adapté de JC Pechère. Les Infections. EDISEM 1983). En l'occurrence, il s'agit de staphylocoques dorés, qui ont causé un abcès suite à la rupture de la barrière cutanée.

Staphylocoque doré présente presque toujours une pathogénicité plus élevée que son « cousin » *Staphylococcus epidermidis*, mais tous les deux peuvent coloniser la peau. Staphylocoque doré est un colonisant commun des fosses nasales, mais peut également coloniser d'autres régions. Suite à la brèche cutanée, l'équilibre a été rompu entre ce germe et son hôte. L'infection (abcès) s'est développée en fonction des facteurs de virulence importants que possède le staphylocoque, tels qu'adhésine, coagulase, protéine A, leucocidine, protéase.

Ces facteurs de virulence vont donc conférer une virulence accrue au staphylocoque doré (*S. aureus*) par rapport au staphylocoque *epidermidis*, qui lui, ne possèdera que certains de ces facteurs de virulence. Notamment, la coagulase et la protéine A sont des attributs du staphylocoque doré, qui ne sont pas présents chez les autres staphylocoques. Ainsi, la virulence peut être définie comme la différence entre un microorganisme capable de provoquer une maladie (dans une situation donnée), et un microorganisme non infectieux (ou moins infectieux). La pathogénicité est, d'une certaine manière, le reflet chez l'hôte de la virulence, et la pathogénicité (*pathos* = souffrance, *gennan* = engendrer) se définit comme pouvoir pathogène d'un microbe. La pathogénicité dépend non seulement de la virulence du microbe, mais aussi de l'état de défenses de l'hôte.

Le staphylocoque sera discuté en détail en 3^{ème} année, mais il faut se rappeler que le staphylocoque doré peut causer des infections suppuratives (bactérie pyogène), qui sont dues à la multiplication bactérienne et aux facteurs de virulence possédés par cette bactérie. Certaines souches de staphylocoque doré peuvent aussi causer des infections toxigéniques dues à la diffusion de toxines. A titre d'exemple, on peut citer des intoxications alimentaires à staphylocoques dorés (dus à une entérotoxine), et l'exfoliation (epidermolyse), due à une toxine exfoliative (Figure 2).

Figure 1. Infection pyogène (à gauche) et toxigénique (à droite) touchant la peau, et due à des souches différentes de *S.aureus*



Facteurs de virulence d'*Escherichia coli*

Comme mentionné dans le cours sur le monde bactérien, *Escherichia coli* est un exemple de bactérie qui peut causer de multiples infections : cystite, infections gastro-intestinales, etc. *Escherichia coli* est également un commensal de l'intestin grêle, vivant en parfaite symbiose au sein de notre tube digestif. Bien qu'il ne représente que moins de 1% des germes présents dans notre tube digestif, il est l'agent le plus souvent retrouvé lors d'infections intra-abdominales survenant suite à une rupture, ou perforation du tube digestif.

Ainsi, *Escherichia coli* est un commensal de l'intestin grêle, non pathogène en-dehors de perforations ou autres causes de rupture de cette défense naturelle que représente la paroi digestive. Cependant, il existe d'autres souches d'*Escherichia coli* qui, elles, ont une virulence particulière liée par exemple à la présence de toxines, et qui peuvent être pathogènes même lorsqu'elles sont à l'intérieur du tube digestif sans brèche. L'une de ces souches, appelée ETEC (toxigène), cause des diarrhées (turista). Il existe d'autres souches particulières d'*Escherichia coli* pouvant causer des diarrhées, les EIEC (invasives), les EPEC (pathogènes), et les EHEC (hémorragiques). Enfin, les souches causant par exemple une infection urinaire, auront des gènes codant pour des *fimbriae*, qui sont des sortes de pili permettant une bonne adhésion à l'urothélium (épithélium urinaire). Cette capacité d'adhésion, garantie par une adhésine, est un autre exemple de facteur de virulence.

Génomique et facteurs de virulence

La connaissance des facteurs de virulence a été largement facilitée par le séquençage des génomes bactériens. Le premier génome d'*Escherichia coli* séquencé au monde est une souche non pathogène utilisée comme organisme modèle. Ce génome a montré qu'il y avait beaucoup de gènes de mobilité, séquences d'insertion, éléments de recombinaison, et bactériophages cryptiques dans le génome. Ces éléments génétiques témoignent des nombreux échanges génétiques qui sont survenus chez les souches d'*E. coli*, et ces échanges expliquent la diversité des pathovars d'*Escherichia coli*.

Les facteurs de virulence identifiés, par exemple, chez les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques sont principalement présents sur des îlots génomiques (adhésine, toxine RTX), ou sur des plasmides (hémolysine, système de sécrétion de type 3, ...).

Il est probable que dans le futur la génomique d'importance médicale se développe, et permette de rechercher activement les facteurs de virulence des germes de manière relativement rapide –en quelques jours– comme ce fut le cas en mai 2011,

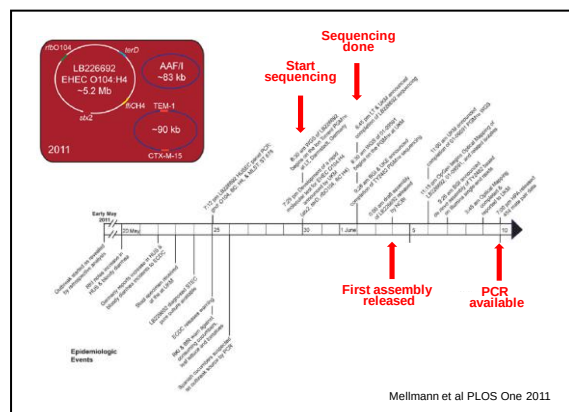
lorsqu'une épidémie importante d'*Escherichia coli* entéro-hémorragique est survenue en Allemagne, causant 46 décès et 834 syndromes hémolytico-urémiques (atteintes rénales et hématologiques) pour un total de 3'800 personnes infectées. A l'époque, en raison de la taille de l'épidémie, le génome a été fait rapidement (Figure 3), permettant d'identifier la vérotoxine (Shiga toxine), un facteur de virulence impliqué dans le syndrome hémolytique et urémique. Le séquençage du génome avait permis également d'identifier, sur deux plasmides différents, des gènes codant notamment pour une adhésine (AAF/I *fimbriae*) et, sur un autre plasmide, des bêtalactamases de type TEM-1 et CTX-M-15, conférant une importante résistance aux antibiotiques.

Il est intéressant de noter que la Shiga toxine est également présente chez *Shigella*, une espèce bactérienne qui ne se distingue d'*Escherichia coli* que par une plus grande infectivité (moindre dose infectieuse), par l'absence de mobilité, et par l'absence de possibilité d'utiliser le lactose, maltose et xylose comme source de carbone.

Il est important de noter ici que le séquençage du génome de *Shigella* a montré que cette bactérie plus virulente (dose infectieuse plus basse) que *Escherichia coli* doit cette virulence accrue non pas à plus de facteurs de virulence, mais à la perte de certains gènes permettant de réduire les effets de la Shiga entérotoxine. En effet, le gène CadA, qui permet la conversion de lysine en cadavérine, est absent chez *Shigella*, et cette protéine, la cadavérine, réduit les effets toxiques de la Shiga entérotoxine. De manière similaire, les *Shigella* n'ont pas le gène ompT, qui a la possibilité de dégrader un plasmide pINV, codant pour un système de sécrétion de type 3 et impliqué dans la dissémination de *Shigella* vers les cellules épithéliales adjacentes.

En conclusion, l'exemple de *Shigella* montre que la perte de gène peut expliquer la virulence accrue d'une souche par rapport à une autre.

Figure 3. Le séquençage du génome d'*E. coli* obtenu en 7 jours a permis d'identifier 2 plasmides (en bleu) codant pour des facteurs de virulence.



Conclusions

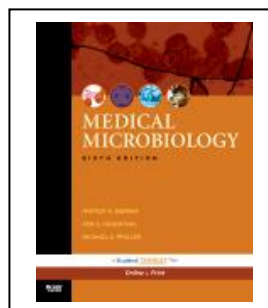
En conclusion, la pathogénicité est multifactorielle et peut découler, soit de la présence de facteurs de virulence (toxines, adhésines, enzymes, capsule, ...), soit de la perte de gène.

Salmonella typhimurium (agent de la fièvre typhoïde), *Rickettsia prowazekii* (agent du typhus) et *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) sont d'autres exemples de bactéries qui ont subi une évolution réductive de la taille de leur génome, et qui ont une pathogénicité plus importante que d'autres bactéries de leur genre dont le génome est plus grand, et qui sont par conséquent mieux adaptées à leurs hôtes. Par opposition, le tétanos, le botulisme ou la diphtérie sont des maladies dues à des bactéries toxinogènes (productrices de toxines), dont la toxine est le facteur de virulence expliquant la maladie.

Par ailleurs, d'autres facteurs de virulence tels que les enzymes (lipases, protéases, hyaluronidases, coagulases) sont impliqués dans la pathogénèse d'infections pyogènes. Enfin, pour résumer, on peut dire que la virulence est l'attribut d'une espèce au sein d'un genre ou d'une souche, au sein d'une espèce, et que cette virulence accrue est parfois liée à un gain de gènes, et parfois à une perte de gènes.

Lectures recommandées:

1. B.Salyers & D. Whitt. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. ISBN 1-55581-171-X, 560 pages; 2001.
2. Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, Mosby-Elsevier 2009. Chapter 7.
3. J.C. Pechère. Les Infections, EDISEM 1983.



B2.2 Sang, immunité, infection

Facteurs de virulence : adhésines

Gilbert GREUB

« Le succès d'une interaction dépend fortement du premier contact »

Objectifs d'apprentissage

- Reconnaître l'importance des adhésines comme facteurs de virulence
- Comprendre comment il est possible de découvrir de nouvelles adhésines
- Apprécier la diversité d'effet des adhésines bactériennes, qui sont parfois aussi antigéniques, immunogéniques et anti-phagocytaires.

Introduction

Parmi les principaux mécanismes de virulence caractérisant les bactéries, l'adhésion est généralement le premier mentionné, puisque l'adhésion est le pré-requis à une invasion des cellules eucaryotes permissives à une bactérie donnée.

On distingue 4 principaux types d'adhésines : (i) les adhésines non fimbriaires, (ii) les adhésines de type « *fimbriae* », qui présentent une surface chevelue avec des filaments plutôt fins, (iii) des filaments cohésifs entre eux, donnant des allures de cordes et appelés bundle-forming pili ; et enfin, (iv) les « curli », qui sont des filaments bouclés ou courbes qui peuvent s'enchevêtrer.

Les adhésines sont particulièrement importantes, puisqu'elles vont permettre d'initier l'interaction entre un microbe donné et une cellule-cible eucaryote. Ainsi, la plupart des bactéries présentent plus qu'une adhésine. Même si la science n'a pas encore pu préciser l'ensemble des récepteurs de chaque adhésine connue, de manière générale les

récepteurs sont soit des récepteurs cellulaires, soit des éléments du tissu conjonctif ou de la matrice extracellulaire, par exemple, la fibronectine. La plupart des adhésines sont de nature protéique, souvent de poids moléculaire élevé. Cependant, d'autres composants structuraux peuvent également officier en qualité d'adhésine, comme par exemple l'acide lipotéichoïque pour staphylocoque doré, un acide qui, pour rappel, ne se retrouve qu'au niveau de la paroi des bactéries Gram positives. A titre d'exemple, nous allons décrire trois adhésines de trois espèces bactériennes différentes : *Streptococcus pyogenes*, *Bartonella* et *Waddlia*.

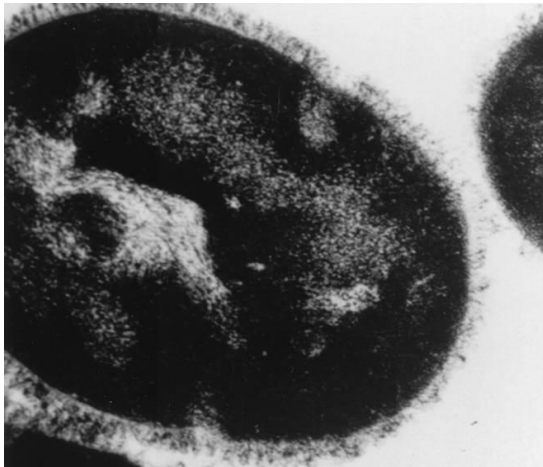
Adhésine de *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes, qui est un streptocoque bêta-hémolytique du groupe A, est la principale cause d'angines bactériennes, et peut être détecté par des tests immuno-chromatographiques au cabinet du praticien avec une sensibilité raisonnable. Cependant, au vu de la sensibilité imparfaite de ce test, en cas de forte suspicion clinique un traitement empirique est recommandé et une confirmation par culture sur gélose au sang est pratiquée. *Streptococcus pyogenes* est très facilement reconnaissable sur gélose au sang parmi l'ensemble de la flore oropharyngée, en raison de sa bêta-hémolyse (hémolyse totale). Lorsque des colonies suspectes sont retrouvées, un test complémentaire d'agglutination au latex contre une protéine de surface, la protéine M, permet de confirmer l'identification au niveau de l'espèce, puisque le *Streptococcus pyogenes* va agglutiner avec les antigènes dirigés contre le groupe A. *Streptococcus agalactiae*, quant à lui, agent de sepsis et méningite néonatale transmis lors d'accouchement par voie basse, de la mère à l'enfant, va agglutiner contre l'antigène B de Lancefield (streptocoque du groupe B). Pour les autres streptocoques, la correspondance entre un groupe donné et une espèce n'est pas toujours directe ; ainsi par exemple, à la fois le *Streptococcus equi* et le *Streptococcus dysgalactiae* font partie du groupe C.

La protéine M n'est pas seulement une protéine très immunogénique à la base de la classification de Lancefield des streptocoques, mais également une adhésine importante, composée de pili bien visibles au microscope électronique à la surface des streptocoques (Figure 1).

La protéine M n'est pas seulement impliquée dans l'adhérence aux cellules épithéliales et à la matrice extracellulaire, mais a également un effet anti-phagocytaire et prévient l'opsonisation (C3b).

Figure 1. Streptocoque visualisé par microscope électronique. Veuillez noter les nombreux pili à la surface, qui forment cette adhésine importante, la protéine M, impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales et à la matrice extracellulaire. (Cunningham, Clin Microbiol Rev, 2000).



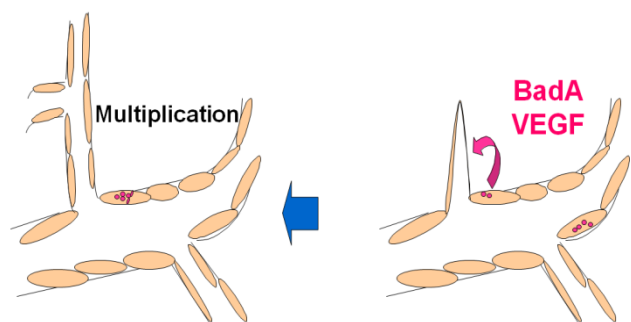
Adhésine de *Bartonella* (BadA)

Comme deuxième exemple, nous allons présenter la découverte de BadA, une adhésine impliquée dans la virulence de *Bartonella* et découverte fortuitement. En pratique, il y a une dizaine d'années, des chercheurs ont, suite à des passages multiples de la bactérie d'une gélose à une autre par repiquages successifs, obtenu un mutant spontané, appelé pil⁻, qui présentait une moindre adhérence à la gélose. Ces chercheurs ont voulu comprendre l'origine de ce phénotype particulier, et lorsqu'ils ont effectué une microscopie électronique, ont visualisé la disparition de pilus (bundle-forming pili). Ils ont mis en évidence la capacité de ce mutant spontané à ne plus pouvoir se lier à la fibronectine. Ainsi, afin d'identifier le gène qui code pour ces pili, les chercheurs ont créé des mutants aléatoires par transposition (en insérant des transposons à différents endroits du génome bactérien de manière aléatoire), puis ont testé l'ensemble de cette banque de mutants pour leur capacité à se lier à la fibronectine. Ce large dépistage de mutants obtenus par transposition leur a permis d'identifier un mutant qui avait perdu la capacité de se lier à la fibronectine, et donc, présentait un phénotype similaire au mutant spontané pil⁻. Ils ont appelé ce nouveau mutant BadA, car le gène rendu non fonctionnel par l'insertion du transposon était un gène codant pour une large protéine d'environ 340 kilodalton, dont la structure était similaire à YadA et NadA, de *Yersinia* et *Neisseria meningitidis*, respectivement. De plus, ces chercheurs ont pu montrer que cette protéine BadA était impliquée dans l'adhérence aux cellules eucaryotes et dans l'adhérence à différents composants de la matrice extracellulaire (collagène, laminine et fibronectine). L'ensemble de ces

expériences a été confirmé par la restauration de l'adhésion par complémentation, c'est-à-dire par l'expression de la protéine BadA à l'aide de l'insertion d'un plasmide codant ce gène chez le mutant BadA négatif. A ce stade, les chercheurs avaient bien confirmé la nature d'adhésine de BadA. Ils ont ensuite étudié d'autres rôles potentiels de cette protéine et ont pu démontrer, comme c'est le cas également pour la protéine M de *Streptococcus pyogenes*, que BadA prévient aussi la phagocytose par les macrophages, probablement en raison d'une inhibition stérique (taille importante de cette protéine BadA). Enfin, ils ont fait une autre découverte majeure : BadA induit également la sécrétion de différents facteurs pro-angiogéniques, tels que le vascular endothelial growth factor (VEGF). Ainsi, BadA peut, lorsqu'elle est exprimée par les bactéries *Bartonella*, induire la production de VEGF par les cellules endothéliales infectées. Ces cellules endothéliales vont alors proliférer et donner lieu à une néoformation vasculaire de type pseudo-néoplasique. Outre l'induction d'une prolifération de nouvelles cellules, BadA va également avoir un effet anti-apoptotique permettant d'éviter la mort cellulaire programmée des cellules infectées par *Bartonella*. Ainsi, *Bartonella*, grâce à son adhésine, a la possibilité de produire de nombreuses nouvelles cellules qu'elle pourra infecter et où elle pourra se répliquer. BadA explique la présentation clinique faite de néo-vaisseaux qu'on observe par exemple dans la verrue péruvienne (due à *Bartonella bacilliformis*) ou dans l'angiomatose bacillaire (observée suite à une infection par *Bartonella henselae* ou *Bartonella quintana* chez des patients HIV avec peu de CD4).

Mentionnons enfin que l'adhésion est si importante pour *Bartonella* que d'autres adhésines ont également été documentées (Omp 43, par exemple) et que ce mécanisme d'adhésion est redondant, car essentiel pour une bactérie intracellulaire.

Figure 2. BadA est une adhésine de *Bartonella* qui a également un effet pro-angiogénique. Ainsi, les *Bartonella*, par l'intermédiaire de cette protéine, lorsqu'à l'intérieur des cellules endothéliales vont induire la sécrétion de vascular endothelial growth factor (VEGF). Le VEGF va causer la multiplication de nouvelles cellules endothéliales, qui seront autant de cellules permissives à la réplication de *Bartonella*.

