

2019

NUMERO : 00

Revue Aurassienne du Laboratoire
RAL



Revue du Laboratoire Central de
Biologie Médicale-CLCC-Batna

Trimestrielle

01/12/2019

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION

Professeur A.KASSAH-LAOUAR

REDACTION

Rédactrice en chef

Docteur M.K KHEBRI

**REDACTRICE EN CHEF
ADJOINTE**

Docteur N.ACHACHI

Comité de rédaction

MK. Khebri

N. Achachi

H. Zemmouri

N. Benkhelfalah

N. Chaabane

N. Akakba

A. Benbouza

A. Bouali

A. Benharra

S.Benbrahim

COMITE SCIENTIFIQUE

Professeur A.KASSAH-LAOUAR

Professeur Ag.M.BENMEHIDI

Professeur Ag.A.TOBBI

Professeur A.AYACHI

Professeur H.BENBOUZA

Docteur L.LOUCIF

Professeur Z.BENMANSOUR

R A L

REVUE AURASSIENNE DU LABORATOIRE

Sommaire

Editorial : la vie d'une revue scientifique	1
L'invité de la revue :	2
A propos de la Revue Aurassienne du Laboratoire.....	3

Biochimie

Les bonnes pratiques de prescription des marqueurs tumoraux.....	6
--	---

Hémobiologie et transfusion sanguine

Numération et cytologie sanguine : Paramètres pré-analytiques, leurs variations et les conséquences sur les résultats biologiques.....	8
Syndrome Hémorragique : Comment Procéder dans un laboratoire d'hémobiologie ? « Hémostase Primaire ».....	12
Erreur de détermination de la NFS par les automates d'hématologie cellulaire. Partie 1 : Erreur de détermination du taux de l'hémoglobine.....	14

Microbiologie clinique

Renseignements cliniques pour un biologiste.....	16
La leucocidine de Panton et Valentine	18
Faut-il corriger la découverte des antibiotiques ? A qui revient le mérite ?.....	20
Implication du microbiote mammaire dans le cancer du sein.....	23
Diagnostic au laboratoire d'une infection à <i>Haemophilus influenzae</i>	25
Techniques de diagnostic virologique de l'infection à CMV.....	29

Parasito-mycologie

Onychomycoses : Modalités de diagnostic au laboratoire	31
--	----

Pharmacologie

Place de l'ordinateur dans le développement des nouveaux candidats médicament-antibiotique	38
Composition chimique et influence de différents tweens sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de <i>Brocchia cinerea</i> et <i>Eucalyptus globulus</i>	40
Le dosage de médicaments pour le suivi thérapeutique pharmacologique : les principes	46

Biologie Moléculaire

Les deuxièmes journées Aurassiennes de Biologie Moléculaires (JABM II).....	51
Le temps de la biologie moléculaire.....	54
Intérêt de la quantification de la charge virale dans le Diagnostic et le suivi des infections à <i>Herpesviridae</i> : expérience du LCBM- CLCC-Batna.....	55

Culture générale

Louis Pasteur (Part I).....	60
Cas clinique.....	63
Histoires des mots croisés et fléchés.....	65
Quiz	68
Citations et proverbes du numéro.....	69
Naissance d'une association (AMICA).....	70
Appel à la communication (JAMIC III)	71
Corrigé cas clinique.....	72
Réponse Quiz.....	73
Solution mots croisés.....	74

La Revue Aurassienne du Laboratoire est publiée trimestriellement par le LCBM du CLCC de Batna.

C'est une revue de formation et d'information du Laboratoire.

La RAL est une propriété du LCBM-CLCC-Batna

Éditorial : la vie d'une revue scientifique



Lorsque j'ai pensé à la création de cette revue il y a plus d'une année, j'ai été frappé par l'intérêt que portait la communauté médicale et scientifique à cet événement. Au début, je comptais m'inspirer des propos des rédacteurs en chef des revues locales, régionales, nationales et internationales, mais après réflexion, j'ai décidé de tourner résolument mon regard vers l'avenir plutôt que vers le passé.

Ce numéro marque le début d'une série d'événements importants dans la vie de notre revue et pourquoi pas de notre laboratoire et établissement. Les membres fondateurs de la revue dont je félicite vivement n'ont pas cessé de m'encourager quant à la sortie du premier numéro. La rédactrice en chef travaillera de concert avec la rédactrice en chef adjointe et les responsables de section pour améliorer l'efficacité du processus de

rédaction. Dans ce numéro figure un appel à la publication.

Le second point qui aura lieu en cours d'année est l'introduction d'un processus électronique de dépôt des manuscrits et d'une version imprimable afin d'offrir un service à nos auteurs. Actuellement tous les manuscrits ont été déposés sur un mode électronique, reste seulement à faire paraître graduellement un masque de saisi des articles qui facilitera son traitement.

J'ai beaucoup apprécié le travail réalisé par toute l'équipe et je les remercie explicitement dans ce numéro. Le seul aspect de la revue qui m'inquiète, cependant, c'est la **pérennité**.

Un troisième événement a eu lieu dont nos lecteurs ne sont peut-être pas au courant : les articles publiés par la RAL sont disponibles en version électronique sur l'adresse du site du LCBM : <http://www.lcbm-cacbatna.com/>

Directeur de la publication
Professeur A.KASSAH-LAOUAR



L'invité de la revue

Monsieur A. Madoui
DG du CLCC – Batna

Le Centre de Lutte Contre le Cancer de Batna est un jeune établissement qui a ouvert ses portes aux patients en mai 2012, issu d'un ambitieux programme gouvernemental pour la prise en charge des malades et alléger la souffrance des usagers. La composition humaine a permis de rayonner sur la région sud-est du pays voir même à l'échelle nationale, pour une prise en charge qualitative et quantitative dans toutes les spécialités biologique, médicale et chirurgicale à la satisfaction des citoyens. Ce qui m'engage à dire tous mes vifs remerciements à l'équipe soignante, à tous le personnel et à l'équipe dirigeante de cette revue. Je tiens à encourager toute l'équipe de la RAL pour tous les efforts déployés quant à la réussite du premier numéro.

A propos de la Revue Aurassienne du Laboratoire

RAL

*Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
Directeur de la publication*

La revue Scientifique du Laboratoire Central de Biologie Médicale (LCBM) de l'EHS Centre de Lutte Contre le Cancer (CLCC) de Batna est créée en Octobre 2019 et en Novembre de la même année, il y a eu la sortie premier numéro de la revue. L'objectif global de la création de cette revue scientifique est de mettre en place un système d'information pour diffuser les connaissances scientifiques sur la biodiversité biologique. Cette revue est Trimestrielle. L'éditeur du bulletin est le LCBM du CLCC de Batna. Celui-ci est un service créé en 2012 avec le CLCC et a ouvert ses portes au mois de février 2016 sous la responsabilité du Docteur KASSAH-LAOUAR Ahmed Professeur Chef de service spécialiste en Microbiologie Clinique. Le centre diffuse des informations en ligne à travers le site web : <http://www.lcbm-cacbatna.com>.

Cette revue est diffusée gratuitement en ligne et en imprimé. Les articles publiés dans ce bulletin ne peuvent en aucun cas être republiés ou subir une manipulation commerciale. En cas d'appropriation des données par une personne étrangère à la publication notamment par manque de respect des procédures normales de citation bibliographique, le contrevenant sera soumis en justice conformément aux lois en vigueur relatives au droit de propriété intellectuelle. A des fins bibliographiques, un article du bulletin devrait être cité de la manière suivante :

Nom de l'auteur (Année). Titre de l'article. *Bulletin Scientifique du LCBM n°: Bulletin n°: page (de-à)*

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION

Professeur Ahmed KASSAH-LAOUAR (Chef de service du Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna-Faculté de Médecine de Batna)

Comité de rédaction

Rédacteur en Chef: Docteur KHEBRI MOUNA-KHADIDJA (chef d'unité de Biologie Moléculaire, d'hémobiologie et de transfusion sanguine) Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Rédacteur en Chef Adjoint: Docteur ACHACHI NAWEL (Chef de pharmacologie) Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna.

Rédacteurs associés:

2. Docteur BENKHELFALLAH NABILA (Unité d'hémobiologie et de transfusion sanguine Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna)

Comité scientifique:

Président : Professeur Ahmed KASSAH-LAOUAR (Chef de service du Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna-Faculté de Médecine de Batna)

Docteur BENBOUZA AMEL (chef de service LCMB EPH-Batna ex Sanatorium)

Docteur CHABANE NABILA (chef d'unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur KHEBRI MOUNA-KHADIDJA (Chef de Biologie Moléculaire, d'unité de d'hémobiologie et de transfusion sanguine) Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC Batna)

Docteur AKAKBA NABIL (unité hémobiologie et de transfusion sanguine) Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna)

Docteur ZEMMOURI HADJER (unité de parasitologie-mycologie médicale) Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna)

Docteur Achachi Nawel (unité de pharmacologie) Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna)

Docteur BENKHELFALLAH (Unité d'hémobiologie et de transfusion sanguine Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna)

Docteur KOURAR IMENE (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur KOUDA N. HOUDA (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur Asma Benharra (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur Achraf Bouali (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur LOMBARKIA YAMINA (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur BENSEGHIR LAMIA (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur SOUALHI HEDDA (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Responsable de la mise en ligne

Docteur Achraf Bouali (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur MOUMEN-Messaoud Abderrahmane (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur Mekki Ahmed-Hachem (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Docteur Zidani Zoheir (Unité de Microbiologie et Hygiène-Hospitalière Laboratoire Central de Biologie Médicale CLCC-Batna).

Procédures éditoriales

- Le Rédacteur en Chef, le Rédacteur en Chef Adjoint et les Rédacteurs associés ont la responsabilité de décider si le manuscrit soumis peut être publié dans la revue. Le Rédacteur en Chef ou le Rédacteur en Chef Adjoint soumettent donc aux lecteurs un manuscrit déjà jugé comme important pour la publication.
- Un manuscrit doit être analysé par au moins deux lecteurs issus du Comité scientifique. Le choix des lecteurs est décidé par le Rédacteur en Chef, le Rédacteur en Chef Adjoint et les Rédacteurs associés. En cas de besoin, un manuscrit peut être soumis aux lecteurs externes identifiés par le Rédacteur en Chef, le Rédacteur en Chef Adjoint et les Rédacteurs associés avec possibilité des propositions des membres du Comité scientifique.
- La décision d'accepter ou de rejeter un manuscrit à partir des avis des lecteurs est sous la responsabilité du Rédacteur en Chef, le Rédacteur en Chef Adjoint et des Rédacteurs associés. Aucun article ne pourra être accepté sans avoir subi le processus d'analyse prévu pour cette revue. En cas d'une position négative des lecteurs, l'auteur est appelé à subir l'interrogatoire de la part du Rédacteur en Chef ou du Rédacteur en Chef Adjoint afin de prendre la décision finale. L'auteur pourrait être appelé à revoir profondément son texte ou à faire des activités de recherche complémentaires.
- Avant la publication de la revue, celle-ci est soumise à tout le Comité scientifique

pour susciter un commentaire sur le contenu et le format.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

Cadre général

La revue Scientifique du LCBM est trimestrielle. Elle couvre l'écologie des services du centre, la biologie dans toutes ses formes, microbiologie et hygiène, hémobiologie et transfusion sanguine, biochimie médicale, parasitologie-mycologie médicale, pharmacologie, histo-embryologie, biologie moléculaire, des reports de cas, des cas cliniques, des études faites dans le service, des conduites à tenir dans les disciplines biologiques, des nouveautés dans le domaine de la biologie, des annonces pour des journées d'étude ou scientifiques, des mises à jour, des citations et proverbes scientifiques, des revues de la littérature.

La revue recevra des articles rédigés en langue française. Un manuscrit ne peut pas dépasser deux pages. Des exceptions sont faites en négociation à l'avance avec le Rédacteur en Chef et Rédacteur en Chef adjoint qui en informeront les Rédacteurs associés. Le manuscrit peut également concerner un petit texte sur une page ou plus qui donne une information scientifique pertinente. Cette information peut concerner notamment un complément ou une rectification sur une publication déjà faite dans ce même bulletin. Avant la production de la revue, les articles acceptés seront chaque fois publiés en ligne. En parallèle avec le numéro ordinaire de la revue, il est également prévu, selon les besoins et les demandes, de sortir annuellement un numéro spécial comprenant des articles autour des thèmes précis, des actes de colloque, etc. Les articles de la revue spéciale subissent le même traitement que ceux de la revue ordinaire.