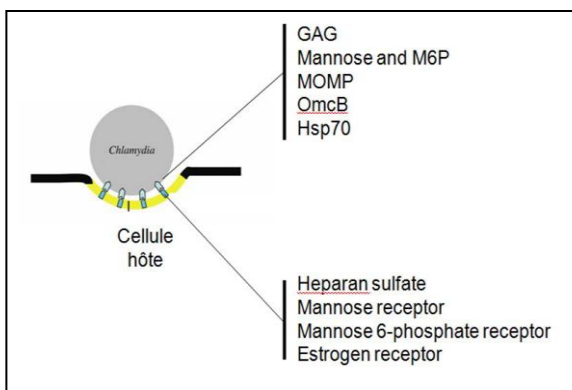


Adhésine de *Waddlia*

Le paragraphe sur *Bartonella* nous a permis de comprendre comment BadA avait été découvert par chance, grâce à l'obtention d'un mutant spontané. Dans ce paragraphe sur *Waddlia* nous allons décrire une approche utilisée pour découvrir de nouvelles adhésines. *Waddlia* est un nouveau pathogène, qui semble causer des fausses couches puisque les patientes avec fausse couche présentent un taux d'anticorps dirigés contre cette bactérie d'environ 33%, alors que les patientes de contrôle avec une grossesse normale, sans complications, présentent une séroprévalence *Waddlia* d'environ 7%. De plus, cette bactérie a été documentée dans le placenta de patientes avec fausse couche par immunohistochimie, et est une bactérie intra-cellulaire obligatoire capable de pousser dans les cellules endométriales. Il y a donc un grand intérêt à mieux connaître ce nouveau pathogène. De plus, cette bactérie apparentée aux *Chlamydia* peut également, par son étude, apporter des outils thérapeutiques pour traiter les infections à *Chlamydia trachomatis*, qui sont largement répandues (7 millions de cécité dans le monde, et environ 5% d'infections en Europe chez les personnes sexuellement actives).

Ainsi, pour découvrir des adhésines d'une bactérie, le premier élément est de bien connaître la littérature et ce qui est connu chez les bactéries qui lui sont apparentées. Chez les *Chlamydia* classiques, les glycosaminoglycanes (GAG), le mannose, le mannose 6-phosphate, la MOMP et la OmcB, ainsi que Hsp70, ont toutes été décrites comme de possibles adhésines. Ces adhésines se lient à différents récepteurs cellulaires, par exemple l'héparane-sulfate est lié par GAG, alors que le mannose et le mannose 6-phosphate se lient respectivement aux mannose récepteurs et aux mannose 6-phosphate récepteurs (cf. Revue rédigée par Campbell et Kuo, 2006) (Figure 3).

Figure 3. Principales adhésines connues chez les *Chlamydia*

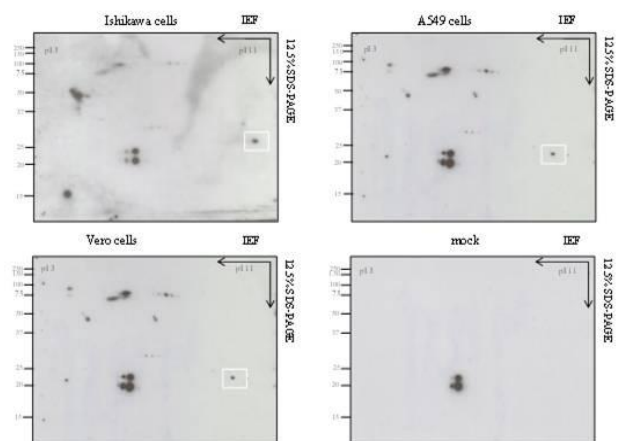


Les analogues des adhésines de *Chlamydia* peuvent donc être, dans un premier temps, testés pour leur capacité à lier la matrice extracellulaire et la cellule,

par exemple par expression chez *Escherichia coli* ou par expression sur des billes de latex. Le taux d'*Escherichia coli* ou de billes de latex qui se fixent à la matrice ou aux cellules testées sera mesuré.

Par ailleurs, il existe différentes méthodes pour découvrir de nouvelles adhésines lorsqu'aucune donnée n'est disponible ou lorsqu'on veut découvrir d'autres mécanismes qui peuvent être également impliqués. Ainsi, une approche est de séparer les protéines bactériennes sur un gel 2 dimensions, en fonction de leur poids moléculaire et de leur points isoélectriques, puis d'incuber ce gel 2 dimensions avec des protéines de surface de cellules eucaryotes préalablement biotinylées. On révèle ensuite les protéines liées à la membrane de nitrocellulose, en utilisant la streptavidine couplée à la peroxydase. Par cette approche, nous avons pu identifier une série d'adhésines, dont certaines paraissaient spécifiques aux cellules endométriales (Ishikawa), alors que d'autres étaient plutôt spécifiques des pneumocytes (A 549). Bien entendu, un contrôle négatif traité selon la même approche mais sans cellules eucaryotes, appelé MOCK, a été utilisé.

Figure 4. Recherche de protéines bactériennes qui se lient à la cellule eucaryote par séparation des protéines bactériennes sur un gel 2 dimensions, puis overlay avec les protéines de surface de diverses eucaryotes marquées à la biotine. Les protéines sont ensuite révélées avec de la streptavidine couplée à de la peroxydase. Le MOCK est un contrôle négatif sans cellules eucaryotes. Les protéines qui se lient, possibles adhésines, seront ensuite identifiées par spectrométrie de masse puis clonées et leur activité étudiée.



Les protéines positives dans le contrôle MOCK sont des artefacts et ne vont pas être étudiées.

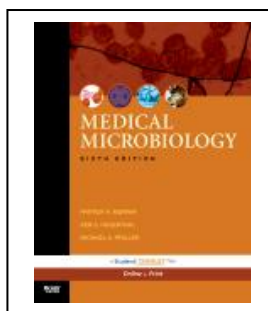
Les autres protéines révélées pourront être identifiées par spectrométrie de masse, puis clonées chez *E. coli* et exprimées, afin d'étudier leur capacité d'adhésion.

Conclusions

Plusieurs facteurs de virulence peuvent être combinés, mais l'adhésine est un facteur de virulence majeur, puisqu'il est impliqué dans la première étape, le contact entre la bactérie et une cellule eucaryote-cible. Certaines adhésines vont se fixer sur les protéines de la matrice extracellulaire (collagène ou fibronectine), permettant une meilleure dissémination dans les tissus. Les adhésines sont généralement des protéines de surface et sont donc souvent également immunogéniques et antigéniques, avec parfois des effets anti-phagocytaires comme démontré pour la protéine M de *Streptococcus pyogenes* et la protéine BadA de *Bartonella*. Par ailleurs, il faut souligner que la connaissance en biologie est parfois le fruit du hasard (exemple de BadA) et parfois le fruit d'une recherche orientée (exemple pour *Waddlia*). Cette connaissance permet de dériver des tests diagnostiques (sérologie, par exemple) et/ou des approches thérapeutiques (anticorps anti-adhésines ou médicament ayant comme cible l'un des récepteurs d'adhésines).

Lectures recommandées:

1. B.Salyers & D. Whitt. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. ISBN 1-55581-171-X, 560 pages; 2001.
2. Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th Edition, Mosby-Elsevier 2009. Chapter 7.



B2.2 Sang, immunité, infection

Echanges génétiques et génomiques

Gilbert GREUB

« Les nouvelles technologies nous permettent de lire dans le livre ouvert de la biologie que représentent les séquences d'ADN »

Objectifs d'apprentissage

- Comprendre la structure du génome bactérien et sa capacité à évoluer
- Se familiariser avec les mécanismes impliqués dans les échanges génétiques entre bactéries
- Connaître les étapes du séquençage d'un génome
- Comprendre les applications médicales de la génomique.

Introduction

En 1995, le premier génome bactérien a été séquencé. Il s'agissait du génome de *Haemophilus influenzae*. Cette souche bactérienne avait été choisie puisque c'était elle qui était à l'origine de la découverte des enzymes de restriction. Une autre espèce bactérienne a également été séquencée cette année là, il s'agissait de *Mycoplasma genitalium*, choisie en raison de son génome, extrêmement petit, qui devait faciliter le séquençage complet. Par la suite, le nombre de génomes séquencés s'est accru progressivement, avec par exemple, le séquençage de 2 organismes modèles, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, dont les génomes ont été publiés en 1997, et qui représentent des exemples de la biologie d'un bacille Gram négatif et d'un bacille Gram positif, respectivement. Le séquençage des génomes bactériens a également permis de développer des techniques et des compétences permettant d'envisager de séquencer des organismes multicellulaires, un vers (*C.elegans*) en 1998, puis le génome humain en 2001. Dès

2005, avec l'avènement de nouvelles techniques de séquençage à haut débit, le nombre de génomes a augmenté de manière exponentielle, et dès 2008-2009, le séquençage de génomes incomplets (drafts, ou "dirty genome") a été effectué. Le saut technologique apporté par les techniques de séquençage à haut débit a permis d'obtenir considérablement plus de séquences, plus rapidement, et pour un coût réduit. Ces développements, qui ont eu lieu les 10 dernières années, font que la génomique s'invite progressivement dans les laboratoires de microbiologie médicale diagnostique et que les médecins doivent aujourd'hui être formés à la compréhension des résultats de génomique bactérienne.

Génomes bactériens

Les génomes bactériens sont composés généralement d'un seul chromosome circulaire haploïde et d'éléments génétiques extra-chromosomiques, tels que plasmides, bactériophages et transposons. Ces éléments génétiques extra-chromosomiques peuvent être à l'origine de transfert de matériel génétique. Ainsi, les plasmides conjugatifs permettent la conjugaison bactérienne, alors que les bactériophages sont à l'origine d'un autre mécanisme de transfert appelé transduction. Enfin, les transposons sont, comme nous le verrons, des éléments mobiles qui peuvent se déplacer par le mécanisme de transposition. Outre ces 3 modes de modifications génétiques liés à des éléments extra-chromosomiques, il est également possible de transformer une bactérie par l'administration d'ADN nu (transformation).

Les plasmides sont, comme les chromosomes, à double brins. Les plasmides sont capables de s'auto-réplicuer et peuvent parfois s'intégrer aux chromosomes, formant ce qu'on appelle des îlots génomiques (cf. ci-dessous). Les plasmides comportent des gènes non essentiels à la bactérie, mais qui souvent lui confèrent un avantage sélectif. Ainsi, certains plasmides codent pour des facteurs de virulence ou des gènes de résistance aux antibiotiques, par exemple. Rappelons ici que les gènes sont souvent organisés en opérons. Ainsi, par exemple, l'opéron présent sur les plasmides conjugatifs code pour des protéines qui permettent la conjugaison (cf. ci-dessous).

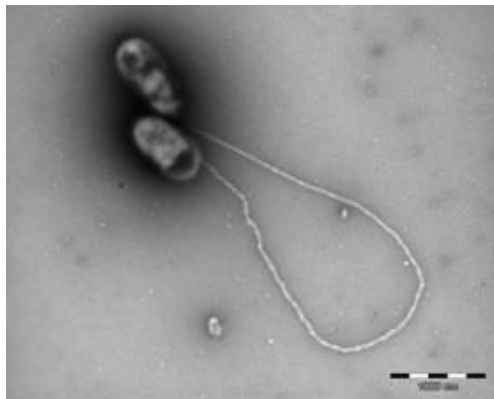
Echange génétique

a) Conjugaison

La conjugaison entre les bactéries se fait grâce aux facteurs de fertilité F que porte la bactérie donatrice, souvent appelée bactérie "mâle". Ce facteur de fertilité est parfois appelé F+ ou F prime

(ou également abrégé HFR pour "haute fréquence de recombinaison"). La bactérie réceptrice de l'ADN transféré est parfois appelée bactérie "femelle", ou F-. L'échange génétique se fait par simple transfert d'ADN au travers d'un pili conjugatif (Figure 1). La première étape de la conjugaison est la liaison du pilus entre la bactérie donatrice d'ADN et la cellule bactérienne réceptrice. La deuxième étape est la rétraction de ce pilus conjugatif pour mettre en contact les deux cellules. Il y a ensuite différentes interactions entre les protéines des deux cellules qui permettent une stabilisation du contact intercellulaire et le transfert d'ADN. Une fois que le transfert d'ADN est complété, il y a ségrégation des deux cellules bactériennes, qui deviennent alors toutes deux donatrices (F+).

Figure 1. Conjugaison entre 2 bactéries visualisée par microscope électronique (Ogata et al., 2006)



b) Transposition

La transposition est le transfert d'éléments génétiques mobiles grâce à des transposons, qui contiennent des séquences d'insertion (IS), qui pourront s'insérer de manière aléatoire à différents endroits du génome. Les transposons sont très utilisés dans la transformation (production de mutants défectifs par l'insertion du transposon au niveau d'un gène ; ces mutants sont produits de manière aléatoire, cf. chapitre sur les adhésines). Les transposons peuvent être très petits et peuvent contenir des gènes offrant un avantage sélectif, par exemple, une résistance à des antibiotiques. Les îlots génomiques sont en fait des sortes d'immenses transposons. Cependant, l'îlot génomique comporte un certain nombre de caractéristiques qui lui sont propres : (i) taille de 10 à 200 kb, (ii) présence de gènes de mobilité (transposases, bactériophages), (iii) souvent flanqué par des séquences particulières (tRNA et séquence d'insertion). Comme bien démontré par l'exemple de l'îlot génomique de *Protochlamydia amoebophila*, les îlots génomiques ont souvent une signature nucléotidique très différente du reste du

génome, liée au biais d'usage de codons. En effet, rappelons que le codon étant un triplet de 3 nucléotides, peut coder pour un total de 64 combinaisons, alors qu'il y a un peu plus d'une vingtaine d'acides aminés différents. Ce code génétique dégénéré permet donc qu'un même acide aminé soit codé par 3 ou 4 codons différents. Ainsi par exemple, 4 codons différents formés de 3 nucléotides chacun, codent pour la leucine. Certaines espèces vont privilégier un des codes à un autre pour coder la présence d'une leucine à un endroit donné d'une protéine. Cette préférence est une sorte de signature ou accent d'une espèce bactérienne et permet, dans une certaine mesure, d'identifier l'origine hétérologue d'ADN transféré, et notamment les îlots génomiques qui sont de taille importante, de l'ordre de 10 à 200 kb.

c) Transduction

La transduction est le transfert d'ADN par lysogénie des suites d'une infection par un bactériophage. Il existe deux types principaux de bactériophages : des bactériophages lytiques et des bactériophages lysogéniques. Les bactériophages lytiques sont des virus qui sont spécifiques de certaines espèces bactériennes qui vont occasionner des plages de lyses visualisables sur un tapis bactérien inoculé sur une gélose. Par opposition, les phages lysogéniques ne vont pas induire de lyses bactériennes après infection. Ils vont donc intégrer leur ADN dans le génome d'une bactérie, puis, des suites d'un élément stimulateur, il y aura une réactivation ultérieure, une possible excision du bactériophage et lyse avec un nouveau cycle d'infection. Les génomes des bactéries sont truffés de séquences de bactériophages, qui sont autant de lieux possibles de recombinaison homologue avec d'autres bactériophages. Cette transduction cible donc des endroits où des séquences homologues de bactériophages sont présentes. Notons que ces bactériophages sont souvent porteurs de toxines ou de facteurs de virulence. Un exemple est la toxine de la diphtérie, portée par la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*.

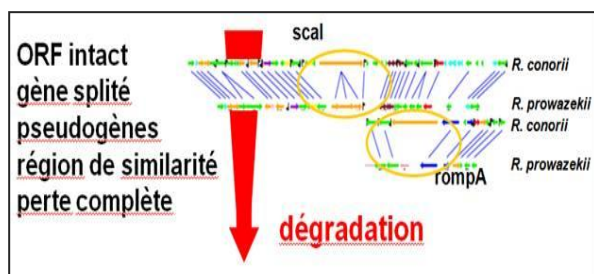
d) Transformation

Le dernier mécanisme d'échange génétique est la transformation par l'acquisition d'ADN nu. Ce type de transfert génétique est facilité en rendant les bactéries compétentes à l'acquisition d'ADN. La compétence d'*Escherichia coli*, largement utilisée par les chercheurs, est obtenue en phase de croissance exponentielle d'*Escherichia coli* et à l'aide de tampons spécifiques. La transformation permet d'utiliser les bactéries comme outil pour exprimer diverses protéines qui pourront être produites en grande quantité, puis purifiées pour être utilisées comme substance thérapeutiques ou vaccins, par exemple.

Pourquoi séquencer un génome

Initialement, les premiers génomes séquencés visaient à mieux comprendre la biologie d'organismes modèles, tels qu'*Escherichia coli* pour les Gram négatif, et *Bacillus subtilis* pour les Gram positif. Le séquençage des génomes a également beaucoup aidé à mieux comprendre l'évolution, que ce soit une évolution réductive, par perte de gènes (cf. Figure 2, *Rickettsia prowazekii*, *Mycobacterium leprae*), ou des évidences d'une grande plasticité génomique par transferts horizontaux (expliquant les nombreux pathovars d'*Escherichia coli*). Enfin, le séquençage des génomes bactériens a permis de mieux comprendre le métabolisme des procaryotes. Bien entendu, les applications médicales sont également des raisons importantes pour séquencer des génomes, puisque ces séquençages permettent de découvrir de nouvelles protéines immunogéniques, qui pourront être des cibles vaccinales ou utilisées pour le développement de nouveaux tests sérologiques. Les génomes ont également permis de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques (p. ex. pour l'agent de la tuberculose). Outre la détection de protéines antigéniques utiles à la sérologie, la disponibilité des génomes nous permet également d'affiner les cibles utilisées en biologie moléculaire pour détecter les agents pathogènes par PCR. La génomique est également très utile, lors de présentations cliniques particulières, afin de pouvoir détecter d'éventuels facteurs de virulence et ce, dans un délai court. Enfin, actuellement dans la plupart des hôpitaux, l'analyse épidémiologique des souches, qui se faisait préalablement par des techniques de séquençage de quelques gènes (MLST), utilisent également de plus en plus des approches de génomique comparée.

Figure 2. La perte de gène est liée à une dégradation progressive. Dans cet exemple, le génome de *Rickettsia prowazekii*, agent du typhus, est réduit par rapport à celui de *R. conorii*, agent de la fièvre boutonneuse méditerranéenne.



Comment séquencer un génome

Un projet de séquençage de génomes comporte 6 étapes principales : (i) le choix de la souche ou de l'échantillon analysé, (ii) l'extraction de l'ADN et

le séquençage proprement dit, (iii) l'assemblage du génome, (iv) la fermeture des trous résiduels après assemblage (GAP closure), (v) l'annotation, et (vi) l'analyse et l'interprétation des données.

Les génomes peuvent être effectués sur une culture pure, à partir d'une colonie isolée, ou d'emblée sur un échantillon clinique. Cependant, la génomique bactérienne sur échantillon n'est facile que si le germe est présent en quantité suffisante et idéalement, se trouve dans un échantillon normalement stérile, comme seul pathogène. Après extraction de l'ADN, le séquençage se fait actuellement par des nouvelles technologies, dites de séquençage à haut débit, telles que le 454 de Roche, le Hiseq de Illumina, le PGM de Ion Torrent, et le PacBio de Pacific BioSciences.

L'assemblage consiste à joindre bout à bout les séquences obtenues, appelées "reads", en de plus grandes séquences qui s'appellent des contigs, et ce, par l'overlap des reads obtenu selon certains critères (p.ex. plus de 45 paires de bases d'overlap dont l'identité est supérieure à 90%). Ces contigs peuvent être ensuite ordonnés les uns par rapport aux autres, et des liens virtuels peuvent parfois être établis. On parle alors de "scaffold". Les assemblages sont effectués le plus souvent par "mapping", c'est à dire par comparaison avec un génome de référence d'une autre souche de la même espèce. Parfois il n'y a pas de référence disponible et il faut faire un assemblage *de novo*. Ce type d'assemblage est beaucoup plus difficile et on se retrouve devant la situation où il faut assembler un puzzle fait de pièces très semblables, sans modèle disponible. Une fois qu'une séquence complète -ou presque complète- est disponible, l'annotation a lieu. Elle comporte 2 étapes. Une première annotation de région, afin de connaître les zones codantes pour des protéines (ORF), qui sont des cadres de lecture dans laquelle il n'y a pas de codons "stop". L'annotation de région inclut également l'identification de la présence d'ARN, par exemple. La deuxième étape est l'annotation de fonction, qui se fait par recherche de gènes homologues dans différentes bases de données internationales ou par génomique fonctionnelle (test de fonction au laboratoire). L'annotation permet, par exemple, d'obtenir une vision des voies métaboliques disponibles chez une bactérie donnée, ou de détecter d'éventuels facteurs de virulence.