Préparation du manuscrit

Le manuscrit qui est un article scientifique de recherche ou de forum, doit avoir:

Format

- la police de caractères: Times New Roman
- la taille de police pour le titre de la revue: 14
- la taille du contenu: 10
- Interligne: simple, avec 2 cm de marge pour les deux côtés
- Format en 2 colonnes

Titre

Le **titre** du manuscrit doit donner une information concise. Si le titre contient un nom d'espèce, celui-ci doit être mis en italique et suivi par le nom de son auteur et l'année de sa publication. Le nom de famille et de l'ordre doivent également suivre et mis entre parenthèses. (Ex: profil de sensibilité aux antibiotiques d'*Escherichia coli* isolés de bactériémies dans le service d'onco-hématologie)

Le(s) **nom(s)** de l'(des) **auteur(s)**, est suivi par une adresse postale et une adresse E-mail si elles existent. Les **mots-clés** ne peuvent pas dépasser 04 mots. Les mots qui se retrouvent dans le titre du manuscrit ne peuvent pas revenir dans les mots-clés. Le **résumé** est

produit en français et en anglais et en arabe ne peut pas dépasser 15 lignes.

Contenu

Contenu pour les articles de recherche scientifique

Les sections importantes du contenu du manuscrit sont: Introduction, Méthodologie, Résultats, Discussion et Conclusion (Ces deux sections peuvent être combinées), Remerciement (facultatif), Bibliographie. La discussion devra comprendre assez de matière. Les figures et les tableaux accompagnent les textes. Tout nom scientifique de l'espèce doit être suivi, au moins une fois, par un nom de son (ses) auteur(s) et de l'année de sa publication, de préférence dès sa première citation dans le texte. Des symboles internationalement reconnus peuvent être utilisés.

Bibliographie

La bibliographie se note de la façon suivante dans le texte et doit obéir aux accords (à la convention) de Vancouver:

- Bibliographie dans le texte: La mention des références dans le texte se fait par des numéros entre parenthèses ou entre crochets.

- Liste des références bibliographiques citées à la fin de l'article: les références sont classées par ordre d'apparition dans le texte. On doit évidemment citer tous les auteurs et le titre du document.

Les noms des périodiques (revues, journal bulletins, etc.) doivent s'écrire en entier et non en abrégé. Les noms des périodiques et les titres des livres doivent être mis en italique.

Ex :

13. **Arlet, G., M. Rouveau, I. Casin, P. J. M. Bouvet, P. H. Lagrange, and A. Philippon.** 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumonia* strains that produce SHV-4 b-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J. Clin. Microbiol.***32**:2553–2558.

Les bonnes pratiques de prescription des marqueurs tumoraux

Biochimie

MISE AU POINT

Par Docteur LAABED Nihad

Résumé

La prise en charge des cancers est multidisciplinaire dont la part du biologiste est non négligeable. Actuellement on note l'émergence de nouveaux marqueurs sériques pouvant indiquer la présence d'un cancer. En pratique médicale, on assiste souvent à des prescriptions fréquentes du dosage de marqueurs tumoraux et qui ne sont pas toujours appropriées, entraînant ainsi un surcoût financier important. Dans cet article, sont passés en revue les bonnes pratiques de prescription des MT que chaque médecin doit connaître et bien maîtriser.

Mots clés : cancer ; marqueurs tumoraux ; prescription ; dépistage ; diagnostique ; suivi.

INTRODUCTION

Les marqueurs tumoraux (MT) sont actuellement largement utilisés en clinique. S'ils peuvent rendre des services certains, leur utilisation abusive est souvent dénoncée. Le dosage des marqueurs tumoraux n'a de justification que s'il contribue à améliorer la survie, la qualité de vie et/ou le coût de la prise en charge des patients atteints de cancer. L'objectif de cet article est de clarifier les conditions dans lesquelles le dosage des MT est d'un intérêt, ainsi que les bonnes pratiques que chaque médecin doit connaître et bien maîtriser.

NOTION DE MARQUEUR TUMORAL

Les MT correspondent à des substances sécrétées par les cellules dans les liquides biologiques permettant ainsi leur dosage. Leur présence à des taux élevés signe de façon plus ou moins spécifique la présence de cancer. (1)

CRITERES D'UN MARQUEUR IDEAL

En théorie un MT idéal devrait :

1. être sensible et spécifique
2. Avoir une valeur prédictive positive et négative maximale
3. refléter la charge tumorale
4. prédire le pronostic
5. prédire la rechute

Malheureusement le MT idéal n'existe pas ! De tous les marqueurs qu'on utilise actuellement, aucun ne peut répondre à tous ces objectifs à la fois. (2)

PRINCIPAUX MARQUEURS TUMORAUX

Les antigènes onco-foetaux

- ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire
- AFP : alpha-foetoprotéine

Antigènes carbohydratés

- CA 19-9, CA 125, CA 15-3, CA 50, CA 242 et CA 72-4.

Les cytokératines

- Cyfra 21

Les hormones et leurs métabolites

- HCG : hormone gonadotrophique chorionique
- Thyroglobuline
- Thyrocalcitonine

Les enzymes

- NSE : neurone spécifique éolase
- PSA : antigène spécifique de prostate

Les immunoglobulines

- IgG, IgM

Autres marqueurs tumoraux

- SCC : antigène des carcinomes a cellules squameuses.
- Protéine S100B
- Chromogranine A. (3)

INTERET CLINIQUE DU DOSAGE DES MT

➤ Dans le dépistage

Le dépistage des populations à risque par le dosage d'un MT peut être précieux dans :

- les formes héréditaires de cancer médullaire de la thyroïde (CT).
- l'hépatocarcinome chez les patients cirrhotiques (AFP).
- du choriocarcinome chez les patients atteints d'une maladie trophoblastique (hCG). (4)

➤ Dans le diagnostic

L'élévation d'un MT peut suffire à poser le diagnostic :

- du cancer de la prostate (PSA).
- de cancer médullaire de la thyroïde en présence d'un nodule thyroïdien (CT).
- de cancer testiculaire chez l'homme ou le choriocarcinome chez la femme (hCG).
- d'hépatocarcinome chez un patient cirrhotique (AFP > 400 µg/l). (5)

➤ Dans le pronostic — Bilan d'extension

La concentration initiale d'un MT est un bon indicateur de la masse tumorale et peut constituer un facteur pronostic fiable. Cette concentration de base peut orienter le choix thérapeutique. (6)

➤ Dans le suivi sous traitement

L'analyse cinétique des concentrations de MT doit être la règle pour évaluer la réponse au traitement :

- une augmentation de plus de 25% comme un signe de progression
- une diminution de plus de 50% comme un signe de rémission partielle.