Le paradigme du « dirty genome »

En 2009, le concept de "dirty genome" a été proposé. Il consiste en l'analyse d'un génome assemblé mais pour lequel il reste encore des trous (GAP). Cette approche permet de donner plus rapidement des informations, ce qui est important

dans le domaine médical. Les coûts et les efforts sont considérablement réduits, puisque l'on estime que plus de 80% du temps et des efforts sont nécessaires pour combler les trous. Ces fameux "dirty genome" permettent d'apporter plus de 95% de l'information, car les trous sont généralement liés à des zones répétées, comme des transposases, et la plupart des facteurs de virulence ou gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques ne se trouvent pas dans ces zones. Le paradigme du "dirty genome" fut proposé lors de l'élimination d'une souche du genre *Parachlamydia*, isolée lors d'une épidémie de pneumonie survenue dans une imprimerie. Cette souche, séquencée par deux techniques à haut débit, 454 (Roche) et Solexa (Illumina), a permis d'obtenir 94% des séquences totales du génome. Par la suite, pour deux épidémies majeures, la même approche fut utilisée : d'une part, lors de l'épidémie de choléra survenue à Haïti en 2010, et celle survenue en Allemagne en 2011, causant des syndromes hémolytiques urémiques liés à *Escherichia coli*. Les données obtenues par "dirty genome" lors de l'épidémie de choléra ont permis de démontrer que l'origine de cette épidémie était liée à une souche d'origine népalaise, apportée à Haïti par les volontaires venus sur place pour aider des suites des tremblements de terre. De même, la génomique effectuée lors de l'épidémie allemande a permis d'obtenir en 3 jours une séquence. Cette séquence du génome fut très utile, d'une part, pour le développement d'une PCR diagnostique plus spécifique permettant de tracer la souche épidémique, et d'autre part, pour mieux connaître les facteurs de virulence présents chez cette souche.

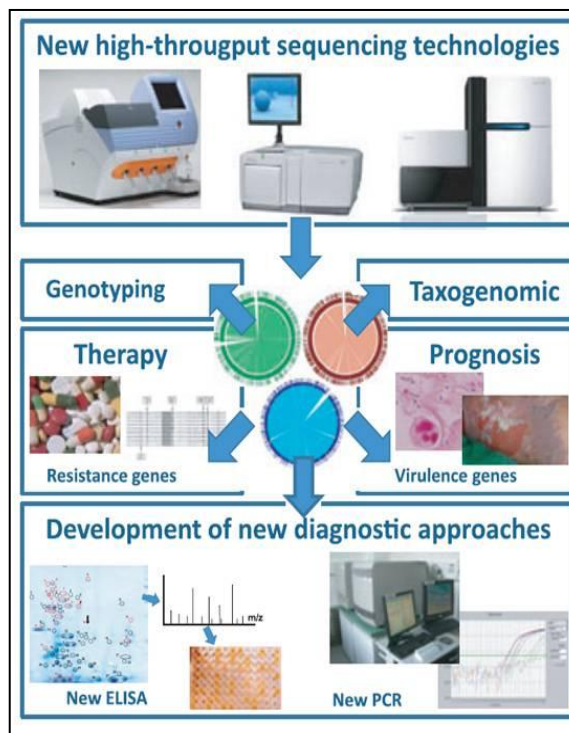
Projets institutionnels lausannois

Au vu de notre expérience en génomique et de notre intérêt en microbiologie diagnostique, nous avons envisagé de développer un projet de génomique d'importance médicale, dès 2009, lorsque nous avons proposé le concept de "dirty genome" (Greub et al. PLOS One, 2009). Grâce à la démonstration de l'utilité d'un centre de génomique d'importance médicale apporté par l'épidémie d'*Escherichia coli* O104 :H4, nous avons pu obtenir le financement pour mettre en place une plateforme de séquençage de génomique à l'Institut de Microbiologie. Les génomes effectués visent à mieux comprendre la pathogénicité, la présentation clinique et le potentiel épidémique de souches particulières. Par ailleurs, la génomique a été également dans un but épidémiologique, ainsi que pour détecter les gènes codant pour une résistance particulière aux antibiotiques. Pour arriver à des résultats rapides en moins de 72 h., la disponibilité d'un séquenceur sur place à l'hôpital et le

développement d'algorithmes d'analyses automatisées était indispensable.

A titre d'exemple, je vous présenterais la première demande que nous ayons reçu dans les jours qui suivirent le début de ce projet. Il s'agissait d'une infection par la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*, documentée chez un réfugié par culture. Cette souche ne présentait apparemment sur la base de la PCR pas de toxines cardiotoxiques, généralement apportées par des bactériophages au sein des chromosomes de corynébactéries. Cependant, au vu d'un effet cytopathique sévère sur l'épithélium bronchique visualisé par bronchoscopie, il était probable que le prophage, qui généralement apporte à la fois des facteurs cytopathiques et la toxine cardiotoxique, soit présent. Ainsi, le patient a été maintenu en isolement le temps de l'analyse du génome. Le séquençage s'est fait rapidement, et 10 jours après la décision de séquencer, les résultats permettaient de confirmer la présence du corynéphage, qui est classiquement associée avec des effets cytopathiques, mais de documenter également l'absence totale de la toxine, confirmant les résultats de PCR et d'autres résultats complémentaires qui ont été effectués dans les mois qui suivirent.

Figure 3. Génomique d'importance médicale : les principales applications sont la détection de facteurs de virulence, de gènes ou mutations associés à des résistances aux antibiotiques, la traçabilité d'une souche (épidémiologie) et l'aide au design d'outils diagnostiques modernes.



Métagénomique et culturomique

Outre l'obtention d'informations par séquençage d'une souche, il est également possible de déterminer la composition microbienne totale d'un échantillon donné par séquençage à haut débit. Cette approche, appelée métagénomique, permet d'avoir une idée du microbiota présent chez un patient donné.

Ainsi, grâce aux nouvelles technologies, il est dorénavant possible de connaître le microbiota d'un individu et de comprendre son rôle dans différentes maladies non infectieuses, telles que l'asthme ou l'obésité, par exemple. Cependant, les données de séquençage (métagénomique) ne donnent pas accès aux souches (pas de culture pure, rendant impossible des études plus spécifiques en aval. Par conséquent, certaines équipes choisissent actuellement de déterminer la composition microbienne non pas par séquençage à haut débit mais par culture à haut débit, et ce, grâce aux nouvelles technologies d'automatisation, de miniaturisation, d'incubation intelligente et d'identification (MALDI-TOF, par exemple). Ainsi, des chercheurs français ont pu identifier un total de 32'500 colonies différentes, isolées toutes par culture à partir de 3 selles de 3 patients différents. Parmi ces 32'500 colonies, ils ont pu documenter 340 espèces différentes, dont 32 nouvelles espèces. De plus, il faut souligner que les espèces retrouvées étaient souvent différentes de celles documentées par métagénomique. Ainsi, dans le futur, si l'on veut avoir une bonne compréhension de la flore microbienne présente dans les échantillons physiologiquement colonisés, il sera probablement utile de combiner ces deux approches de métagénomique et de culturomique.

Conclusions

En conclusion, les nouvelles technologies de séquençage à haut débit permettent le séquençage rapide de génomes qui, même sans être complet, permet d'apporter de nombreux renseignements utiles au médecin sur le pronostic de la maladie et le traitement par l'information apportée respectivement sur le virulome (gènes de virulence) et leur résistome (gènes de résistance).

Les techniques de séquençage haut débit et de génomique permettent également au microbiologiste de développer de nouvelles méthodes diagnostiques, plus fiables, que ce soit en sérologie ou en biologie moléculaire. Enfin, la génomique est un outil très utile pour faire un génotypage précis en épidémiologie.

Lectures recommandées:

1. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. Bertelli C, Greub G. Clin Microbiol Infect. 2013 Sep;19(9):803-13.
2. Functional genomics of intracellular bacteria. de Barsey M, Greub G. Brief Funct Genomics. 2013 Jul;12(4):341-53.
3. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TE, Crook DW. Nat Rev Genet. 2012 Sep;13(9):601-12.

B2.2 Sang, immunité, infection

Champignons et parasites

Gilbert GREUB

« *La perplexité est le début de la connaissance* »
(Khalil Gibran)

Objectifs d'apprentissage

- Connaître les principales caractéristiques des levures et champignons filamenteux d'importance médicale ;
- Se familiariser avec deux exemples fréquents : *Candida* et *Aspergillus* ;
- Connaître les principaux types de parasites d'importance médicale ;
- Se familiariser avec trois types de parasites principaux : le plasmodium, les vers intestinaux et les amibes.

Introduction à la mycologie

Les champignons sont des eucaryotes. Le nombre d'espèces de champignons est extrêmement important, mais seuls quelques-uns d'entre eux sont réellement importants en pathologie humaine. Ainsi, plus de 100'000 espèces de champignons ont été décrites ; moins de 200 sont associées à des maladies chez l'homme, et deux genres sont particulièrement importants et vont être discutés dans ce cours : le genre *Candida* et le genre *Aspergillus*.

Sous le nom général de champignon (fungi), on distingue les champignons filamenteux (molds, en anglais) dont l'exemple que nous développerons ici est l'*Aspergillus* ; les levures (yeasts, en anglais) dont l'exemple est *Candida albicans* ; et enfin, les champignons comestibles ou vénéneux (mushrooms, en anglais).

On distingue trois grands types de maladies liées aux champignons d'importance médicale : les **mycotoxicooses** dues à des toxines, les **hypersensibilités aux champignons** (alvéolite allergique, aspergillose broncho-pulmonaire allergique), et les **infections**.

Parmi les mycotoxicooses, on distingue notamment 3 types de toxines :

- les alcaloïdes de l'ergot de seigle,
- les agents psychotropes (LSD)
- les aflatoxines (*Aspergillus flavus*)

De manière générale, les infections mycotiques sont souvent précédées d'une colonisation. Par conséquent, la présence de levures ou de champignons filamenteux dans un prélèvement physiologiquement non stérile pose la question de sa signification clinique. En fonction du nombre de prélèvements positifs, de la quantité de champignons isolés par culture, ainsi que du nombre et de la variété des échantillons positifs, il est possible d'évaluer cette signification clinique. Certains champignons vont causer des infections chez l'hôte normal et sont de véritables pathogènes, alors que d'autres vont causer des infections principalement chez l'hôte immunodéprimé et sont considérés comme des pathogènes opportunistes.

De manière générale, on classe les champignons pathogènes pour l'homme en fonction de leur forme en champignons filamenteux (*Aspergillus*), levures (*Candida*) et champignons dimorphiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent avoir un aspect filamenteux ou un aspect de levure.

Les champignons pathogènes pour l'homme peuvent être également classés par site d'infection (mycose superficielle, cutanée, profonde ou systémique).

Levures (*Candida albicans*)

Les levures comportent des espèces pathogènes, comme *Candida albicans*, et des espèces non pathogènes, comme la levure du boulanger (*Sacharomyces cerevisiae*).

Candida albicans est un pathogène qui se retrouve généralement chez des patients présentant certains facteurs de risque facilitant la colonisation et/ou l'invasion par cette bactérie. Les facteurs de risque incluent un traitement antibiotique préalable, des traitements immunosuppresseurs (par exemple cytostatiques et corticoïdes), le diabète, une chirurgie abdominale complexe, ou l'utilisation de cathéters intra-vasculaires. Ces différents facteurs provoquent un déséquilibre entre *Candida* et l'hôte, soit par la présence de brèches (cathéter, chirurgie), soit d'une immunosuppression relative, soit d'une modification de la flore colonisante avec un nombre accru de levures (traitement antibiotique). De manière générale, ces levures du genre *Candida* colonisent notre tube digestif, potentiellement sur toute sa longueur de l'oropharynx au colon. *Candida* colonise également la peau, où le nombre de levures va s'accroître considérablement en présence d'humidité (au niveau des plis, p. ex.) ou en présence de corps étrangers (cathéter, p. ex.). Enfin, *Candida albicans* colonise également la muqueuse vaginale et peut occasionner des pertes blanches (mycose vaginale).

Les infections causées par *Candida albicans* seront vues en détail en 3^{ème} année mais, à titre d'exemple, dans la figure ci-dessous vous voyez la candidose

oropharyngée (muguet) qui, cliniquement, se manifeste généralement par une dysgueusie (changement du goût, bouche pâteuse, etc.). Le muguet va être documenté souvent chez des patients présentant une immunosuppression (traitement de corticoïdes, infection VIH, ou chez les diabétiques). Lors de chirurgie abdominale complexe, *Candida* peut également jouer un rôle pathogène et sera retrouvé dans les collections intra-abdominales ou culture de drains.

Figure 1. Candidose oropharyngée (muguet) due à *Candida albicans*



***Candida* : diagnostic de laboratoire**

Comme pour d'autres pathogènes, on peut détecter la présence de levures à l'examen direct par culture ou par PCR.

A l'examen direct, on peut voir les levures du genre *Candida* au Gram. Elles présenteront une taille clairement plus importante que les bactéries, de l'ordre de 4-6 microns, et des pseudo-hyphes (bourgeoisements). Elles seront colorées en violet à la coloration de Gram. Il est également possible d'utiliser des colorations fluorescentes pour détecter les levures du genre *Candida* (calcofluor), ou des colorations iodées.

En culture, les *Candida* vont pousser en 1-3 jours sur des milieux standards tels que les géloses au sang cuit (chocolat), gélose au sang, ou sur des géloses sélectives (Sabouraud). Il est également possible d'utiliser des géloses spécifiques, chromogènes, qui permettent de différencier les espèces principales de *Candida* en fonction de la couleur des colonies. Sur des milieux conventionnels, les colonies seront blanc-crème et de taille variable. Il est aisément possible de différencier *Candida albicans* des autres espèces du genre *Candida* par la recherche de filamentation dans le sérum (production d'hyphes typiques de cette espèce). La différenciation de *Candida albicans* et d'autres espèces est utile aux médecins en raison de la différence de sensibilité aux antifongiques. Une identification plus précise peut également être effectuée par des tests phénotypiques d'assimilation ou de fermentation de sucre, par exemple. La PCR peut être utilisée pour détecter la présence de *Candida* dans des prélèvements précieux et dans des situations

cliniques particulières. L'identification moléculaire des souches de *Candida* peut également être effectuée par le séquençage de certains gènes discriminants et conservés.

Par des techniques de sérologie, il est possible de détecter des antigènes (mannane) et des anticorps (anti-mannane) permettant indirectement de documenter une infection à *Candida*.

Enfin, il est possible de tester la sensibilité des levures aux antifongiques par des méthodes de mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et par des dilutions en série des antifongiques en tubes. Il est également possible de tester la sensibilité sur gélose par test de diffusion d'antibiotique en disque ("disk diffusion") et par des E-tests, de manière similaire à ce qui est fait pour tester la sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

***Aspergillus* (champignons filamenteux)**

Les espèces d'*Aspergillus* sont extrêmement prévalentes dans l'environnement, dans le sol, l'air, et sont des champignons filamenteux ubiquitaires comptant des centaines d'espèces. La porte d'entrée est généralement respiratoire au vu de la présence de spores au niveau de l'air. Ces germes peuvent causer trois types de maladies principales : des **pneumonies d'hypersensibilité**, (aspergillose broncho-pulmonaire allergique), des **aspergillomes** (colonisation de cavités préformées [sinus], ou cavités préexistantes suite à une tuberculose, p. ex. au niveau des poumons), ou une maladie invasive de l'hôte immunodéprimé appelée **aspergillose invasive**.

Diagnostic de laboratoire

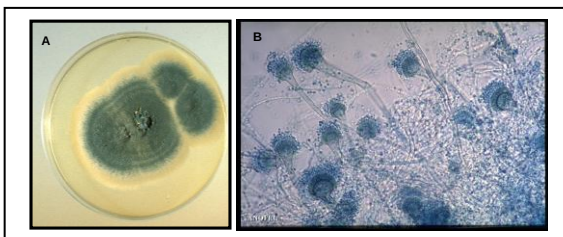
A l'examen direct ou sur des prélèvements de pathologie, il est possible de détecter la présence de filaments mycéliens septés, réguliers, à embranchement dichotome à 45°. La présence de ce type de filaments a une signification clinique dépendant du type de prélèvement.

Comme les levures, les *Aspergillus* poussent également sur les milieux standards (gélose au sang, p. ex.) ou les milieux spécifiques (Sabouraud) d'une manière relativement rapide, en 2-5 jours. L'identification des colonies d'*Aspergillus* peut se faire sur la base de l'aspect des colonies, pigmentation, et également sur l'aspect microscopique des organes reproducteurs, les têtes aspergillaires.

L'histologie est un outil essentiel au diagnostic d'invasion, puisqu'elle permet de voir la localisation des hyphes de champignons par rapport aux vaisseaux notamment, et aux différentes structures. Par contre, sur la base d'une histologie, le diagnostic d'espèce n'est pas possible.

Le diagnostic moléculaire est important dans l'approche diagnostique des mycoses. On utilise soit des PCR spécifiques au genre (*Aspergillus*) ou des PCR panfongiques amplifiant diverses espèces de champignons, p. ex. par l'amplification du gène codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal. Enfin, le diagnostic sérologique est possible soit par la recherche d'IgE anti-aspergillus (positives lors d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou d'aspergillome), ou par la recherche d'antigènes de paroi (galactomannanes, utile lors d'aspergillose invasive survenant sur des personnes immunosupprimées).

Figure 2. Présence d'*Aspergillus fumigatus* sur une gélose Sabouraud. A) Noter la couleur bleu-vertâtre des colonies. B) au microscope, entre lame et lamelle avec une coloration au bleu de méthylène, il est possible de bien voir les têtes aspergillaires.



Introduction à la parasitologie

Dans la prise en charge analytique de prélèvements pour la parasitologie, il faut rappeler l'importance des renseignements cliniques qui doivent figurer sur le bon de demande accompagnant des échantillons. En effet, selon les facteurs prédisposants, d'éventuelles prophylaxies ou mesures préventives, et les voyages ou le pays d'origine de la personne, différents parasites sont plausibles ou peuvent être écartés du diagnostic différentiel. Ces renseignements sont très utiles pour que le spécialiste en microbiologie puisse confronter les résultats avec ces données.

Les prélèvements utiles à la recherche de parasites sont variables et dépendent des germes recherchés. Ainsi, si l'on recherche des vers intestinaux ou des protozoaires digestifs, l'examen des selles est nécessaire et les selles représentent le prélèvement de premier choix, alors que si des protozoaires sont présents dans le sang, un frottis sanguin sera examiné. L'examen des selles doit être fait de manière rapide après l'émission afin d'avoir une préservation des amibes, qui sont plutôt fragiles. Les selles peuvent également être fixées, p. ex. au formaldéhyde ou formol, ou préservées à 4°C. Des selles fixées ne permettent plus de voir les formes végétatives des amibes, mais permettent toujours de démontrer la présence des kystes de protozoaires et bien entendu, la présence d'infection par des vers intestinaux (œufs ou anneaux de ténia).

Les parasites peuvent être classés en deux grands groupes : les protozoaires et les helminthes.

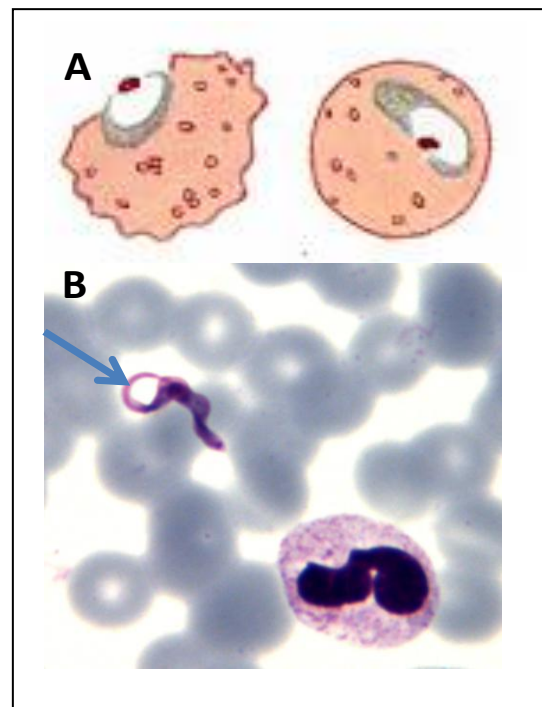
Protozoaires

Parmi les protozoaires, on distingue les protozoaires présents dans le sang et les protozoaires intestinaux.

Les protozoaires dans le sang comportent notamment l'agent de la malaria, le plasmodium, ainsi que les *Trypanosoma gambiense* ou *rhodesiense* (agent de la maladie du sommeil). De manière générale, ces protozoaires sanguicoles peuvent se retrouver par l'examen d'un prélèvement sanguin (pour *Plasmodium* et *Trypanosoma*). L'identification peut être effectuée sur des frottis sanguins colorés par May-Grunwald-Giemsa. Sur de tels frottis il est aisé d'observer et de reconnaître, grâce à leur morphologie particulière, la présence de *Plasmodium* ou de *Trypanosoma* (cf. Figure 3).

Les agents de leishmaniose (*Leishmania donovani*, *infantum*, *mexicana*) et *Trypanosoma cruzi* (agent de la maladie de Chagas) se retrouvent par examen d'un prélèvement biopsique de l'organe touché par la leishmaniose (p.ex. la moelle osseuse).

Figure 3. Pannel a : aspect typique de trophozoite de *Plasmodium* présentant un cytoplasme bleu clair à noyau rouge et un pigment brun-doré qui est l'hémozine (produit de dégradation de l'aïme), ainsi qu'une vacuole nutritive (claire). **Pannel b :** présence de *Trypanosoma cruzi* (forme flagellée trypomastigote) dans un prélèvement de sang.



L'identification des différentes espèces de *Plasmodium* au niveau de l'espèce peut se faire sur la base de la morphologie des différents stades de développement du *Plasmodium* : trophozoïtes, schizontes et gamétocytes (Figure 4.)

Figure 4. Différents stades de développement de *Plasmodium falciparum*, avec la présence de gamétocytes en forme de banane (27-30). Noter également les trophozoïtes qui sont typiquement de forme annulaire, notamment lorsqu'elles sont jeunes (3-9), ou plus amœboïde ensuite (16-21). Ces trophozoïtes mûres (amœboïdes) vont maturer en des schizontes (24-25), qui contiennent de nombreux mérozoïtes libérés à la rupture du schizonte (26).



Les autres espèces de *Plasmodium* peuvent être différenciées sur la base du frottis, notamment en raison de la taille plus grande des globules rouges lors d'infections par *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium vacuole*, la taille des globules rouges plus petite lors d'infections par *Plasmodium malariae*, la présence de bandes équatoriales qui traversent de part et d'autre le globule rouge pour *Plasmodium malariae*, ainsi que la présence de globules rouges plutôt ovales et effrangés lors d'infections avec *Plasmodium ovale*. La présence de granulations au sein des globules rouges (granulation de Maurer ou Schnüpfen), ainsi que la taille et le nombre de mérozoïtes par schizontes, permettent également de différencier les espèces de *Plasmodium* de manière grossière. Cependant, l'identification définitive ne peut être effectuée que par PCR, qui s'avère être le gold standard pour l'identification à l'espèce.

Pour détecter la présence de *Plasmodium*, on peut d'une part détecter la présence d'antigènes par des

tests immuno-chromatographiques (tests rapides). Il est également possible de faire un frottis sanguin. Cependant, le frottis qui est recommandé pour la quantification et l'identification à l'espèce des *Plasmodium* a une sensibilité relativement faible. Pour cette raison, les laboratoires diagnostiques utilisent la goutte épaisse, qui a une bonne sensibilité (de l'ordre de 50 parasites par microlitre) afin d'augmenter la sensibilité de la détection de *Plasmodium* dans le sang. Enfin, la PCR, bien que très sensible (de l'ordre de 20 parasites par microlitre) est trop coûteuse pour être utilisée en routine, et dans la plupart des laboratoires, elle n'est utilisée que pour confirmer l'identification obtenue par la microscopie.

Les protozoaires intestinaux

On distingue différents protozoaires intestinaux. Ceux à se rappeler sont le flagellé *Giardia lamblia* et l'amibe *Entamoeba histolytica*, qui cause la dysenterie amibienne et parfois des abcès hépatiques. Il faut noter que ces protozoaires intestinaux peuvent être visualisés à l'examen direct entre lame et lamelle à l'état frais (formes végétatives et kystes). Par ailleurs, après concentration et fixation, il est également possible de visualiser la présence de kystes des diverses amibes. Enfin, il existe des tests rapides permettant la détection de *Giardia lamblia* et d'*Entamoeba histolytica* notamment.

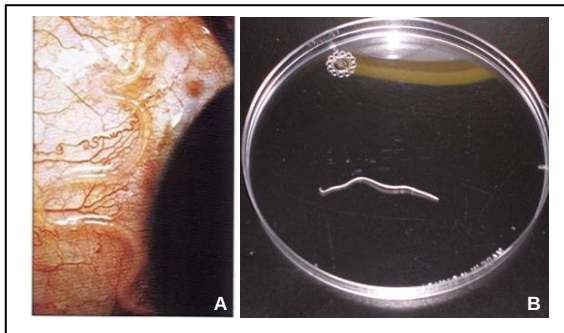
Helminthes

Parmi les helminthes, on distingue les **vers plats** et les **vers ronds**.

Les vers ronds, (némathelminthes) comprennent les nématodes et les filaires. Parmi les nématodes, on a plusieurs vers qui peuvent infecter par voie féco-orale notre tube digestif dont, par exemple, *Ascaris lumbricoides*, qui est un vers rond souvent associé à une hyper-éosinophilie sanguine. Parmi les autres nématodes, citons *Ankylostoma duodenale*, *Necator americanus*, et *Strongyloides stercoralis*, qui sont tous des nématodes intestinaux. Le diagnostic de ces nématodes peut être effectué par la visualisation des œufs (ou des larves pour *S. stercoralis*) au niveau des selles. Il faut noter cependant que la présence des œufs dans les selles ne survient qu'environ 6 semaines à 2 mois après l'infestation, lorsque les larves infestantes se seront développées en adultes capables de pondre. Les autres nématodes comprennent les Oxyures et *Trichuris trichiura*, qui seront discutés plus en détail dans les futures années de médecine.

Les filaires sont également des vers ronds (némathelminthes). Ils peuvent se retrouver dans le tissu sous-cutané (p.ex. *Loa loa*) ou au niveau des vaisseaux lymphatiques.

Figure 5. *Loa loa* sous la conjonctive (panel A) et ver adulte dans un boîte de Petri, après avoir été retiré de la conjonctive (panel B).



Les microfilaires peuvent être visualisées dans le sang, permettant un diagnostic d'espèce grâce à une différenciation en fonction de la présence d'une gaine entourant la microfilarie et de noyaux, terminaux ou non. Les microfilarémies sont variables en fonction de la période du jour, et pour certaines filaires dites "nocturnes", la prise de sang devrait être faite la nuit, alors que pour d'autres filaires (diurnes), elle est préférablement effectuée de jour. Les microfilaires sont bien visualisées sur les frottis par une coloration de Giemsa (Figure 6).

Figure 6 . Présence d'une microfilarie sur le frottin sanguin.



Plathelminthes

Parmi les plathelminthes, on distingue les **trématodes** et les **cestodes**.

Les trématodes comprennent les douves (*Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*), qui peuvent être notamment diagnostiquées par la présence d'œufs dans les selles. La grande douve du foie (*Fasciola hepatica*) a un œuf extrêmement grand et ovalaire. Parmi les trématodes on distingue également les schistosomes, qui peuvent infecter le foie (*Schistosoma mansoni* ou *japonicum*) et dont on peut retrouver les œufs dans les selles, ou peuvent infecter la vessie (*Schistosoma haematobium*) et dont on peut retrouver les œufs au niveau des urines. Les œufs de schistosomes (Figure 7) sont caractérisés par la présence d'un

crochet, qui peut être latéral (*mansoni*, *japonicum*) ou terminal (*haematobium*).

Figure 7 . Œuf de schistosome caractérisés par leur éperon (crochet). Sur cette photo, *S. haematobium* avec son éperon terminal.



Les cestodes comprennent les ténias et les échinocoques. Le *Taenia solium* est le plus grand des ténias (vers solitaire) et peut être acquis par ingestion de viande contaminée de porc. *Taenia saginata* s'acquiert, quant à lui, par l'ingestion de viande contaminée de bœuf.

Les *Taenia* sont des vers plats segmentés, dont les segments sont plus longs que larges, ce qui permet de les différencier du *Diphyllobothrium latum* (un autre cestode) dont les segments (anneaux) sont plus larges que longs (Figure 8). *D. latum* s'acquiert en mangeant du poisson cru infesté.

Figure 8. *D. latum*, vers plat se caractérisant par des anneaux plus larges que longs.



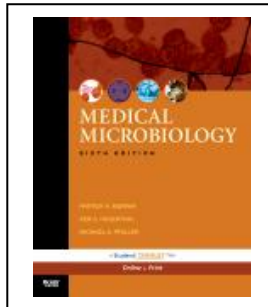
Conclusions

En conclusion, les champignons et les parasites ont des formes très variables et des pathogénicités diverses.

Le diagnostic des infections dues à ces eucaryotes se base souvent sur l'examen macroscopique et/ou microscopique. Les tests immuno- chromatographiques, la PCR et la sérologie sont aussi parfois utiles.

Lecture recommandée:

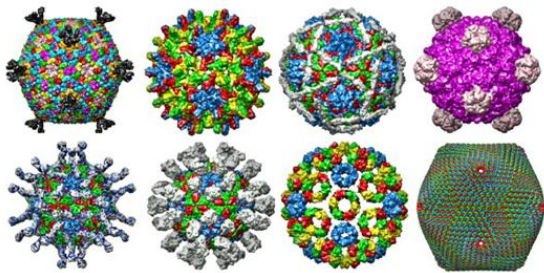
Patrick Murray et al., Medical Microbiology, 6th
Edition, Mosby-Elsevier 2009. Chapter number 7.



B2.2 Sang, immunité, infection

Virologie

Pascal MEYLAN, Nov. 2016



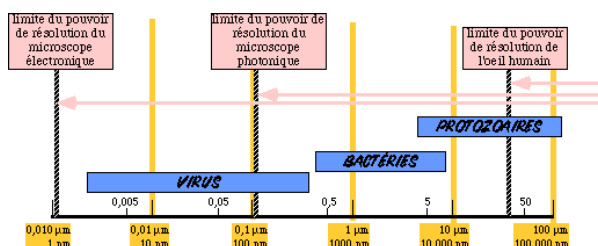
Virus : Du latin « poison, toxine »

Introduction

La microbiologie de la fin du XIX^{ème} siècle a permis la mise en évidence de très nombreux microorganismes bactériens responsables de grandes maladies de l'époque. Toutefois, pour certaines maladies infectieuses comme la rage, la grippe,... aucune bactérie n'a pu être mise en cause : l'agent responsable est plus petit qu'une bactérie, et si petit qu'il ne peut être vu au microscope optique, et qu'il passe à travers de filtres retenant les bactéries. On parle alors de « virus filtrants » (**Figure 1**). Il ne pourra être vu qu'après l'invention du microscope électronique, vers 1934.

Aujourd'hui, les virus représentent un aspect de plus en plus important des maladies infectieuses, et de nouveaux virus émergents sont identifiés chaque année.

Figure 1. Taille relative des virus et des bactéries. Le schéma montre la place des virus dans l'échelle des tailles avec la place des différents instruments permettant de visualiser une particule virale.



Il faut noter aussi que des virus infectent essentiellement toutes les formes de vies cellulaires

(eukaryotes, mais aussi prokaryotes) et jouent des rôles importants dans l'ensemble des écosystèmes !

Objectifs d'apprentissage

Comprendre :

- Définition du virus
- Considérations structurales
- Taxonomie
- Pathogenèse virale
- Bases du diagnostic en virologie

Définition du virus

Un virus peut être défini par 3 caractères fondamentaux:

- Un virus ne contient qu'un seul type d'acide nucléique: ADN ou ARN
- C'est un parasite obligatoire d'une cellule vivante (pas d'information génétique concernant le métabolisme énergétique)
- Structure acellulaire : on parle de particule virale, qui est de petite taille (< 0,3 µm).

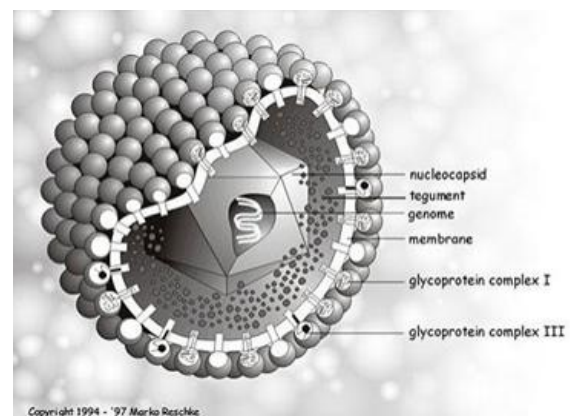
Ces caractères conditionnent les propriétés biologiques et le pouvoir pathogène des virus.

Considérations structurales

Le virion ou la particule virale représente l'unité structurale du virus (**Figure 2**). Le virion peut être défini comme le produit ultime du développement viral, correspondant à une particule virale mature, infectieuse et extracellulaire. Il est constitué de deux éléments constants de structure:

- Le génome viral
- La capside.

Figure 2. Structure d'une particule virale.



Le génome viral

Le génome viral est constitué, soit d'ADN, soit d'ARN. Chez les virus à ADN, l'ADN est en général bicaténaire et linéaire. Chez les virus à ARN, l'ARN est en général monocaténaire et linéaire. L'information codée dans le génome viral est traduite en protéines. Ces protéines sont soit des protéines structurales, soit des protéines non-structurales, qui interviennent lors de la multiplication intracellulaire du virus, mais qui ne sont pas nécessairement incorporées dans le virion. La capacité du génome des virus à coder de l'information est limitée (au maximum 375 kb pour les virus à DNA, 32 kb pour les virus à RNA). Ils doivent donc trouver le moyen de se répliquer et de former des particules infectieuses avec un minimum de gènes.

D'ailleurs, sauf quelques exceptions, il n'existe aucun gène concernant le métabolisme intermédiaire; le virus dépend donc entièrement des cellules hôtes pour sa réplication et sa survie. Les virus ont la capacité de subvertir à leur avantage la machinerie de synthèses cellulaires (protéines, acides nucléiques) de la cellule parasitée pour leur réplication, ce qui aboutit dans de nombreux cas à la destruction de la cellule hôte.

La capsid

C'est une coque protéique qui entoure et protège l'acide nucléique viral. Elle est constituée d'un assemblage de sous-unités répétées. L'assemblage par répétition implique un arrangement symétrique.

L'enveloppe

Pour certains virus, la capsid est entourée d'une enveloppe : on parle de virus enveloppé. L'enveloppe a une double origine, virale et cellulaire : elle est formée par bourgeonnement de la nucléocapsid à travers l'une des membranes cellulaires (membrane plasmique, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique ou membrane nucléaire). Plusieurs (glyco)protéines virales incorporées dans ces membranes sont exprimées ainsi à la surface.

Taxonomie virale

La nomenclature des virus est complexe parce que les noms de virus sont le reflet de sources multiples, parfois en raison de la maladie qu'ils causent (exemple: virus de l'hépatite), parfois en raison de leur mode de transmission (par exemple: arbovirus, arthropode-borne virus) etc. En revanche, la classification et la taxonomie des virus est mieux définie, car elle est basée sur deux éléments clés : le type d'acide nucléique et la présence de l'enveloppe. Contrairement à d'autres types de vie, il n'y a pas

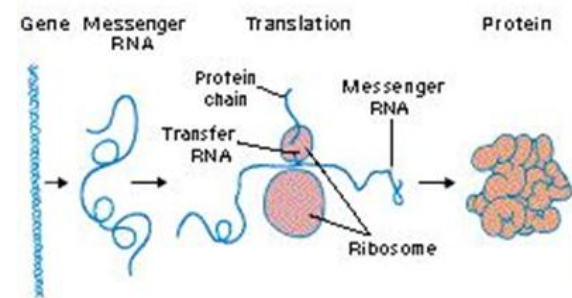
d'arbre phylogénétique formel, parce que nous ne pouvons pas définir un ancêtre commun.

Nature et architecture de l'acide nucléique

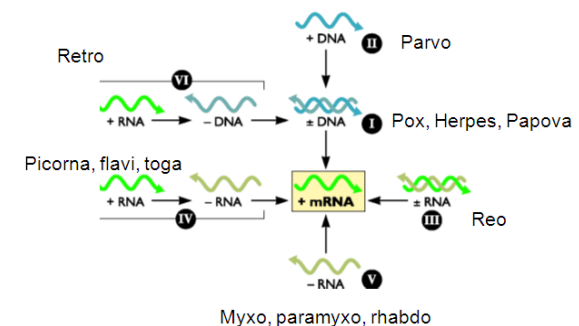
Eucaryotes et procaryotes ont de l'ADN et un procédé pour la production de protéines qui utilise l'ARN messenger (**Figure 3A**). Les virus stockent l'information génétique dans différentes molécules d'acide nucléique : ADN ou ARN, respectivement à chaîne simple ou double: par conséquent, ils suivent de multiples chemins pour transformer l'information génétique en protéines. Cela comprend la possibilité que l'ARN génomique ait la séquence codante pour la protéine (sens), ou sa séquence complémentaire (antisens). Cependant, toutes les sources de matériel génétique du virus doivent converger vers un type d'information qui peut être lu par les ribosomes de la cellule, l'ARN messenger : ces différentes voies de l'information génétique sont une manière importante et fonctionnelle de classer les virus (**Figure 3B**).

Figure 3. Transformation de l'information génétique virale en protéines. A. Parcours dans la cellule. **B.** Stratégies des virus pour générer de l'ARN messenger.

A



B



Présence ou absence d'une enveloppe

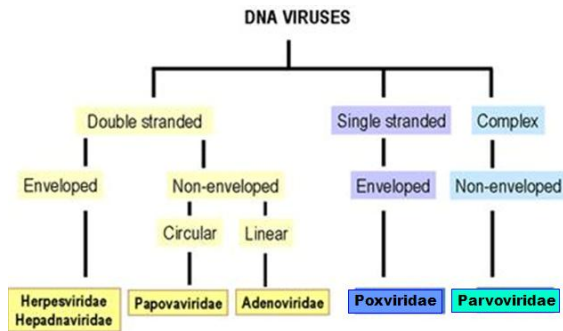
Toujours dérivée d'une membrane cellulaire lors de la morphogenèse (sa composition diffère selon sa provenance : membrane plasmique, rafts, nucléaires). Contient des glycoprotéines virales. Contient des protéines membranaires cellulaires.