➤ **Dans la surveillance après traitement — Récidives et métastases**

L'appréciation dynamique des variations de concentrations de MT est supérieure à l'analyse d'une valeur isolée :

- Une augmentation de 3 dosages consécutifs, signe une récurrence biologique. (7)

REGLES DE PRESCRIPTION DES MT

en quelques points (8,9,10) :

- Choisir un MT en fonction de la tumeur primitive et de son type histologique.
- Doser les MT avant traitement afin de disposer d'une valeur de référence pour étudier l'évolution ultérieure du MT
- La majorité des MT trouvent leur place dans le suivi de l'efficacité du traitement et dans la surveillance ultérieure.
- Ne pas associer plusieurs MT sauf au moment du diagnostic de la maladie
- Interpréter le résultat d'un dosage de MT avec des données anatomo-pathologiques, cliniques et radiologiques.
- Faire doser le ou les MT dans même laboratoire pour éviter les variations inter-techniques.
- Ne pas modifier la stratégie thérapeutique à la lumière d'un seul dosage.
- Il faut garder à l'esprit qu'un taux « normal » de MT n'exclut pas un cancer et qu'un taux élevé de MT ne signe pas toujours un cancer.
- le dosage des MT ne se conçoit que dans le cadre d'une tumeur primitive accessible à un traitement spécifique

LES FAUX POSITIFS ET LES FAUX NEGATIFS

Valeurs faussement basses

- La tumeur ne produit pas de marqueurs
- Une petite masse tumorale ne produit pas assez de marqueurs pour être détectables en périphérie
- Le MT est produit, mais n'est pas secrété
- La vascularisation de la tumeur est insuffisante pour libérer une concentration détectable du marqueur

Valeurs faussement élevées

- Destruction massive de la tumeur (nécrose) avec libération importante de marqueurs en périphérie. (11)

CONCLUSION

Littérature riche, études nombreuses mais intérêt et fiabilité souvent contestables, c'est ce que représentent les MT. Actuellement, aucun MT sérique ne peut contribuer avec certitude ni au dépistage ni au diagnostic du cancer. Cependant, cet examen complémentaire garde son utilité dans le cadre de suivi post-thérapeutique, ainsi que la détection précoce des rechutes et métastases.

Bibliographie :

- 1- Sarivalasis et al. Marqueurs tumoraux : quelle utilité en pratique clinique ? Rev Med Suisse 2013; 9 : 1102-7.
- 2- Standards, options et recommandations. Marqueurs sériques dans le cancer du côlon. Fédération des centres de lutte contre le cancer (2001).
- 3- Gupta S, Bent S, Kohlwes J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. Ann Intern Med 2003 ; 139 : 46-50.
- 4- Phelip JM, Clavel L, Rinaldi L. Les marqueurs sanguins tumoraux en Cancérologie digestive. Hepato Gastro 2013 ; 20 : 641-648.
- 5- Standards, options et recommandations. Marqueurs sériques dans le cancer du sein. Fédération des centres de lutte contre le cancer (2000).
- 6- Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. N Engl J Med. 2009; 360:1310-9.
- 7- Jérôme Alexandre. Du bon usage des marqueurs tumoraux sériques. Revue Francophone des Laboratoires - Février 2010 - Supplément au n°419.
- 8- Cancer de la prostate et dépistage : les dernières analyses de l'ERSCP (European randomized screening study for prostate cancer). COMMUNIQUE DE PRESSE – Association Française d'Urologie. 15 mars 2012.
- 9- Guidelines – European Group on Tumour Markers – EGTM. www.egtm.eu/
- 10- ESMO Handbook of Cancer Diagnosis and Treatment Evaluation. www.esmo.org
- 11- Gilligan TD et al. ASCO Clinical Practice Guideline on USES of Serum Tumor Markers in Adult Males With Germ Cell Tumors. J Oncol Pract 2010;4: 199-202

Numération et cytologie sanguine : Paramètres pré-analytiques, leurs variations et les conséquences sur les résultats biologiques

Hémobiologie et transfusion sanguine

MISE AU POINT

Par Docteur Salhi-Djihane

Résumé :

Le but de cet article est d'aider à la reconnaissance des non-conformités liées à la phase pré-analytique en hématologie cellulaire « de routine ». Les paramètres pré-analytiques sont présentés par ordre « chronologique », en commençant par les renseignements à fournir par le prescripteur, les conditions du prélèvement sont ensuite exposées, sous l'aspect du matériel (anticoagulant, type de tube) et de la méthodologie. Une fiche de recommandations générales résume les principaux points discutés.

Mots clés : sang, phase pré-analytique, frottis sanguin, non-conformité.

Renseignements fournis avec la prescription de l'analyse

L'usage au moins trois données sont rigoureusement indispensables : les nom et prénom, l'âge et le sexe du patient ; le nom et l'adresse du médecin prescripteur, le type d'échantillon primaire et le site anatomique d'origine si besoin. Toutes les autres informations peuvent être considérées comme facultatives mais certaines sont importantes, car pouvant générer des interférences lors de l'analyse ; pouvant guider l'étude cytologique en attirant l'attention sur telle ou telle lignée selon une éventuelle orientation clinique.

Conditions du prélèvement

Matériel

Anticoagulant : nature et concentration

Utilisé depuis plus de 40 ans en hématologie, l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) sous forme de sel di- ou tripotassique (K2 ou K3 EDTA) reste aujourd'hui l'anticoagulant de référence pour le comptage et la mesure des cellules sanguines. Le K2 EDTA est recommandé par l'International Council for Standardization in Hematology (ICSH) comme par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) aux États-Unis, bien qu'en pratique l'utilisation de K2 ou de K3 EDTA soit indifférente. S'il reste le plus adapté à l'hématologie cellulaire, l'EDTA n'est toutefois pas dépourvu d'effets sur les éléments des trois lignées circulantes.

Effets sur les globules rouges : lorsque le prélèvement est conservé plus de 24 heures à température ambiante, l'EDTA induit une augmentation du VGM.