Sur la base du type d'acide nucléique, et l'absence ou la présence de l'enveloppe, nous pouvons

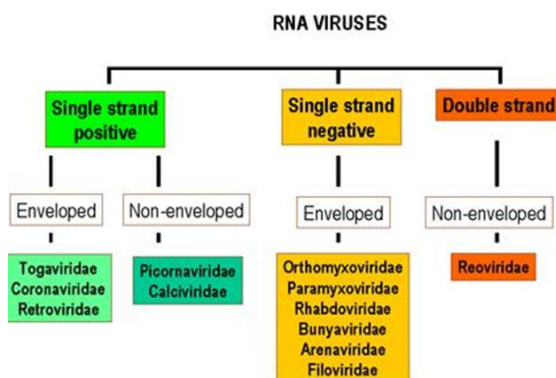
maintenant obtenir la classification des virus (**Figure 4**).

Figure 4. Taxonomie virale. A. Virus à ADN. B. Virus à RNA.

A



B



La pathogenèse virale – l'hôte

Les virus infectent tous les groupes principaux d'organismes : les vertébrés, les invertébrés, les plantes, les champignons, algues et les bactéries. Certains virus ont une gamme d'hôtes plus large que d'autres, mais aucun ne peut traverser la frontière eucaryote/procaryote.

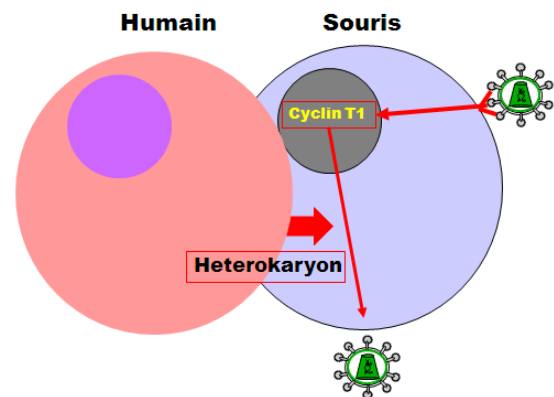
Facteurs qui influencent la gamme d'hôtes :

- le fait que le virus puisse ou non entrer dans la cellule hôte
- si le virus peut entrer dans la cellule, la machinerie cellulaire appropriée est-elle à la disposition du virus pour sa réplication?
- si le virus peut se répliquer, les virus infectieux peuvent-ils sortir de la cellule et disséminer ainsi l'infection?

Types cellulaires qu'un virus peut infecter : « tropisme » du virus (e.g. neurotropisme). Inversement, la cellule dans laquelle un virus peut se répliquer est dite « permissive »

Ces concepts sont représentés dans la **Figure 5**.

Figure 5. Humanisation de la cellule de la souris pour soutenir la réplication virale. Les cellules peuvent être : *Résistantes*: elles ne peuvent pas être infectées car elles sont dépourvues du récepteur pour le virus. *Non permissives*: les cellules présentent des récepteurs pour le virus et sont infectées. Quelques gènes viraux s'expriment, sans aboutir à un cycle de réplication complet: l'infection est abortive. *Permissives*: les cellules présentent des récepteurs pour le virus et sont infectées ; il y a production de nouvelles particules virales infectieuses car il y a développement complet du cycle de multiplication.



A partir de ces déterminants de la susceptibilité à l'infection et de la permissivité naissent les concepts de barrière d'espèce et des zoonoses. Le saut d'agents pathogènes entre les espèces (**Figure 6**), à travers la barrière, peut entraîner une zoonose. Cet événement « rare » de transmission réussie peut se présenter alors comme une maladie émergente – dans certains cas, à potentiel épidémique.

La transmission interhumaine est caractéristique de nombreux processus infectieux, mais n'intervient pas nécessairement après chaque zoonose (**Figure 7**). Elle implique les voies principales suivantes :

- Fécale-orale (souvent à travers l'eau, l'environnement et les aliments) : e.g. poliovirus
- Respiratoire (aérosol-gouttelettes) : e.g. influenza virus
- Intime (contact muqueux ou parentéral) : e.g. HIV

Figure 6. Exemple de zoonose – virus de l'encéphalite équine. Le moustique de type *Culex* s'infecte en se nourrissant sur des oiseaux qui hébergent le virus. Le moustique peut transmettre le virus à d'autres animaux. Parfois, cela implique la transmission accidentelle chez l'homme. La transmission d'humain à humain ne se produit pas.

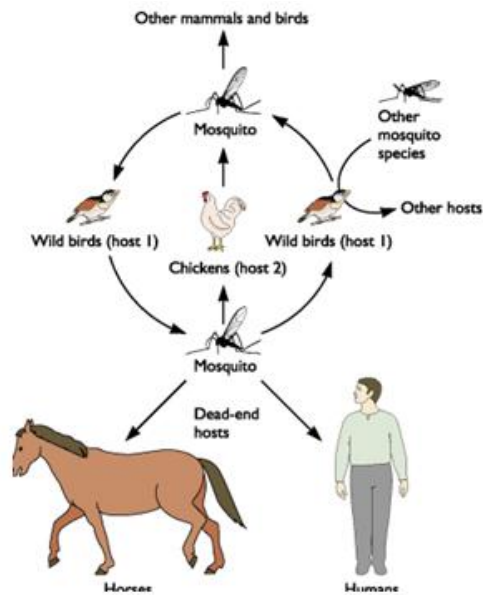
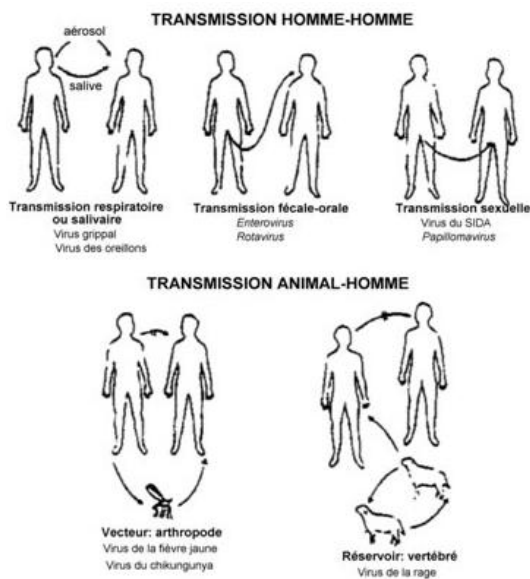


Figure 7. La transmission des infections virales.



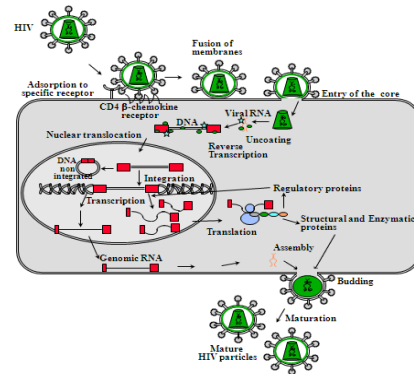
Pathogenèse cellulaire

Le processus infectieux (réplication du virus) peut conduire (ou non, infection asymptomatique) à la pathogenèse et la maladie. On peut définir la pathogenèse comme la somme des anomalies cellulaires résultant de la réplication du virus, allant souvent jusqu'à la mort cellulaire (**Figure 8**).

La réplication virale comprend plusieurs étapes, à partir du moment du contact entre le virus et la cellule jusqu'à la libération des particules infectieuses. Ces étapes sont détaillées ci-dessous.

Par la suite, le processus de pathogénie est établi au niveau de l'organisme (voir plus loin : pathogenèse systémique).

Figure 8. Le cycle viral.



La réplication virale

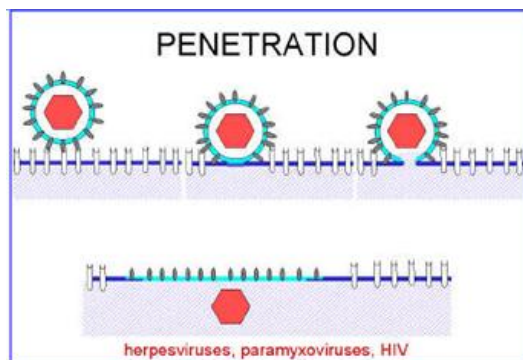
ADSORPTION. Le virus s'attache à la surface de la cellule via des interactions moléculaires. La protéine virale d'attachement reconnaît des récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire (ceux-ci peuvent être des protéines, des hydrates de carbone ou des composants lipidiques de la surface cellulaire). Les cellules qui n'ont pas les récepteurs appropriés ne sont pas susceptibles aux virus.

PENETRATION. Les virus enveloppés entreront par fusion avec la membrane plasmique. Certains virus enveloppés fusionnent directement avec la membrane plasmique (**Figure 9**). D'autres virus enveloppés, incapables de fusionner directement avec la membrane plasmique, requièrent un pH acide pour la fusion. Ces virus sont absorbés par invagination à partir de "puits recouverts de clathrine" dans les endosomes. Comme les endosomes sont acidifiés, l'activité de fusion latente des protéines du virus s'active par la chute du pH, et les membranes du virion et de l'endosome vont fusionner. Cela se traduit par la livraison des composants internes du virus dans le cytoplasme de la cellule.

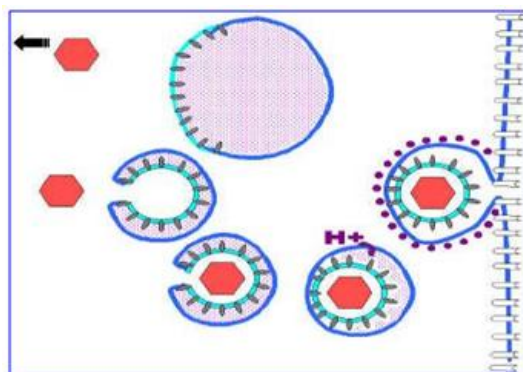
Les virus non-enveloppés peuvent traverser la membrane plasmique directement ou être absorbés par l'intermédiaire d'endosomes.

Figure 9. La pénétration virale. **A.** Entrée par fusion avec la membrane plasmique. **B.** Entrée via des endosomes à la surface de la cellule.

A



B



DESENCAPSIDATION. Les acides nucléiques doivent être suffisamment dénudés pour que la réplication virale puisse commencer à ce stade. Lorsque l'acide nucléique est dénudé, des particules virales infectieuses ne peuvent pas être récupérées à partir de la cellule – c'est le début de la phase d'éclipse, qui dure jusqu'à ce que de nouveaux virions infectieux soient faits. De nombreuses stratégies sont utilisées pour la synthèse des acides nucléiques et les protéines virales.

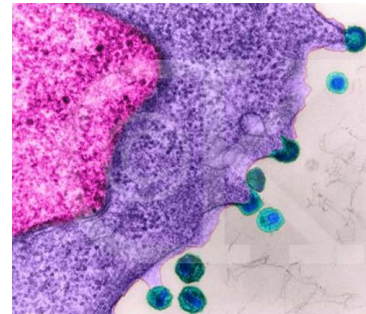
ASSEMBLAGE / MATURATION. De nouvelles particules virales sont assemblées. Il peut y avoir une étape de maturation qui suit le processus initial d'assemblage pour rendre la particule virale infectieuse.

RELACHEMENT. Les virus peuvent être relâchés lors de la lyse cellulaire ou peuvent, s'ils sont enveloppés, bourgeonner à partir de la cellule (**Figure 10**).

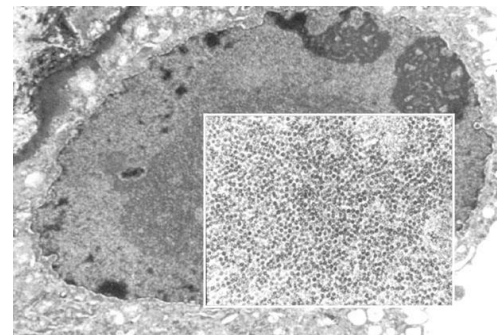
Le processus de relâchement ne va pas nécessairement tuer la cellule. Ainsi, certains virus peuvent être en mesure de mettre en place des infections persistantes. Toutes les particules virales libérées ne sont pas infectieuses. Le rapport infectieux/non-infectieux varie avec le virus et les conditions de croissance.

Figure 10. Le processus de relâchement viral. **A.** Les virus peuvent, s'ils sont enveloppés, bourgeonner à partir de la cellule – ici le bourgeonnement du VIH; **B.** ou être relâchés lors de la lyse cellulaire, ici, l'accumulation massive de particules de polyomavirus dans le noyau de la cellule infectée.

A

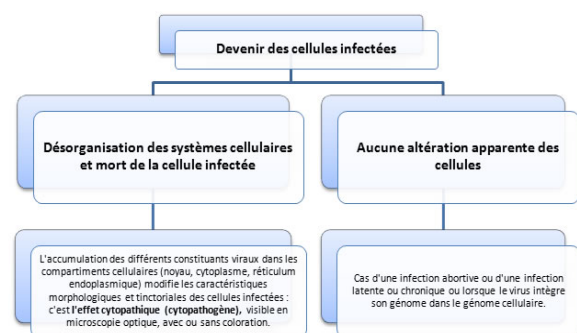


B



Différents devenir d'une infection au niveau cellulaire (Figure 11).

Figure 11. Conséquences cellulaires de la multiplication virale.

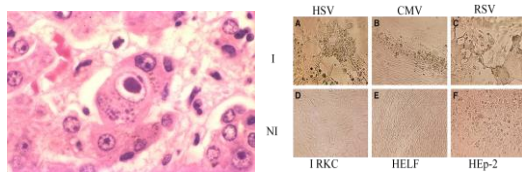


- I. le virus n'arrive pas à infecter la cellule (présence ou absence de récepteur, autres facteurs) : infection abortive
- II. le virus arrive à infecter la cellule
 - introduit son génome, sans l'exprimer (ou seulement minimalement) : **infection latente**
 - introduit son génome, et en l'exprimant (ou seulement minimalement), immortalise

la cellule hôte : infection transformante (**tumorigénèse**)

- introduit son génome, l'exprime, produit du virus sans tuer la cellule : **infection productive chronique**
- introduit son génome, l'exprime, produit du virus en tuant la cellule : **infection productive lytique** avec effet cytopathogène.

L'effet cytopathogène est l'ensemble des anomalies cytologiques causées par la réplication d'un virus. On peut le reconnaître dans un tissu sur une coupe pathologique, ou en culture de cellule in vitro. Il joue donc un rôle important dans le diagnostic des infections virales



A

B

Figure 11bis : Effet cytopathogène (A) in vivo : on observe dans une coupe histologique l'effet cytopathogène de CMV se manifestant par un agrandissement de la cellule, une inclusion nucléaire entourée par une vacuole claire (image en œil de hibou). B. Effet cytopathogène de différents virus en culture de cellule : comparer la rangée du haut avec celle du bas montrant les mêmes lignées cellulaires non infectées.

Pathogenèse systémique

En plus des considérations relatives à la pathogenèse de la cellule infectée, il y a une composante importante de pathogenèse systémique, l'immunopathogenèse : les dommages dus à la réponse immunitaire de l'organisme infectant (**Figure 12**).

La pathogenèse systémique serait aussi influencée par voie de dissémination (hématogène/virémie, flux axonal, etc...) (**Figure 13**) et le tissu cible. La présentation de la maladie (aigüe/persistante/chronique (**Figure 14**)) tiendra compte de ces déterminants. Des interactions moléculaires uniques vont conditionner la mise en place d'infections latentes, ou d'actions transformantes, avec comme résultat des processus cancéreux.

Figure 12. L'équilibre entre la virulence de l'agent pathogène et la pathogenèse est déterminé par la réponse immunitaire.

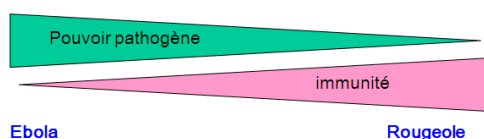


Figure 13. Voies de dissémination chez l'hôte.

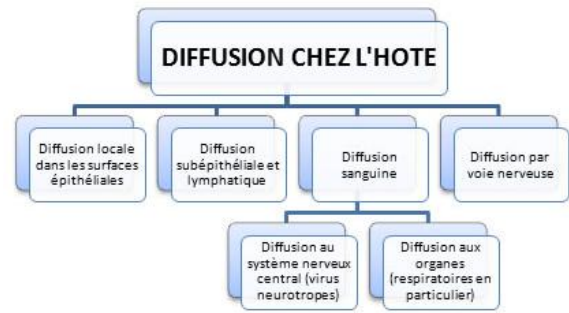
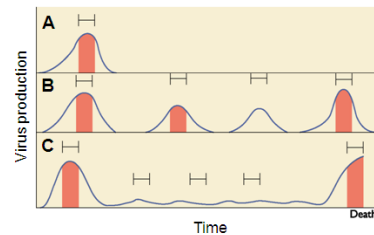


Figure 14. Profil dynamique de l'infection virale. A. Infection aigüe (ex., influenza) ; B. Infection latente avec des épisodes de réactivation (ex., Herpes simplex) ; C. Infection chronique (ex., VIH).



Diagnostic viral

Les virus ne peuvent pas se répliquer en dehors d'une cellule. Par conséquent, leur culture ne peut être effectuée qu'*in vivo*, soit chez l'animal susceptible, soit en culture de cellules. D'autre part, ils entraînent des réponses immunes, en particulier anticorps, qui témoignent spécifiquement de l'infection par un virus.

On distingue donc le diagnostic direct, qui vise à mettre en évidence dans le produit pathologique, la présence d'un virus par la détection du virus cultivable, ou alors la présence de ses antigènes dans un test immunologique utilisant des anticorps dirigés contre ce virus, ou de ses acides nucléiques par une méthode d'amplification, généralement PCR.

On appelle diagnostic indirect la mise en évidence de réponses immunes, en particulier anticorps, par différentes techniques (voir plus bas) ou plus rarement cellulaires (production de cytokines par les lymphocytes du patient exposés à des antigènes viraux)

La figure 15 montre des critères généraux permettant de choisir quelle approche utiliser selon que la phase de la maladie et l'état d'immunocompétence du patient

	Phase de la maladie	État immunitaire de l'hôte
Méthodes directes	Phase précoce de répllication virale	immunocompromis
Méthodes indirectes	Phase tardive, réponse immunitaire	normal

Figure 15. emploi préférentiel du diagnostic direct ou indirect selon la phase de la maladie et l'état immunitaire de l'hôte

D'une manière générale, l'importance des tests diagnostiques en virologie s'accroît. Ils sont nécessaires pour suivre l'épidémiologie de nombreuses maladies importantes (exemples : épidémies de grippe, Ebolavirus, etc). Leur importance augmente du fait de la disponibilité d'antiviraux. Ces derniers étant toujours spécifiques d'une voire quelques espèces de virus, leur emploi nécessite en général un diagnostic spécifique et rapide. Le développement de méthodes moléculaires a facilité et rendu plus rapide le diagnostic viral, qui permet même parfois de lutter contre l'abus d'antibiotiques qui sont inactifs contre ces agents.

Cependant ces tests peuvent poser des problèmes, ainsi la culture virale est parfois lente, et de toute manière compliquée et coûteuse. Les tests parfois sont d'une complexité croissante (e.g. tests

multiplexés, capables de détecter plusieurs pathogènes à la fois), et peuvent nécessiter un avis d'expert pour leur interprétation.

Méthodes de diagnostic direct

Au début du 20^{ème} siècle, alors que certaines maladies virales sont identifiées cliniquement, on ne dispose pour leur diagnostic que de la pathologie (effet cytopathogène en pathologie, voir figure 11b) et de l'inoculation animale. Dans les années 50, l'apparition de la culture cellulaire permet de cultiver des virus *in vitro* (voir figure 11b), puis le développement de l'immunologie et de la biologie moléculaire vont permettre de détecter de plus en plus efficacement la présence de virus dans des produits pathologiques.