Effets sur les leucocytes : les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont les éléments les plus sensibles à la présence de l'EDTA. Les modifications morphologiques apparaissent dès 2 heures après le prélèvement (vacuolisation des cellules) et s'accroissent avec la durée de conservation (perte des ponts entre les lobes des

polynucléaires, effacement des contours cytoplasmiques). Les effets sont

d'autant plus marqués et rapides que la concentration en EDTA est élevée (remplissage incomplet du tube). Enfin, des cas d'agglutination leucocytaire induite par l'EDTA et responsable de « fausses » leucopénies ont été rapportés.

Effets sur les plaquettes : il s'agit en pratique du principal inconvénient lié à l'utilisation de l'EDTA en cytologie.

L'EDTA induit tout d'abord un changement de forme des thrombocytes, de discoïde à sphérique, introduisant une erreur dans la détermination du volume plaquettaire moyen (VMP). Il existe une possibilité d'agrégation plaquettaire dans le tube contenant de l'EDTA, due à la présence d'anticorps sensibles à l'EDTA et provoquant une pseudo thrombopénie. Les compteurs électroniques basant leur reconnaissance des éléments figurés sur le volume, seules les plaquettes non agrégées sont décomptées. Le nombre de plaquettes rendu par l'automate est donc sous-estimé dans une proportion variable selon l'importance du phénomène d'agrégation, lui-même dépendant du délai avant analyse (il s'amplifie avec la durée de conservation du tube). Il est indispensable de rechercher des amas plaquettaires devant toute valeur basse de plaquettes rendue par l'automate, alarmée ou non, chez un sujet sans antécédent de thrombopénie, ou devant une aggravation importante d'une thrombopénie connue (en particulier proche du seuil transfusionnel théorique de 30 G/l).



Type de tube

Le tube de référence est le tube en plastique (ou indifféremment en verre silicé) sous vide, de 2 ou 4 ml.

Méthodologie

Lieu de prélèvement

Classiquement, le prélèvement est effectué au bras. Les veines du pli du coude sont généralement

choisies, en raison de leur taille qui assure un débit de sang satisfaisant et de leur faible mobilité

Réalisation du prélèvement

Il est indispensable de garantir le bien-être du patient lors de prélèvement, un patient détendu et coopérant améliore de beaucoup la probabilité d'obtention d'un prélèvement satisfaisant. Pour le site, il faut choisir une veine de calibre suffisant (pli du coude) permettant une ponction franche et un écoulement facile et rapide du sang dans le tube. Si le malade est perfusé, il est impératif de choisir le bras opposé à la perfusion en raison du risque de dilution du prélèvement. Celui-ci se traduit par une baisse artérielle de tous les paramètres mesurés de la NFS.

Le nettoyage de la peau s'effectue à l'alcool isopropylique à 70 %. Il faut laisser sécher à l'air, complètement, le site de ponction (risque d'hémolyse).

Durée de maintien du garrot

Une mise en place prolongée du garrot est connue pour générer une hémolyse et une hémocoagulation. Le retentissement de l'hémolyse sur la NFS n'est sensible que lorsqu'elle est intense (sous-estimation des érythrocytes et de l'hématocrite avec une valeur d'Hb juste et des constantes fausses). Il est recommandé de laisser le garrot moins de 1 minute et de l'enlever ou de le desserrer lorsque le sang commence à arriver dans le tube.

Ordre des prélèvements

En raison d'interférences possibles de l'EDTA avec les prélèvements destinés à d'autres analyses, le tube de NFS doit être prélevé parmi les derniers, après le tube sec, le tube citrate, le tube avec séparateur et le tube hépariné, sachant que certaines recommandations exigent que le tube EDTA soit parmi les premiers.

Remplissage du tube

Le remplissage doit permettre d'atteindre la concentration recommandée en anticoagulant EDTA. Le tube doit donc au mieux être rempli avec le volume attendu, selon le type choisi (dans une marge recommandée de $\pm 10\%$ selon le NCCLS). Toutefois, un tube EDTA peu rempli n'est pas en soi une non-conformité pour la réalisation d'une NFS. Le tube ne doit pas être trop rempli : il doit rester après remplissage un volume d'air représentant au moins 20 % du volume du tube. Ceci facilite à la fois le mélange sang/EDTA au moment du prélèvement (bonne anticoagulation) et l'homogénéisation du prélèvement avant le passage sur le compteur. Un remplissage excessif peut ainsi induire de « fausses polyglobulies ».

Mélange anticoagulant/sang

Il faut insister sur le fait qu'un prélèvement coagulé, même partiellement, est totalement impropre à la réalisation de la NFS : les taux de plaquettes, de globules rouges et de leucocytes sont sous-évalués, de façon aléatoire et plus ou moins dissociée selon l'importance de la coagulation du prélèvement. Le paramètre le plus sensible est probablement la numération plaquettaire, ce qui impose de rechercher un caillot devant toute valeur basse de plaquettes. Il s'agit d'une erreur préanalytique fréquente et souvent difficile à dépister par la suite en cours d'analyse. Il est donc essentiel de bien réaliser le mélange sang/anticoagulant immédiatement après le prélèvement par retournements successifs du tube. Celui-ci ne doit pas être agité mais retourné plusieurs fois doucement (8 à 10 fois).

Identification des échantillons et précautions avant le transport du tube au laboratoire

L'étiquetage des tubes ou à défaut leur identification manuelle est une étape pré-analytique essentielle commune à toutes les analyses de biologie (le préleveur doit faire confirmer son identité au patient personnellement). Un tube non étiqueté est non conforme et doit être rejeté. Le délai de traitement des échantillons ayant une importance en cytologie, la date et l'heure de prélèvement ainsi que le nom du préleveur doivent figurer sur le tube et/ou la demande d'accompagnement. Le prélèvement doit être acheminé le plus rapidement possible au laboratoire. Si la transmission est différée, les tubes sont conservés à température ambiante. Les chocs thermiques (type exposition au soleil ou au froid dans une voiture) ou mécaniques, susceptibles de provoquer une hémolyse, doivent être évités pendant le transport.

Traçabilité de la phase pré-analytique

Identification univoque du patient (comprenant le sexe et la date de naissance), nom et adresse du médecin prescripteur, type d'échantillon primaire, nature des analyses prescrites, date et heure de prélèvement, identité du préleveur, date et heure de réception au laboratoire et identité du responsable de la réception doivent être tracés et conservés sur papier ou sur document informatique.

Conservation des échantillons : stabilité des paramètres et recommandations relatives aux délais avant analyse

Les échantillons doivent être conservés le temps de la stabilité des paramètres pour permettre une éventuelle nouvelle analyse de contrôle après la validation des résultats. Les comités internationaux recommandent que le comptage automatique des éléments du sang veineux prélevé sur EDTA et maintenu à température ambiante soit effectué dans les 6 heures après le prélèvement. Ce délai est limité à 4 heures pour les prélèvements en microméthodes. La conservation des tubes au-delà de 24 heures n'est pas recommandée. Un frottis

sanguin doit être réalisé au mieux dans les 2 heures suivant le prélèvement, une fois fixé et coloré le frottis sanguin est parfaitement stable dans le temps.

Réalisation d'un frottis sanguin

Il s'agit d'une étape à la frontière des phases pré-analytique et analytique. Il peut être envisagé dans la pré-analyse en tant qu'étape de préparation de l'échantillon. Il est certain que sa qualité conditionne totalement celle de l'analyse proprement dite (analyse morphologique et formule leucocytaire au microscope).

Étalement

Les lames doivent être en verre, dégraissées, à bords rodés (à 45°), à pans coupés. Le sang doit s'épuiser progressivement tout au long du frottis, ni trop épais ni trop fin, dont la longueur doit représenter environ les deux tiers de la lame.

Identification des lames

L'identifiant doit être écrit lisiblement et avec une encre résistant aux réactifs de fixation et de coloration (ou au crayon à papier) ainsi qu'à l'huile d'immersion.

Séchage des frottis

Les frottis doivent sécher librement à l'air. Aucun artifice pour accélérer le séchage (agitation, séchoir) ne doit être utilisé. Ces méthodes peuvent en effet induire des changements morphologiques artéfactuels sur les leucocytes (contours cytoplasmiques).

Coloration

La coloration de référence est celle de May-Grünwald-Giemsa « standardisée ».

Analyse comme contrôle de la qualité de la phase pré-analytique

Les non-conformités des échantillons en hématologie cellulaire peuvent être totales (rejet de l'ensemble des paramètres) ou partielles (n'affectant qu'un ou quelques paramètres). Plusieurs de ces non-conformités peuvent et doivent être dépistées lors de la réception du prélèvement au laboratoire : identification, renseignements fournis, remplissage des tubes, date et heure de prélèvement. Mais beaucoup d'autres, pourtant potentiellement responsables d'importants artefacts pouvant influencer sur le résultat, sont totalement « masquées » à ce stade du processus : échantillon coagulé avec des microcaillots, ayant subi un choc

thermique, agrégation plaquettaire induite par l'EDTA, plasma lactescent, etc. Il est donc indispensable de dépister ces non-conformités lors de la phase analytique elle-même. Toute non-conformité constatée doit être communiquée rapidement au prescripteur

CCMH

La CCMH est le paramètre de validation technique de la NFS.

Une CCMH effondrée doit faire rechercher un prélèvement coagulé (sous-estimation des globules rouges). Une CCMH élevée (> 36) peut révéler :

- une anomalie technique liée à l'automate lui-même ;

- Une interférence dans la mesure des paramètres érythrocytaires liée au prélèvement (plasma hémolysé ou lactescent, présence d'une agglutinine froide);

- la présence d'hématies déshydratées (possiblement observées chez des sujets sous chimiothérapie, chez des brûlés, des patients positifs au virus de l'immunodéficience humaine, etc.)

Étude du frottis

Lors du décompte de la formule au microscope, si le résultat automatique a été rejeté, une observation simple de la morphologie des hématies et des leucocytes peut témoigner de la variation de plusieurs paramètres préanalytiques aboutissant à des non-conformités le plus souvent seulement partielles.

Connaissance des résultats antérieurs

Enfin, concernant à la fois l'analyse et la post analyse, la connaissance de résultats antérieurs est d'une grande importance. Une variation franche de la valeur du VGM entre deux analyses rapprochées dans le temps et en dehors de toute transfusion peut témoigner d'une erreur d'étiquetage. Une baisse importante sur tous les paramètres de la NFS suggère quant à elle l'existence d'une dilution ou d'une coagulation du prélèvement. Là encore la règle est de rechercher systématiquement la présence d'un caillot lorsque l'une ou plusieurs lignées sont abaissées.

Tableau 1.Recommandations générales pour les prélèvements de NFS

Toute non-conformité doit être communiquée rapidement au prescripteur			
	Recommandé	Acceptable	Non conforme
Identification et traçabilité	Nom prénom, date de naissance, sexe Heure de prélèvement Identité du préleveur et du prescripteur (et adresse)	Nom, prénom (le non renseignement de la date de naissance doit être signalé sur le résultat rendu sans valeur de référence)	Absence d'identification
Jeûne	Patient à jeun depuis plus de 12h	Pas de précision Non à jeun en circonstance d'urgence	Plasma lactescent en situation post prandiale (pour Hb et constantes érythrocytaire, sauf Hb calculé si disponible)
Anticoagulant	K2 ou K3 EDTA	Citrate ou CTAD (avec correction de 10%)	Autres anticoagulants, tube sec
Tube	Plastique ou verre siliconé sous vide Microtubes pour sang capillaire	Tube non prélevé sous vide	
Mélange sang anticoagulant			Prélèvement coagulé (quelle que soit la taille du caillot)
Remplissage	Adapté au vide (2ml ou 4ml) permettant l'homogénéisation Microprélèvement entre 200µl et 500µl	Inferieur au volume prévu (réaliser le frottis rapidement) Trop rempli (rechercher un caillot) Micro prélèvement : moins de 250 µl	Inferieur ou égal au volume aspiré par l'automate
Site	Veineux : bras opposé a la perfusion	Autres	Du coté et en amont de la perfusion
Garrot	Moins d'une minute	Plus d'une minute	
Place du tube	Dans les derniers tubes	Autres positions	
Température de transport	Température ambiante	+4°C	Choc thermique
Délai avant analyse	Numération < 12h Frottis < 6h Réticulocytes < 24h	Numération : > 12h et <24h Frottis >6h et <12h	Numération >24h Frottis >12h Réticulocytes >24h
Température de conservation	Température ambiante	+4°C	< 4 °C ou > 40°C
Frottis sanguin	Identification des lames Etalement dans les 6h Séchage a l'ai libre Coloration MGG standardisée	Coloration non standardisée	Mauvaise identification Etalement après 12 h Séchage accéléré Colorant de Giemsa périmé

Bibliographie :

1- GODON A, GENEVIEVE F, MARTEAU-TESSIER A, ZANDECKI M.2012. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire Partie 3. Hémoglobine, hématies, indices érythrocytaires, ANAES. *Lecture critique de l'hémogramme : valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non*

réticulocytes. *Annales de Biologie Clinique*, vol. 70, n° 2, p. .