A l'heure actuelle, c'est les techniques d'amplification d'acides nucléiques, par leur spécificité pour la séquence désirée et leur extrême sensibilité (capacité à détecter une molécule d'un acide nucléique de séquence donnée) qui représentent l'outil le plus important de diagnostic en virologie. En plus certains formats d'amplification permettent une mesure quantitative de la charge de virus, une information qu'on peut traduire en probabilité de maladie, ou d'évaluation de l'efficacité d'un traitement. Il faut noter cependant que ces méthodes sont tellement sensibles qu'elles exposent au risque de faux positif par contamination, soit lors du prélèvement, soit durant la manipulation au laboratoire.

Choix du prélèvement

Le type et le lieu de prélèvement sont des éléments importants qui vont conditionner le rendement du test diagnostique. Concernant le type de prélèvement, en principe tous les liquides biologiques (sang sérum, LCR, humeur aqueuse ou vitreuse etc) sont adéquats. On peut aussi soumettre des frottis, à la condition que l'écouvillon et le milieu de transport n'interfère pas avec la détection de virus (e.g. écouvillon au charbon actif, ou milieux à l'agar utilisés en bactériologie sont inadéquats pour la virologie). Concernant le lieu de prélèvement, d'une part, la littérature indique ce qui se fait et ce qui ne se fait pas. D'autre part, connaître la pathogenèse, voire le tropisme de certains virus procure une base rationnelle pour choisir un mode de prélèvement.

Exemple 1 : prélèvement pour détecter un virus respiratoire (e.g. influenza virus) : Il se réplique dans l'épithélium respiratoire (cylindrique cilié) qui tapisse les fosses nasales (en arrière du vestibule nasal), une partie du rhinopharynx, et les voies respiratoires dès le larynx. Par conséquent les prélèvements adéquats seront le frottis nasal (à condition qu'il soit assez profond : à l'horizontale,

plus de 5 cm depuis l'orifice de la narine, voire figure 16), l'expectoration ou le lavage alvéolaire.

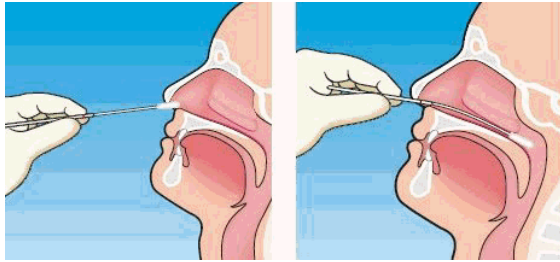


Figure 16 : à gauche : frottis de la narine, on frotte un épithélium kératinisé, adéquat pour rechercher la colonisation par Sta. Doré. A droite : frottis profond on frotte un épithélium respiratoire, adéquat pour rechercher un virus de ce système

Exemple 2 : Poliomyélite : causée par poliovirus, un entérovirus à transmission fécale-orale. Après ingestion, le virus se réplique dans le tube digestif, d'où il dissémine par voie hématogène pour se multiplier dans les méninges voire la substance grise du SNC (figure 17)

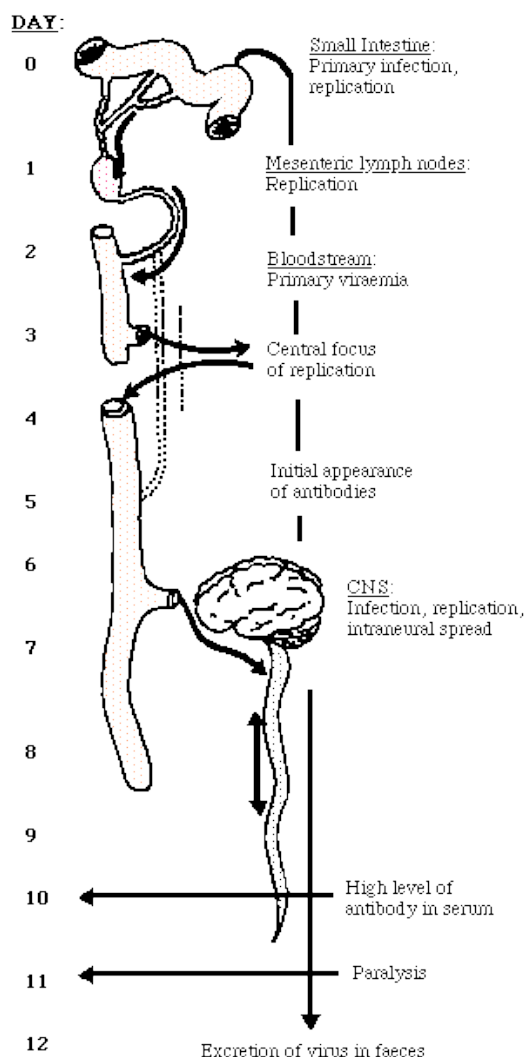


Figure 17 : pathogenèse de la poliomyélite

Il s'ensuit qu'à la phase aiguë de la maladie, on peut détecter le virus dans le sang puis le LCR. Ensuite, il est neutralisé par les anticorps dans ces liquides, et on ne peut plus le détecter dans les semaines qui suivent que dans les selles.

En clinique, le diagnostic direct joue un rôle important dans les circonstances suivantes :

- Apporter la preuve de l'origine virale des signes cliniques observés, diagnostiquer le virus en cause (ex: hépatites, herpès),
- Suivre l'évolution biologique de l'infection (ex: VIH, Hépatite B),
- Permettre une décision thérapeutique et juger de l'efficacité des traitements antiviraux (ex: traitement d'une infection à cytomégalovirus par ganciclovir),
- Prévenir la transmission d'infections virales à l'occasion du don de sang, d'organes et de tissus,

Attention, il existe des infections asymptomatiques, et la démonstration de la présence d'un virus ne permet pas toujours de lui attribuer les signes et symptômes du patient.

Méthodes de diagnostic indirect

En principe, il s'agit de mettre en évidence dans le sérum, voire parfois le LCR des patients, des anticorps spécifiques d'un antigène viral. Pour mettre en évidence la liaison antigène/anticorps, a priori invisible, il faut utiliser différents trucs :

Mettre les antigènes à la surface de particules (globules rouges, bille de latex). L'agglutination de ces particules par les anticorps sera visible à l'œil nu, jusqu'à une certaine dilution du serum qui sera le titre en anticorps correspondant de ce serum.

On peut également utiliser des anticorps-anti-anticorps marqués par des enzymes ou des fluorophores pour détecter les anticorps spécifiques qui se lient à un antigène viral. Différentes techniques sont utilisées : ELISA, agglutination, Western blot et immunoblot. L'ELISA est devenue la technique la plus utilisée (**Figure 18**) car elle est rapide, simple, spécifique et adaptable sur automate.

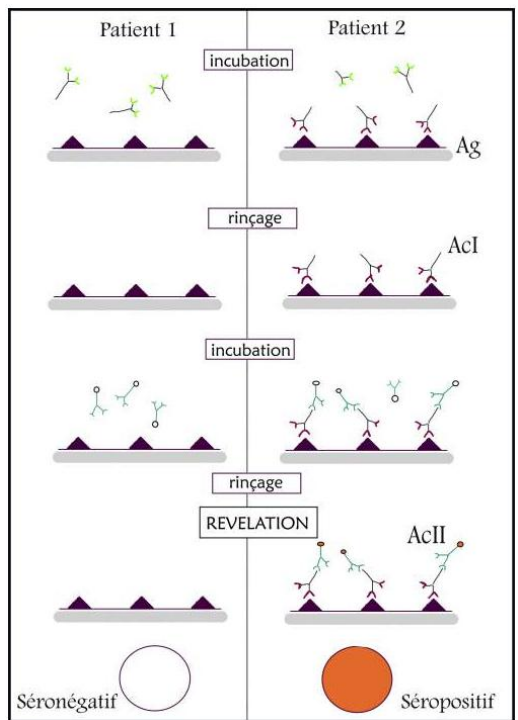


Figure 18. Technique ELISA. A. Une plaque de 96 puits est généralement utilisée pour tester un grand nombre d'échantillons simultanément. Au fond de ces puits, des antigènes viraux sont fixés (Ag, triangles violets). Le sérum du patient est versé dans les puits. Des anticorps dirigés contre l'antigène (AcI) sont présents dans le sérum du patient 2. Ceux-ci reconnaissent les antigènes accrochés au fond du tube. Au rincage, ils y restent fixés ! Lors de l'ajout des anticorps secondaires (AcII), ceux-ci s'accrochent aux premiers anticorps et ne partent pas au lavage. Enfin, la dernière opération, qui active les molécules de couleur, révèle que des anticorps secondaires sont restés dans le puit. Il y a une coloration du tube, le patient est séropositif.

Les réponses anticorps lors d'une infection ont un certain cours, qui dépend aussi du cours de la réplication du virus lors des phases de la maladie (voir plus haut figure 14).

Les tests sérologiques sont dessinés de manière à détecter les différentes classes d'immunoglobulines : IgM (généralement les premières à apparaître), IgG (les plus durables), IgA, anticorps de sécrétion qui apparaissent parfois aussi dans le sérum.

La figure 19 montre le cours des réponses anticorps lors d'une infection par un virus capable de causer une infection aiguë, primaire, d'établir une latence, puis de réactiver (c'est le cas de la famille des herpes virus)

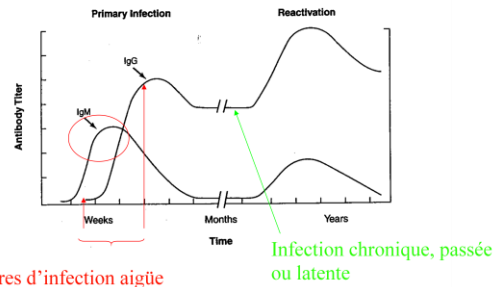


Figure 19 : cours des réponses anticorps lors d'une infection par un virus établissant une infection latente avec une réactivation (un cours similaire serait observé dans le cas de deux infections successives par un virus comme celui de la grippe, à condition que la première infection ne laisse pas une immunité suffisante)

La figure laisse deviner ce qui peut servir de critère d'infection aiguë : documentation de l'apparition d'anticorps IgM ou IgG entre un sérum prélevé avant ou au début de la maladie et un sérum plus tardif. Une augmentation significative du titre des IgG (règle du pouce : d'un facteur ≥ 4) ne permet pas de distinguer entre une infection primaire un peu plus avancée et une réinfection. La réapparition d'IgM chez un individu déjà connu pour être séropositif parle pour une réactivation ou une réinfection selon le virus considéré.

A noter cependant que généralement, la spécificité des tests détectant des IgM est inférieure à celle des tests d'IgG : il faut donc avec ces tests plus se méfier de faux positifs.

Ceci amène à remarquer que l'emploi des tests diagnostiques doit être dirigé par le savoir clinique : ce dernier doit indiquer quelles sont les infections vraisemblables chez un patient, qui méritent un test diagnostique. En complément, il faut connaître les performances diagnostiques des tests : sensibilité (taux de tests positifs chez les patients présentant la maladie) et spécificité (taux de tests négatifs chez des patients ne présentant pas la maladie). Les tests étant très généralement plus ou moins imparfaits, un test négatif n'exclut pas forcément un diagnostic, et un test positif risque d'être un faux positif, d'autant plus si la probabilité a priori d'une maladie était basse.

En clinique, le diagnostic indirect joue un rôle important dans les circonstances suivantes :

- Détection d'infection latente (e.g. virus du groupe herpes)
- Diagnostic rétrospectif d'infection passée la phase aiguë, d'autant plus si cette dernière peut être asymptomatique
- Virus non- ou difficiles à cultiver (e.g. EBV, HAV, rubéole, arbovirus)
- Détermination de l'immunité à certains virus (suite à infection ou vaccination)
- Études séroépidémiologiques

Conclusions

La virologie est un domaine d'intérêt croissant. Les virus infectent universellement les pro- et les eukaryotes. Ils sont associés à de nombreuses maladies – y compris des infections émergentes (e.g. Ebola virus et la grippe pandémique). Les examens virologiques deviennent particulièrement contributifs grâce au développement de nouvelles techniques rapides, sensibles et spécifiques. Il faut souligner la nécessité de contacts entre cliniciens et biologistes pour orienter le choix des examens, cibler les recherches selon chaque pathologie observée, et adapter les traitements.

Illustrations et autres sources

<http://www.microbiologie-medecale.fr/virologie/generalitesvirus.htm>

http://www.techmicrobio.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=117&Itemid=157&ad35eba78c3fd38e4ae385bf4ca6fcd3b=1d379f7f318311dafb3f656e624bf4bb

<http://axiomcafe.fr/test-elisa>

<http://www.microbe-edu.org/etudiant/diagnostique.html>

B2.2 Sang, immunité, infection

Epidémiologie des maladies infectieuses

G. ZANETTI, Nov. 2016

Introduction

L'épidémiologie des maladies infectieuses se distingue de celle des autres chapitres de la médecine par plusieurs aspects :

- L'étude des facteurs de risque est compliquée par la notion de transmissibilité. Une personne infectée peut en effet représenter un facteur de risque pour une autre personne. Parfois, cela peut même être inapparent dans le cas d'infections sans manifestation clinique, ou de ce que nous appellerons plus loin *colonisation*.
- La susceptibilité d'une personne à une infection est déterminée non seulement par des facteurs innés, mais par une immunité acquise qui peut fluctuer au cours de la vie. Le contact avec certains pathogènes peut ainsi conférer une protection transitoire ou définitive, partielle ou complète; il en va de même des vaccinations.
- Il s'agit d'une épidémiologie très instable du fait de l'évolution des pathogènes et des variations des interactions entre ces pathogènes et les hôtes qu'ils infectent.

Ces caractéristiques des maladies infectieuses imposent le recours à des concepts épidémiologiques spécifiques qui seront exposés dans ce chapitre.

Importance des infections dans le paysage sanitaire

Les maladies infectieuses ont constamment marqué et influencé l'histoire par l'impact qu'elles ont exercé à large échelle sur la santé des populations. Certaines sont ainsi restées emblématiques des grandes époques historiques, comme la lèpre au Moyen-âge, la peste durant les Temps modernes, puis la tuberculose au début de l'Epoque contemporaine.

Au XX^{ème} siècle, les progrès de l'hygiène puis des traitements anti-infectieux et des vaccinations ont permis un recul spectaculaire des maladies infectieuses, comme l'illustre la figure 1. Dans cette figure, les principales causes de mortalité aux Etats-

Unis sont représentées pour les années 1900 (figure 1a) et 1997 (figure 1b). Les causes infectieuses sont représentées en bleu, les autres en rouge.

Figure 1.a

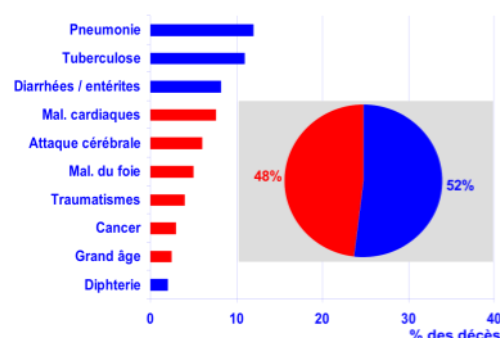
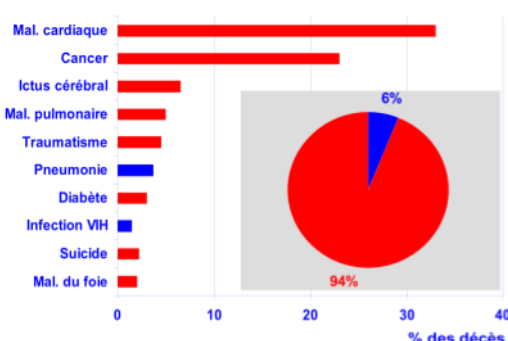


Figure 1.b



Sur ces bases, certains ont même annoncé l'avènement d'une victoire complète et définitive sur les microbes. Cet optimisme c'est pourtant avéré injustifié pour plusieurs raisons :

- Les infections restent le principal problème sanitaire des pays à faible revenu. Elles y représentent la première cause de décès (figure 2), ce qui les amène à être la deuxième cause de décès au niveau mondial (figure 3). La malaria, le sida et la tuberculose sont des maladies qui ont le plus de poids dans cette statistique.

Figure 2. Causes de décès dans le monde en fonction du revenu national (Global burden of diseases, Organisation Mondiale de la Santé 2004).

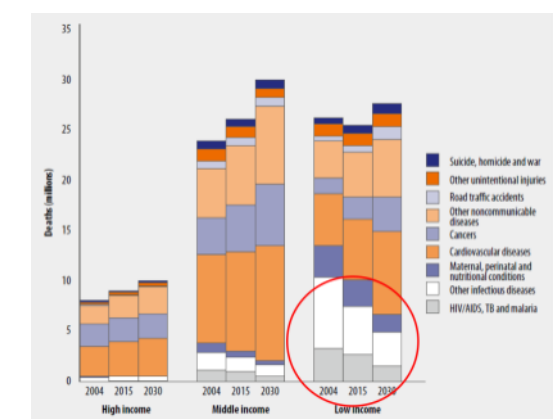
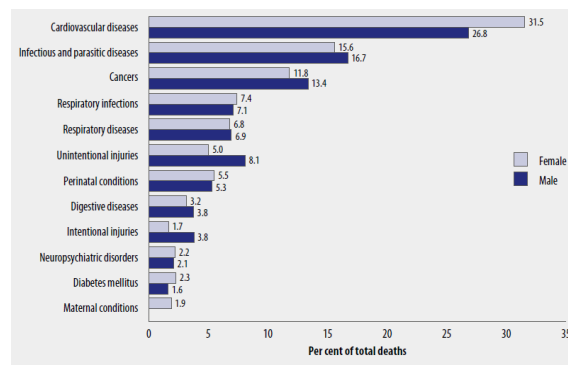


Figure 3. Principales causes de décès dans le monde (Global burden of diseases, Organisation Mondiale de la Santé 2004).



- Si les infections n'appartiennent plus aux principales causes de mortalité dans les pays riches, elles n'y restent pas moins une cause importante de morbidité. Elles représentent en effet 20% des consultations d'un médecin généraliste, 30% de celles d'un pédiatre et 10% des causes d'hospitalisation.
- L'épidémiologie des infections change constamment. A l'évolution des microbes et de leurs *réservoirs* (cf. définition plus bas) s'ajoute une série de facteurs susceptibles de catalyser des fluctuations épidémiologiques. Les principaux de ces facteurs, ainsi que des exemples (pour information) qui en illustrent le rôle, sont répertoriés dans la Table 1.
L'évolution de nos sociétés fait que la convergence de ces différents facteurs est aujourd'hui plus vraisemblable qu'auparavant, et tend à avoir des conséquences à plus large échelle.

Table 1. Principaux facteurs influençant l'évolution épidémiologique des infections au cours du temps.

Facteur influent	Exemples
Voyages, migrations	Dissémination mondiale du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) en 2003
Commerce	Importation de denrées alimentaires et gastroentérites épidémiques
Démographie	Vieillesse et incidence des pneumonies
Mœurs	Révolution sexuelle et infections sexuellement transmissibles
Changements climatiques	Réchauffement et extension de maladies transmises par des moustiques (par ex. la dengue)
Pauvreté, précarité	Conflits armés et typhus épidémique
Elevage industriel	Grippe aviaire
Industrie alimentaire	Fabrication de fromages et épidémie de listériose
Technologie	Air conditionné et légionellose; soins et infections nosocomiales
Utilisation d'anti-infectieux	Bactéries résistantes aux anti-biotiques

Infections émergentes

Ce concept traduit l'instabilité de l'épidémiologie infectieuse dans son aspect le plus extrême. On appelle infections émergentes celles qui apparaissent *de novo*, ou qui réapparaissent après une période de faible incidence, ou encore celles dont la distribution géographique s'étend.