2- TRIMOREAU F, GACHARD N et al .2011. Étapes préanalytiques pour la numération et cytologie sanguine. *EMC biologie clinique*, vol. 9, n°15, p 1-9.

3- Sites internet : *pathologiques* [en ligne]. [Consulté le 05/11/2013, 21/06/2014,07/08/2014].<http://www.hassante.fr/po_rtail/upload/docs/application/pdf/Hemogram.pdf>

Syndrome Hémorragique : Comment Procéder dans un laboratoire d'hémiobiologie ?

Partie 1 « Hémostase Primaire »

Hémiobiologie et transfusion sanguine

MISE AU POINT



Par Docteur **KKHEBRI Mouna-Khadidja**
LCBM-CLCC-Batna
khebrim@yahoo.fr

Résumé :

L'hémostase est un processus complexe qui permet de rétablir la circulation du sang dans les vaisseaux après une brèche vasculaire. Elle est faite de trois phases, qui sont bien intriquées, soigneusement chevauchées et continuellement régulées : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. L'hémostase primaire est l'ensemble des phénomènes qui aboutissent au colmatage initial d'une brèche vasculaire par formation d'un caillot essentiellement plaquettaire.

Mots clés : Hémostase Primaire, Syndrome hémorragique, Plaquettes, Protéines adhésives

Introduction :

La balance de l'hémostase physiologique peut être déséquilibrée à l'occasion de multiples pathologies hémorragiques ou thrombotiques, et la connaissance des bases physiopathologiques de ce groupe de maladies permet de développer différents tests d'exploration qui sont plus ou moins spécialisés pour explorer les anomalies des trois phases, soit indépendamment et de façon spécifique soit globalement.

Conduite à tenir devant une anomalie hémorragique de l'hémostase primaire :

Devant tout syndrome hémorragique, le biologiste doit procéder de façon structurée selon un arbre décisionnel bien établi :

1. Pousser l'interrogatoire :

A la recherche d'antécédents personnels ou familiaux, la nature de cette hémorragie (cutanéomuqueuse ou profonde ...), l'histoire de début de cette anomalie, son caractère spontané ou provoqué, prise médicamenteuse, retentissement général, caractère récidivant ou pas ...

Une fiche de renseignement, établit par le biologiste peut être utilisée et remise au médecin traitant.

2. Dépistage d'une anomalie de l'hémostase primaire :

Devant une hémorragie cutanéomuqueuse :

Il s'agit très probablement d'une anomalie d'un ou des acteurs de l'hémostase primaire (plaquettes, paroi vasculaire, protéines adhésives : Fibrinogène, Facteur Von Willebrand).

Un bilan d'orientation doit être lancé comportant :

- Une Numération Formule Sanguine : à la recherche d'une thrombopénie qui peut expliquer le syndrome hémorragique.
- Un frottis sanguin Périphérique : coloré au MGG, permet d'éliminer d'éventuelle fausse thrombopénie qui peut être due à :
 - Agglutination in-vitro EDTA-dépendante

- Satellitisme des PLTs
- Présence de PLTs
- Coagulation partielle (prélèvement non conforme)

- Un temps de saignement : Mesure du temps qui s'écoule entre la création au niveau cutané d'une brèche vasculaire et l'arrêt du saignement ainsi provoqué. C'est un test global qui explore toute l'hémostase primaire, se réalise selon la technique d'Ivy (incision au niveau de l'avant-bras)

Il va de 4 à 8 minutes en absence d'anomalies d'hémostase Primaire. Par contre, il est à proscrire si taux de plaquettes est inférieur à 50G/L, l'hématocrite est inférieure à 25%, ou chez un malade ayant pris un AINS dans moins de 10 J.

- Temps d'occlusion plaquettaire : Mesure de la capacité d'un échantillon de sang total à former, in vitro, un clou plaquettaire en condition de flux à fort taux de cisaillement (processus d'adhésion et d'agrégation plaquettaire).

Le sang total est aspiré et passe au travers d'une membrane operculée recouverte de collagène associé à un autre agent inducteur de l'agrégation plaquettaire (ADP, Adrénaline), les plaquettes sont activées et en présence du facteur Von Willebrand et de fibrinogène obturent l'opercule : temps d'occlusion mesuré. C'est un test avec une bonne sensibilité, les valeurs normales de ce test diffèrent selon l'agoniste utilisé (épinéphrine ou ADP) ne dépassant pas les 160 et 120 secondes respectivement.

Il a les mêmes contre-indications que le temps de saignement (précédemment citées).

En pratique, les tests de coagulation (TP, TCK, Taux de fibrinogène) sont habituellement

réalisés, revenant dans la plus parts des cas normaux.

3. Tests à visée diagnostique :

✓ Tests explorant les Thrombopathies :

- Etude des Fonctions plaquettaires par agrégométrie : C'est la mesure, au moyen d'un agrégomètre, de la capacité des plaquettes à s'agréger en présence d'agents agrégeant. Consiste à mesurer en continu l'augmentation de la transmission lumineuse causée par la formation des agrégats. Pour l'exploration d'une thrombopathie, 05 agonistes sont utilisés en pratique (L'ADP, la Ristocétine, le collagène, l'acide arachidonique. L'épinéphrine).
- Etudes des Glycoprotéines plaquettaires :
 - Techniques électrophorétiques
 - Technique de Cytométrie en flux
- Etude des granules plaquettaires :
 - Par microscopie Electronique
 - Par étude de la sécrétion plaquettaire

✓ Tests explorant le Facteur Von Willebrand (VWF) :

- Dosage Quantitatif (antigénique) : par plusieurs techniques : ELISA ..
- Etude des activités fonctionnelles
- Etude des différentes liaisons du VWF
- Dosage Facteur VIII
- Recherche des anticorps anti-VWF.