Les infections émergentes résultent d'une évolution des microbes et/ou de leurs *vecteurs* (cf. définition plus loin) et/ou des facteurs influents cités plus haut. A titre d'exemple, la Table 2 décrit les conditions qui amènent généralement à l'émergence d'une nouvelle infection virale. Ces circonstances ont permis, entre autres, l'émergence du syndrome respiratoire aigu sévère (Figure 4), ou des pandémies de grippe ou de SIDA. A cela s'ajoute chaque année une multitude d'exemples moins spectaculaires. On comprend ainsi l'emprise que peut prendre le monde microbien à tout moment, de façon brusque et inattendue.

Il n'est donc pas surprenant qu'après la période d'optimisme citée plus haut, le prix Nobel 1958 de physiologie et médecine Joshua Lederberg ait pu écrire en 1988 "Nous avons trop l'illusion de pouvoir maîtriser les microbes, qui restent nos derniers concurrents pour la domination de la planète".

Table 2. Circonstances cumulatives habituelles permettant l'émergence d'une nouvelle infection virale

- Existence d'un virus parent dans un réservoir animal.
- Evolution de ce virus le rendant capable d'infecter l'homme.
- Exposition de l'homme au réservoir animal.
- Absence d'immunité protectrice dans l'espèce humaine.
- Transmissibilité de personne à personne.

Figure 4. Exemple du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS)

Cette infection respiratoire grave, mortelle dans 10% des cas, a été causée par une nouvelle variété de *Coronavirus* dont le réservoir n'a pu être identifié. Il pourrait s'agir de chauves-souris. C'est probablement parce que le virus a ensuite infecté de petits mammifères vendus sur les marchés chinois, comme la civette, qu'il s'est ensuite transmis à l'homme. Transmissible de personne à personne, il a causé en fin 2002 en Chine une épidémie gardée secrète, jusqu'à ce qu'un patient chinois se rende à Hong-Kong en février 2003. A partir de ce seul cas, la maladie s'est répandue très rapidement sur plusieurs continents, touchant en trois mois plus de 8'000 personnes, dont 800 env. sont décédées.

La caractéristique qui a empêché le nouveau virus de causer une pandémie extrêmement grave est le fait que toutes les personnes contagieuses étaient symptomatiques et donc identifiables. Cela a permis d'enrayer la dissémination par des mesures d'*isolement* et de *quarantaine* (cf. définitions plus bas).

Interaction entre le microbe et son hôte : concepts épidémiologiques de base

Concepts servant à décrire les contacts entre microbe et hôte

- **Réservoir** : Habitat naturel d'un microbe, c'est à dire niche écologique où il est naturellement présent et capable de se multiplier et d'avoir une activité métabolique.
Selon les microbes, le réservoir peut être environnemental (eau, terre, végétaux, ...) ou animal (y compris humain).
Pour éradiquer complètement l'infection causée par un microbe, il faut contrôler le réservoir de ce dernier. Cela s'est produit dans le passé avec le virus de la variole grâce à la vaccination des humains qui en sont le seul réservoir. Le même résultat pourrait être atteint pour d'autres maladies dont le réservoir est strictement humain et pour lesquels il existe un vaccin protecteur, telles que la rougeole ou l'hépatite B.
- **Source** : Endroit à partir duquel un micro-organisme se transmet à un hôte.
La source peut être différente du réservoir (p. ex. réservoir animal, source alimentaire). Elle doit être contrôlée pour stopper une épidémie
- **Exposition** : Contact avec une source de micro-organisme.

Conséquences possibles d'une exposition à un microbe :

Elles sont diverses, et imposent l'utilisation de définitions supplémentaires.

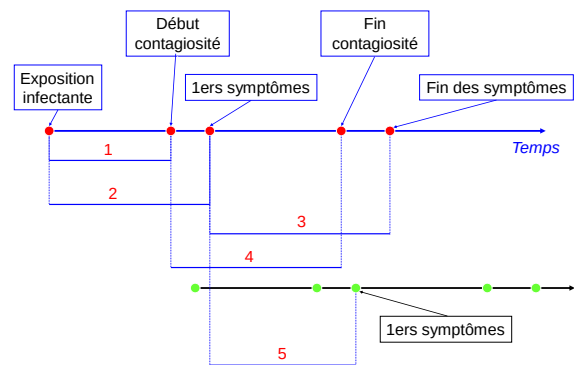
- **Infection** : Invasion d'un organisme par un microbe, entraînant généralement une réponse (p.ex. inflammatoire) de la part de l'organisme. L'infection provoque le plus souvent des manifestations cliniques ; mais certaines infections peuvent rester inapparentes, même si elles entraînent des dommages dans l'organisme.
On appelle *portage* le cas particulier où une infection n'entraîne aucun dommage de l'organisme.
Ainsi une infection causée par le virus de l'hépatite B peut-elle provoquer des dommages cliniquement manifestes (p. ex. une hépatite aiguë, souvent caractérisée par une jaunisse), des dommages sans manifestation clinique (p. ex. une hépatite chronique, qui peut suivre la phase aiguë et provoquer une altération progressive du foie restant inapparente jusqu'au stade tardif), ou un portage (multiplication chronique du virus entraînant une réponse immunologique, mais aucune altération hépatique).

- **Colonisation** : Présence et multiplication de microbes sur la peau ou sur les muqueuses, sans invasion et sans réaction inflammatoire ni immunologique de l'hôte. La colonisation par un microbe donné peut être transitoire ou stable.
- **Microbe pathogène** : Microbe capable de provoquer une infection chez un hôte réceptif. Cette capacité dépend des facteurs de virulence intrinsèques du microbe, de sa quantité (appelé *inoculum*) et des défenses de l'hôte. Il existe ainsi des microbes toujours associés à des infections et appelés pour cela pathogènes stricts; d'autres ne sont pathogènes que lorsque les défenses de l'hôte sont altérées, et sont pour cela appelés pathogènes opportunistes. C'est en particulier le cas de plusieurs microbes colonisants, qui ne deviennent pathogènes que dans des circonstances leur permettant d'envahir les tissus, telles qu'une effraction de la peau ou des muqueuses. Bon nombre d'infections sont ainsi précédées d'une colonisation par le microbe responsable.

Périodes décrivant une infection :

Il s'agit là de concepts permettant de décrire la chronologie qui caractérise une infection. Ces diverses périodes sont illustrées par la Figure 5.

Figure 5.



1. Période de latence : temps écoulé entre l'exposition infectante et le début de la contagiosité.
2. Période d'incubation : temps écoulé entre l'exposition infectante et le début des symptômes.
3. Maladie clinique : temps écoulé entre le début et la fin des symptômes.
4. Période de contagiosité : temps écoulé entre le moment où la personne devient contagieuse et celui où elle ne l'est plus.
5. Temps de génération : lorsqu'une personne A transmet une infection à une personne B, il s'agit du temps écoulé entre l'apparition des premiers symptômes chez A et l'apparition des premiers symptômes chez B.

Il est important de noter que, selon les infections, la contagiosité peut débuter avant, avec, ou après la maladie, et qu'elle peut se terminer avant, avec, ou

après cette dernière. La chronologie représentée par la Figure 5 n'est donc à cet égard qu'un exemple.

Transmission :

L'être humain, comme tous les animaux, naît normalement exempt de tout microbe. Il doit donc y avoir une transmission de microbes à l'origine de toute colonisation ou infection. Selon le microbe en question, la transmission se produit par exposition à l'une ou plusieurs des sources suivantes :

- Source environnementale
- Source animale (autre qu'humaine) : les infections qui se transmettent exclusivement de cette manière sont nommées *antropozoonoses*.
- Source humaine : les infections qui se transmettent de cette manière sont dites contagieuses.

Les diverses modalités d'exposition à une source de microbe ont conduit à la description d'une multitude de *voies de transmission* (Table 3). Cependant, il est utile de réduire toutes ces voies à seulement 3 *mécanismes de transmission* :

- Transmission par contact : il s'agit du mécanisme le plus fréquent. On le subdivise en
Contact direct : On placera dans cette catégorie des circonstances aussi variées que des contacts cutanés (p. ex. transmission de *Staphylococcus aureus* d'une personne à une autre), des contacts sexuels, etc.
Contact indirect : Ce mécanisme décrit des circonstances dans lesquelles une étape intermédiaire entre la source et l'hôte est assurée par un objet (que l'on nomme alors *véhicule* : p. ex. une seringue échangée qui transmettrait le virus du SIDA entre deux personnes) ou par un animal, en particulier des moustiques ou des arthropodes (que l'on appelle alors des *vecteurs* : p. ex. les anophèles qui transmettent le parasite responsable de la malaria).
- Transmission par aérosol : On appelle aérosols des particules de petit diamètre (généralement inférieur à 5 µm) qui leur permet de rester en suspension dans l'air. Ils sont par exemple émis par les voies respiratoires à l'occasion de l'éternuement, de la toux ou de la parole. Ils peuvent ainsi infecter un hôte à distance, à la faveur de la circulation de l'air, aussi longtemps qu'ils restent en suspension. Les infections qui se transmettent de cette façon de personne à personne sont principalement la tuberculose, la rougeole et la varicelle.
- Transmission par gouttelettes : c'est le mécanisme de transmission de la majorité des infections respiratoires. Les gouttelettes sont

également des particules émises par les voies respiratoires, mais de plus grands diamètres que les aérosols. En effet, aussi bien l'éternuement que la toux ou la parole engendrent, à différents degrés d'intensité, l'émission de particules de divers diamètres. Celles dont le diamètre est supérieur à env. 5 µm ne peuvent rester en suspension et se déposent à 1-2 m. de la source qui les a émises. On peut donc acquérir les microbes portés par des gouttelettes soit en les inhalant (dans un rayon 1-2 m. autour de la personne qui les produit), soit par contact si les gouttelettes se sont déposées sur la peau (contact direct) ou sur une surface inerte que l'on touche (contact indirect). On en déduit que la transmission par gouttelettes conjugue un risque de transmission aérienne et un risque de transmission par contact.

Il faut encore relever que pour qu'un véhicule serve de support à une transmission par contact indirect (impliquant ou non des gouttelettes), il faut que le microbe reste viable sur sa surface. Cette propriété varie beaucoup d'un microbe à l'autre et en fonction des conditions de température et d'hygrométrie, ce qui conditionne la transmissibilité. La Table 4 en donne quelques exemples, à considérer comme des ordres de grandeurs (pour information).

Table 3. Voies de transmission et mécanismes

Voies de transmission	Mécanismes de transmission
▪ de personne à personne ✓ contact cutané ✓ contact avec des sécrétions ✓ contact avec du sang ✓ contact sexuel ✓ voie transplacentaire ✓ transplantation ✓ ... ▪ aérienne (<i>air-borne</i>) ▪ eau (<i>water-borne</i>) ▪ aliments (<i>food-borne</i>) ▪ vertébrés (<i>zoonoses</i>) ▪ vecteurs (<i>vector-borne</i>) ▪ objets	▪ contact ✓ direct ✓ indirect ▪ gouttelettes ▪ aérosols

Table 4. Exemples de survie de quelques microbes sur des surfaces inertes (ordres de grandeur, pour information).

Virus hépatite B	≥ 7 jours
VIH	2-4 heures
Méningocoque	≤ 2 heures
Respiratory Syncytial Virus	~ 6 heures
Spores de <i>Clostridium difficile</i>	plusieurs mois
<i>Staphylococcus aureus</i>	plusieurs semaines ou mois
Virus influenza	1 – 2 jours

Relevons pour terminer que certains microbes ne se transmettent qu'au moyen d'un seul mécanisme,

alors que d'autres peuvent en utiliser plusieurs selon les circonstances.

Interaction entre microbes et populations

Un microbe peut se répandre dans une population soit parce que les membres de celle-ci l'acquièrent à partir d'une source ponctuelle, soit parce qu'ils se le transmettent de personne à personne, soit encore par une combinaison de ces deux possibilités.

Pour modéliser la propagation d'un microbe, il faut donc tenir compte d'un grand nombre de paramètres relatifs au microbe lui-même et à la population, et même du hasard pouvant influencer l'interaction entre les deux. De tels modèles, dits probabilistes, sont trop complexes pour être abordés ici. En revanche, certains concepts permettent d'élaborer des modèles plus simples appelés modèles déterministes, qui offrent une bonne approche de l'interaction entre un microbe et une population. Ces concepts sont :

- *Le taux d'attaque* : Proportion de cas d'infection parmi les personnes susceptibles exposées. En voici quelques exemples (ordre de grandeur) : 80% pour la rougeole, 70% pour la varicelle, 5 à 10% pour la grippe saisonnière, 0,1 à 3% pour le virus du SIDA lors de relations sexuelles (mais env. 100% lors de transfusions avec du sang contaminé).

- *R_0 ou nombre répliatif de base (basic reproductive number)* : Il s'agit du nombre moyen de cas secondaires générés par un cas primaire dans une population entièrement susceptible.

Les composantes qui déterminent R_0 permettent de le décrire par l'équation suivante :

$$R_0 = \text{Nbre d'expositions par unité de temps} \times \text{Probabilité de transmission par exposition} \times \text{Durée de la contagiosité}$$

On remarque que le deuxième terme de cette équation n'est autre que le taux d'attaque.

Quelques ordres de grandeurs pour R_0 : 10 à 20 pour la rougeole, 4 à 10 pour la varicelle, 1,8 à 2,5 pour la grippe saisonnière.

- *R_e ou nombre répliatif effectif (effective reproductive number)* : Il s'agit du nombre moyen de cas secondaires générés par un cas primaire. En effet, R_0 ne suffit pas à décrire la cinétique de transmission puisqu'une population n'est généralement pas entièrement susceptible à un microbe donné. Si l'on prend l'exemple d'un microbe qui induit une immunité protectrice, une partie de la population est protégée contre l'infection qu'il provoque si elle a déjà été infectée dans le passé, ou si elle a été vaccinée; de plus, cette portion protégée de la population

s'accroît au fur et à mesure que l'infection se répand.

On définit donc R_e de la manière suivante :

$$R_e = R_0 \times \text{Proportion de contacts susceptibles}$$

- *R_e et évolution d'une épidémie* :
Si $R_e \geq 1$: une épidémie (cf. définition plus bas) se développe car la transmission se caractérise par une amplification.
Si $R_e = 1$: on est en situation d'équilibre; une épidémie ne peut se développer. Si la valeur de 1 est atteinte alors qu'une épidémie est déjà en cours, cette épidémie reste à niveau constant.
Si $R_e < 1$: une épidémie ne peut se déclarer; si une épidémie est déjà en cours, elle se résorbe.
- *Immunité de troupeau (herd immunity)* : Dans une population, on appelle ainsi la proportion p de personnes immunes qui suffit à prévenir l'apparition d'une épidémie. En présence d'une immunité de troupeau contre une infection donnée, quelques cas d'infection peuvent survenir, mais ils restent sporadiques. On peut démontrer que cette condition est remplie si : $p \geq 1 - 1/R_0$ (cf Figure 6).

Figure 6 : Démonstration du seuil p de l'immunité de troupeau.

$$\begin{aligned} R_e &\leq 1 \Rightarrow R_0 \times s \leq 1 \\ R_0 \times (1 - p) &\leq 1 \\ R_0 - (R_0 \times p) &\leq 1 \\ 1 - p &\leq 1/R_0 \\ p &\geq 1 - 1/R_0 \end{aligned}$$

Exemple de la rougeole

La rougeole est une maladie causée par un virus dont le réservoir est exclusivement humain, et qui se transmet par gouttelettes et par aérosols. Il s'agit d'une maladie extrêmement contagieuse (cf. taux d'attaque env. 80%). Pourtant, l'existence d'un vaccin protecteur dans plus de 95 % des cas après l'administration de 2 doses permet d'envisager l'éradication de cette maladie responsable d'une mortalité et d'une morbidité importante chez les enfants. Mais alors que la rougeole a pu être éliminée du continent Nord-Américain, l'Organisation Mondiale de la Santé n'a pas réussi à atteindre le but qu'elle s'était fixé de l'éliminer d'Europe en 2010. La Suisse contribue fortement à cet échec puisqu'on y observe régulièrement des épidémies de rougeole. Cela est dû au fait que moins de 80% des Suisses ont reçu une vaccination complète. Or, si l'on prend pour la rougeole une valeur de R_0 de 15 et que l'on applique l'équation définissant le seuil d'une immunité de troupeau, on peut déduire qu'il faudrait que 93% de la population soit immune pour empêcher que des épidémies se déclarent en Suisse.

Epidémiologie d'intervention

Les maladies transmissibles représentent le domaine dans lequel la Santé publique a réalisé ses progrès les plus anciens et les plus spectaculaires. Les défis continuent d'y être nombreux, et appellent parfois des actions urgentes. L'ensemble de ces activités – que l'on regroupe souvent sous le nom d'épidémiologie d'intervention – repose sur les 4 piliers suivants :

- L'identification d'un risque infectieux pour une population.
- La prévention contre la survenue de ce risque.
- La surveillance épidémiologique consistant à mesurer l'amplitude de ce risque au cours du temps.
- Le contrôle, consistant à corriger une situation dans laquelle le risque a atteint un niveau inacceptable. On parle par exemple du contrôle d'une épidémie comme étant l'ensemble des mesures prises pour y mettre fin.

La suite de ce chapitre développe les 2 derniers de ces aspects.

Surveillance des maladies transmissibles :

La surveillance est une analyse continue de données relatives à la survenue d'une maladie. Le principal outil de cette analyse est la définition de ce que l'on considère comme un cas. Cette définition doit atteindre un équilibre approprié entre sensibilité et spécificité en fonction des objectifs visés. On a parfois recours à plusieurs niveaux de certitude pour concilier sensibilité et spécificité (par ex. cas possibles / probables / confirmés).

En Suisse, deux systèmes de surveillance des maladies transmissibles sont en place au niveau fédéral, tous deux basés sur les déclarations de médecins et/ou de laboratoires :

- *Le système "SENTINELLA"* : On appelle sentinelle une surveillance basée sur un échantillonnage de médecins. Un tel système est fait pour comptabiliser des événements fréquents, et pour détecter des écarts d'incidence. En pratique, Sentinella regroupe 150 à 250 médecins généralistes, internistes et pédiatres répartis sur tout le territoire. Ces médecins rapportent les consultations réalisées pour une infection d'intérêt particulier en proportion du total de leurs consultations. L'Office Fédéral de la Santé Publique établit chaque année avec les médecins de Sentinella la liste des infections surveillées de cette manière. Cette liste comporte toujours des infections évitables par des vaccinations (p. ex. grippe, rubéole, oreillons), mais aussi un assortiment

variable d'autres infections (par ex. pneumonie). Un sous-groupe des médecins Sentinella est chargé de confirmer les diagnostics de ces infections par des examens de laboratoire, ce qui permet d'étalonner la fiabilité du système de surveillance.

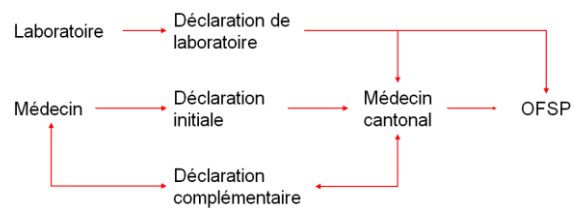
- *Le système de déclaration obligatoire* : Ce système se veut plus exhaustif, et vise à compter les infections rares. Basé sur une ordonnance fédérale datant du 13.01.1999 et sur ses modifications ultérieures, il inclut une quarantaine d'infections. Tout médecin ou laboratoire qui diagnostique une de ces infections – telle que définie par les critères officiels – est tenu de la déclarer dans un délai qui varie entre 2 h. et 1 sem. selon l'infection en question. La Table 6 fournit quelques détails sur les infections surveillées de la sorte (à titre d'information seulement !).

Table 6 : Catégories d'infections soumises à déclaration obligatoire en Suisse (<http://www.bag.admin.ch>).

■ Déclaration initiale par médecin et/ou labo :	
✓ Tuberculose	✓ Fièvres hémorragiques virales/ fièvre jaune
✓ Malaria	✓ Anthrax, variole, peste, tularémie
✓ Mal. invasive à méningocoque	✓ SRAS, nouvel Influenza A
✓ Diphtérie	✓ Épidémiologie
✓ Syndromes neurologiques (polio, rage, botulisme)	✓ Creutzfeld – Jacob
✓ Rougeole	✓ Flambée de cas
■ Déclaration initiale seulement par le médecin	
✓ Tétanos	
■ Déclaration initiale seulement par labo : 21 pathogènes	
✓ P.ex. VIH, hépatites, bactéries responsables de diarrhées infectieuses, ...	

La Figure 7 illustre le circuit que doivent suivre ces déclarations selon la loi. Les déclarations complémentaires qui y sont mentionnées visent à recueillir des informations épidémiologiques supplémentaires après la déclaration initiale (p. ex. type et lieu d'exposition, vaccination préalable, etc.); elles sont demandées pour 36 des infections soumises à déclaration obligatoire.

Figure 7 : Voies de déclaration obligatoires en Suisse.



Si certaines déclarations sont anonymes, 26 sont nominatives afin de permettre des interventions de santé publique, et sont ensuite anonymisées.

Il est important de comprendre que les déclarations ne reflètent qu'une partie de la réalité. En effet, parmi la totalité des personnes infectées, celles qui sont symptomatiques, qui consultent un médecin, qui subissent des examens de laboratoire, chez qui ces examens sont pathologiques et qui finalement sont

déclarées représentent des proportions décroissantes, variables selon l'infection considérée.

Principes de contrôle d'une épidémie :

- Définitions :

On appelle *épidémie* la survenue d'une maladie à une fréquence clairement supérieure à celle attendue.

On notera qu'il s'agit d'une définition semi-quantitative (même si des seuils épidémiques quantitatifs sont parfois définis pour des raisons opérationnelles), et qui ne s'applique pas uniquement à des infections.

On appelle *cas index* le premier cas identifié d'une épidémie; de manière plus générale, on nomme *cas primaire* l'individu qui introduit une infection transmissible dans un groupe, et qui donc peut être la source de cas secondaires.

Une *pandémie* est un cas particulier d'épidémie qui survient sans restriction géographique.

L'*endémie*, par contraste, est définie comme la présence durable d'une maladie à une fréquence stable. C'est l'expression d'une situation d'équilibre épidémiologique entre un microbe et une population.

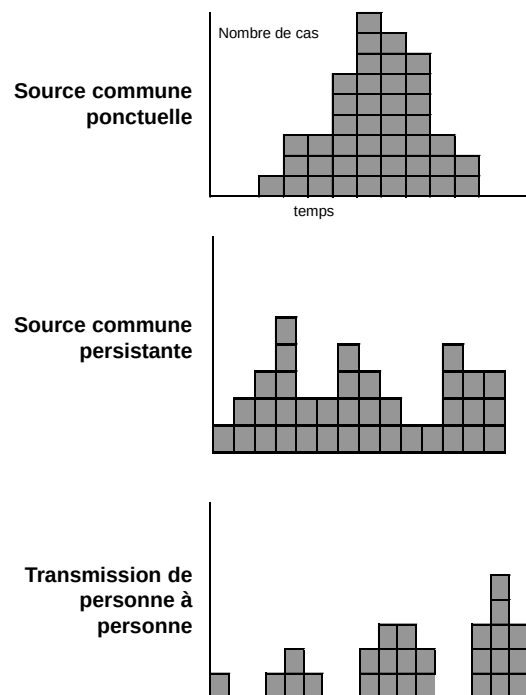
-Investigations d'une épidémie :

Contrôler une épidémie impose de chercher à comprendre le pathogène en cause, sa source et son mode de transmission. Les étapes généralement requises pour y parvenir sont décrites dans la Table 7. Il y est question de courbes épidémiques, dont la Figure 8 fournit quelques exemples.

Table 7. Etapes classiques de l'investigation d'une épidémie.

Etapes	Remarques
1. Confirmation de l'épidémie	Comparer l'incidence estimée avec celle d'un système de surveillance, ou à défaut avec des données de la littérature. Se méfier des biais de déclarations (par ex. nouveaux tests, attention accrue à une maladie)
2. Epidémiologie descriptive a) Dénumérer les cas b) Organiser les données en "personnes – lieu – temps" c) Etablir la courbe épidémique	- Etablir pour cela une définition de cas - Caractériser les personnes atteintes (âge, activités, ...); délimiter l'extension; définir la fenêtre chronologique - Distribution des cas selon leurs dates de début. Cela permet une visualisation de l'évolution et l'établissement d'hypothèse (incubation, contagiosité, ...)
3. Epidémiologie analytique a) Déterminer les taux d'attaques b) Formuler des hypothèses étiologiques c) Tester les hypothèses d) Affiner les hypothèses	- Par ex. par catégorie de personnes ou de lieux - A déduire des données récoltées - souvent par études cas-témoins (qui comparent la proportion d'exposés parmi les cas et parmi les témoins) ce qui permet d'explorer plusieurs hypothèses avec un même collectif - P. ex. biologie moléculaire sur l'agent pathogène pour en prouver la source et/ou la chaîne de transmission

Figure 8. Exemples de courbes épidémiques.



Pour mettre fin à une épidémie ou pour l'atténuer, il faut lutter contre la transmission des microbes en cause. Cela doit parfois se faire de manière urgente, avant d'avoir fini d'investiguer les mécanismes de l'épidémie.

Les mesures à prendre relèvent d'un des deux types suivants, ou de leurs combinaisons :

- Eradication du microbe d'une source commune (p. ex. assainissement d'un réseau d'eau potable contaminé).
- Interruption ou diminution de la transmission en cas de contagiosité. Il s'agit là de faire diminuer le nombre réplcatif effectif R_e . Les principaux moyens existants pour y parvenir sont cités dans la Figure 9. Les termes utilisés dans cette Figure se définissent de la manière suivante :

Isolement : restriction de contacts pour toutes les personnes infectées et contagieuses. La restriction s'applique durant toute la période de contagiosité.

Cohortage : isolement d'un groupe de personnes présentant la même infection contagieuse.

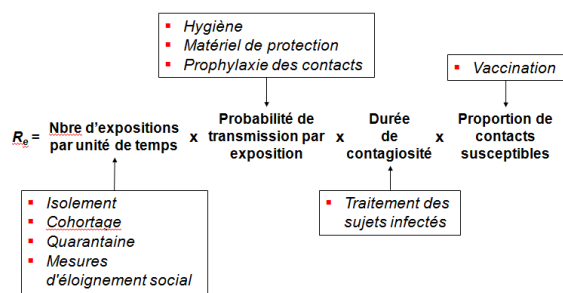
Quarantaine : restriction de contacts pour des personnes asymptomatiques mais exposées à une infection transmissible. La durée maximale s'étend jusqu'à la fin de la

période d'incubation si aucune infection ne se déclare. En cas d'infection, la quarantaine devient un isolement.

La mise en œuvre de ces mesures peut être extrêmement stricte si le but est d'empêcher toute transmission. On parle alors de stratégie de contention ou d'endiguement.

Si la contention est impossible en pratique ou disproportionnée par rapport aux risques, des mesures peuvent être prises de manière plus nuancée (par ex. de manière partielle, ou ciblée sur des groupes à risque). On parle alors de stratégie d'atténuation (ou mitigation).

Figure 9. Mesures visant à diminuer la transmission microbienne interhumaine.



Infections nosocomiales

L'étymologie grecque du mot "nosocomial" implique qu'il désigne des maladies liées aux activités de soins. Les infections nosocomiales sont ainsi par définition des *infections acquises dans le contexte des soins*, et qui donc n'étaient ni présentes ni en incubation au moment du premier contact avec le système de soins.

Cette définition s'applique aussi bien aux soins ambulatoires qu'hospitaliers; par ailleurs, elle s'applique qu'il y ait ou non une relation causale entre les soins et l'infection.

Les concepts épidémiologiques exposés plus haut dans ce chapitre s'appliquent également aux infections nosocomiales. Si l'on donne à ces dernières une place à part dans les objectifs de formation, c'est du fait de leur fréquence et de leur gravité, mais surtout parce que dans ce domaine les soins eux-mêmes représentent une exposition à risque pour des sujets déjà fragilisés par un autre problème de santé. Il résulte de cette caractéristique que la prévention des infections nosocomiales relève des compétences de base de tout professionnel de la santé.

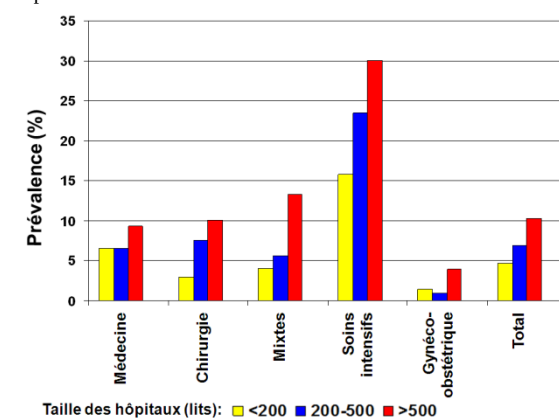
De plus, si la prévention fait d'importants progrès dans ce domaine, les risques se sont également accrus. D'une part, les progrès de la médecine impliquent que des patients toujours plus fragiles (en raison de leur âge, de leurs comorbidités) sont soumis à des traitements plus invasifs; d'autre part, les microbes impliqués dans les infections

nosocomiales sont devenus plus résistants aux antibiotiques et aux désinfectants.

De nos jours, une large majorité des infections nosocomiales est d'origine *endogène*, ce qui veut dire que les patients sont infectés par des microbes qui les colonisaient déjà auparavant. Moins de 30% des infections nosocomiales sont d'origines *exogènes*. Dans ces cas, le microbe en cause est transmis au patient par son environnement (air, eau, instruments, surfaces, ...), par un membre du personnel ou par un autre patient.

Les infections nosocomiales regroupent une telle variété de diagnostics et de pathogènes différents qu'il est impossible de surveiller l'incidence de chacune de ces infections. Pour se faire une idée globale du fardeau des infections nosocomiales dans les hôpitaux, on peut avoir recours à une enquête de prévalence incluant tous les patients d'un hôpital à un moment donné. La Figure 10 montre le résultat d'une telle enquête conduite simultanément dans de nombreux hôpitaux suisses. On y voit que 5 à 10% des patients hospitalisés souffraient d'une infection nosocomiale au moment de l'enquête, cette prévalence étant plus élevée dans les hôpitaux de grande taille. Cette observation permet d'estimer une incidence de 70'000 infections nosocomiales par an en Suisse.

Figure 10. Prévalence des infections nosocomiales dans les hôpitaux suisses en 2003.



Les sites anatomiques qui sont le plus souvent le siège d'une infection nosocomiale sont les voies urinaires, les voies respiratoires et les sites d'interventions chirurgicales.

Les infections nosocomiales ont pour conséquence des traitements médico-chirurgicaux supplémentaires, ainsi qu'une mortalité qui leur est directement attribuable atteignant 0.1 à 0.5% pour les infections urinaires, et 10 à 30% pour les pneumonies. Elles entraînent de plus un prolongement du séjour hospitalier (d'env. 10 jours pour les infections de site opératoire, par exemple) ainsi qu'une augmentation des coûts (qui sont doublés en cas d'infection de site opératoire, par exemple).

Un grand nombre de bactéries, virus, champignons et parasites peuvent causer des infections nosocomiales. Les agents les plus fréquemment impliqués sont des bactéries de type cocci à Gram positif (en particulier *Staphylococcus aureus*, staphylocoques à coagulase négative, et entérocoques) et des bacilles à Gram négatif (en particulier *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). La distribution des microbes impliqués dépend plusieurs facteurs qui sont répertoriés dans la Table 8.

Table 8. Facteurs déterminant la distribution des microbes impliqués dans les infections nosocomiales.

- **site de l'infection, p.ex:**
 - ✓ Infections de plaies: surtout bactéries cutanées
 - ✓ Infections intra-abdominales: surtout entérobactéries / *anaérobies* / entérocoques
- **épidémiologie locale**
 - ✓ Ex. proportions de bactéries multi-résistantes variables selon les régions / les hôpitaux
- **antibiothérapie préalable**
 - ✓ favorise des bactéries résistantes ou des champignons
- **présence de corps étrangers ou de matériel prothétique**
 - ✓ favorise des bactéries cutanées adhérant aux *biofilms* (ex. *Staphylococcus epidermidis*)
- **longueur du séjour hospitalier**
 - ✓ favorise des bactéries dites "hospitalières", en particulier des bacilles à Gram négatif

Prévention des infections nosocomiales

En théorie, des pratiques de soins parfaites devraient prévenir toutes les infections nosocomiales exogènes. Quant au risque d'infection endogène, il peut être réduit par des nombreuses mesures de prévention telles que la désinfection cutanée ou la prophylaxie par antibiotique avant une intervention chirurgicale.

En pratique, on estime à environ 30% la proportion d'infections nosocomiales évitables dans le contexte de nos standards de soins actuels.

La prévention des infections nosocomiales est fondée sur les axes suivants :

- Des processus de soins respectant les règles d'hygiène (par ex. asepsie lors de gestes invasifs).
- La lutte contre la transmission de microbes au moyen de précautions standards et de mesures additionnelles.
- La surveillance.
- Des mesures de contrôle si nécessaire.

Seul de concept de précautions standard sera développé ici. Celui de mesures additionnelles est enseigné dans le Module B3.8.

Les précautions standards

On appelle ainsi un ensemble de mesures préventives qui doivent être appliquées pour tout

patient et par tout le personnel soignant, et qui reposent sur le principe que tout contact avec la peau, les muqueuses, du sang ou d'autres liquides biologiques, ou avec l'environnement immédiat du patient est une occasion de transmission d'agents infectieux.

Les précautions standards comportent plusieurs rubriques dont 4 concernent directement le personnel médical (les autres, telles que l'entretien de l'environnement du patient ou le traitement des déchets, relevant plutôt d'autres catégories professionnelles) :

- L'hygiène des mains.
- La protection du personnel contre des accidents d'exposition aux liquides biologiques, par la pratique sécurisée des injections et la vaccination.
- La désinfection ou la stérilisation entre deux patients de tout le matériel médical réutilisable.
- Le port de matériel de protection (gants, masque, lunettes, sur-blouse, selon les situations) lorsqu'un contact avec des liquides biologiques est à prévoir.

Nous terminerons ce chapitre en développant les 2 premières de ces rubriques.

Hygiène des mains

Les mains sont naturellement colonisées par la flore microbienne résidante de la peau. De plus, en raison de la fréquence des gestes dans lesquelles elles sont utilisées, elles sont fréquemment porteuses d'une flore transitoire acquise par contact avec d'autres personnes (dont les patients) ou avec l'environnement. Il en résulte que les mains représentent le mode le plus fréquent de transmission microbienne à un patient et donc le mode le plus fréquent d'infections nosocomiales exogènes.

En conséquence, l'hygiène des mains est reconnue comme la mesure la plus importante pour la prévention des infections nosocomiales.

La méthode de choix pour l'hygiène des mains est la désinfection par friction avec une solution hydro-alcoolique. Quant au lavage des mains avec une solution antiseptique, il constitue une alternative, mais de second choix car il prend plus de temps, il est moins accessible, il est moins bien toléré par la peau, et son action antimicrobienne est plus faible et plus lente.

L'importance des mains dans les gestes courant implique une désinfection dans de très nombreuses situations, que l'Organisation Mondiale de la Santé a regroupées dans les "5 indications à l'hygiène des mains" (Table 9).

Table 9. Les 5 indications à l'hygiène des mains.

1. Avant tout contact avec un patient
2. Après tout contact avec un patient
3. Avant un acte aseptique
4. Après un contact avec des objets dans le voisinage immédiat du patient
5. Après un contact avec un liquide biologique, une muqueuse ou la peau lésée, le cas échéant après le retrait des gants

Remarque : le port de gants ne change rien à ces indications.

Ces indications, dont la promotion est relativement récente, sont mal connues des médecins qui ne les appliquent que de façon lacunaire. Il est donc crucial que les nouvelles générations de médecins les connaissent et les exercent afin qu'elles accompagnent comme un réflexe tous les contacts avec des patients.

Protection du personnel contre les accidents d'exposition aux liquides biologiques

En Suisse, chaque membre du personnel soignant déclare en moyenne 0.8 accidents d'exposition à du sang par an (piqûres, coupures, aspersions sur une peau lésée ou sur des muqueuses). Cette fréquence peut monter à environ 10 par an pour un chirurgien.

A l'exception de la sueur, tous les liquides biologiques peuvent transmettre une multitude d'agents infectieux. Parmi ceux-ci, trois retiennent particulièrement l'attention car on peut en être porteur sans le savoir. Il s'agit des virus du SIDA (VIH), de l'Hépatite B et de l'Hépatite C. Les risques engendrés par ces virus lors d'expositions accidentelles à des liquides biologiques sont détaillés dans la Table 10.

Table 10. Virus et risques de transmission par les liquides biologiques (HBeAg : un des antigènes du virus, marqueur de l'infectiosité)

Virus	Risque de transmission	
VIH		
expo <u>per-cutanée</u>	0.3%	(sans traitement post-expositionnel)
expo muqueuse	0.1%	
Hépatite B (<i>exposition per-cutanée</i>)		
source HBeAg+	20 – 30%	(si soignant non vacciné)
source HBeAg-	1 – 6%	
Hépatite C (<i>exposition per-cut.</i>)		
	0.5 – 1%	

C'est pour cette raison que la vaccination contre l'Hépatite B – détaillée dans le programme de vaccination des étudiants en médecine – fait partie des précautions standards, de même que le port de matériel de protection dans les situations comportant un risque d'aspersion de liquides biologiques.

Lors de prises de sang ou d'injections, les précautions standards comportent aussi les mesures suivantes :

- port de gants
- pas de recapuchonnage des aiguilles après utilisation
- évacuation des déchets piquants ou tranchants dans des collecteurs spécifiques toujours à portée de mains
- scellement des collecteurs pleins au 2/3.

L'attitude à adopter en cas d'exposition accidentelle à un liquide biologique est la suivante :

- Eviter un autre accident
ex. jeter l'aiguille dans un container
- Mesures d'urgence
 - ✓ Piqûres – blessures: laver au savon, rincer, désinfecter
 - ✓ Projection sur muqueuses: rincer abondamment à l'eau
- Conseil médical d'urgence
 - ✓ Évaluation du risque (*type d'accident, patient source*)
 - ✓ Sérologies en urgence chez le patient source si justifié
 - ✓ Instauration d'une prophylaxie post-exposition si nécessaire et disponible
- Déclaration
 - ✓ Déclaration d'accident à l'assurance dans tous les cas.

Sources et informations

Control of Communicable Diseases Manual
Ed. by David L. Heymann
APHA Press (American Public Health Association, Waldorf)
2014, 20th ed., 729 p.
ISBN: 978-0-87553-018-5

Modern Infectious Disease Epidemiology
Johan Giesecke
Arnold Publishers Ltd Export Sales Dept., London
2001, 2nd ed. 268 p.
ISBN: 978-0-340-76423-7

Organisation mondiale de la santé (www.who.int)

US Centers for Disease Control and Prevention
(www.cdc.gov)

European CDC (www.ecdc.europa.eu)

Office fédéral de la santé publique
(www.bag.admin.ch)