✓ Tests explorant le Fibrinogène :

- Dosages Quantitatifs et Qualitatifs
- Etude des Dysfibrinogénémies

✓ Biologie Moléculaire :

A la recherche des différentes mutations génétiques, par différentes techniques

✓ Tests explorant la paroi vasculaire :

Dans le cadre d'une vascularite ou une maladie de système, par des techniques d'immunologie bien spécifique et hautement spécialisée.

Conclusion :

Les tests explorant l'hémostase primaire sont nombreux, et vastes, leur réalisation et leur interprétation nécessitent une attention particulière de la part du biologiste pour ne pas tomber dans des situations trompeuses.

L'enchaînement de ses tests doit suivre un algorithme décisionnel établi suite à l'interrogatoire préalablement entretenu avec le malade.

Le diagnostic de certitude d'une anomalie génétique de l'un des acteurs de l'hémostase primaire impose la réalisation d'une enquête familiale, pour éventuel dépistage d'autres porteurs de la même anomalie au sein de la même famille et permet de donner un conseil génétique.

Bibliographie :

- 1- P.-E. Morange, H. Chambost, M.-C. Alessi. Introduction à la démarche diagnostique de l'hémostase ; 2014, 13-018-M-10
- 2- I. Elalamy. Thrombopathies acquises et congénitales. EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-021-A-10, 2016.
- 3- S. Bellucci. Physiologie de l'hémostase primaire. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 13-019-A-05, 2002
- 4- MC Trzeciak, JC Bordet. Exploration de l'hémostase primaire. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 13-019-A-10, 2002

Erreur de détermination de la NFS par les automates d'hématologie cellulaire.



Partie 1 : Erreur de détermination du taux de l'hémoglobine

Hémobiologie et transfusion sanguine
MISE AU POINT

Par Docteur N. Benkhelfallah
CLCC-Batna

Mail : Nabila.benkhelfallah@gmail.com

Résumé

L'hémoglobine (Hb) est une protéine qui contient du fer, et qui donne au sang sa couleur rouge. Lorsque le niveau d'hémoglobine apparaît inférieur aux niveaux normaux, cela signifie qu'il existe une anémie, qui peut être due à plusieurs causes. Si Hb est élevée, cela peut être due à des cardiopathies, à une déshydratation, ou à un séjour passé en hauteur. Le dosage l'hémoglobine par la méthode colorimétrique (Cyanhémoglobine) est connue comme méthode de référence. Les indices érythrocytaires mesurés par les automates d'hématologie, utiles à la démarche diagnostique des anémies, doivent également être considérés comme les premiers messages *d'alerte* pour détecter une erreur de détermination de l'Hb (1).

Mot clés : indices érythrocytaires, signal alarme hémogramme.

Plusieurs situations perturbant la mesure de l'hémoglobine citant :

1. **Les lipides et l'hyperchylomicronémie** : causent une turbidité excessive dans les cuves de lecture (2). De multiples actions correctrices peuvent être utilisées afin d'appréhender ce type d'anomalies
 - ✓ **Actions correctrices** :
 - a. L'utilisation des automates qui mesurent l'Hb intra érythrocytaire (CHCM) par la méthode diffraction optique (Siemens Advia, Sysmex).
 - b. Un remplacement isovolumétrique du plasma par un diluant iso-osmotique ou extraction à l'éther des lipides.
 - c. Un calcul approximatif de la valeur de l'Hb à partir de la valeur de l'Ht centrifugé est utilisable en situation d'urgence (3).
2. **Les grandes hyperleucocytoses** : Liées à la destruction d'un nombre élevé de GB par les agents d'hémolyse.
 - **Actions correctrices** :
 - a. L'addition d'un mélange particulier d'agents lytiques et de détergents avant la mesure de l'Hb (Sysmex).
 - b. La dilution du prélèvement sanguin
 - c. Les méthodes de déleucocytation par centrifugation ménagée et échange de plasma riche en leucocytes avec du diluant
 - d. Mesure de La CHCM.
3. **L'excès d'immunoglobulines** par interaction avec les solutions de lyse signalant une alarme CCMH >36g/dl. Elle a été décrite chez des patients présentant une macroglobulinémie de Waldenström ou un myélome multiple.
 - **Actions correctrices** :
 - a. Changer la méthode de dosage (sans cyanure)
- b. Déterminer "l'Hb plasmatique" après centrifugation de l'échantillon, qui donne la turbidité liée à la paraprotéine, puis de retirer ce résultat de l'Hb mesurée à partir du sang total (4).
- c. Mesure de La CHCM par diffraction optique.
- d. Dilution de moitié de l'échantillon avant analyse (sysmex).
4. **Les crvoglobulines** causent Une fausse augmentation de l'Hb mais parfois les anomalies de flux liées à l'hyperviscosité causent sa diminution (aussi les GR)
5. **Hémolyse** : cause une fausse augmentation observée Signalant une alarme : CCMH >36g/dl
 - **Actions correctrices** :
 - a. Réaliser l'analyse rapidement après le prélèvement dans les grandes hémolyses
 - b. Meure de la CHCM par diffraction optique.
6. **La bilirubine** interfère rarement au moins pour des concentrations allant jusqu'à 400 mol/L
7. **La structure chimique de l'hémoglobine** le complexe Hb-monoxyde de carbone peut induire une fausse augmentation de la valeur de l'Hb (5).

Conclusion: L'optimisation du traitement informatique des données a permis de proposer **des messages d'alerte** d'abord généralistes puis de trouver les critères discriminatifs. Ceux-ci incitent progressivement les fabricants à

développer des améliorations techniques correctrices des anomalies analytiques intrinsèques de chaque technologie utilisée.

Bibliographie :

1. Alban Godon Franck Genevieve Anne Marteau Tessier Marc Zandecki Anomalies et erreurs de détermination de l'héogramme avec les automates d'hématologie cellulaire Partie 3. Hémoglobine, hématies, indices érythrocytaires, réticulocytes. Ann Biol Clin 2012 ; 70 (2) : 155-68

2. Mayan H, Gurevitz O, Mouallem M, Farfel Z. Multiple spurious laboratory results in a patient with hyperlipemic pancreatitis treated by plasmapheresis.

Isr J Med Sci 1996 ; 32 : 762-6.

3. Savage RA. Analytic inaccuracy resulting from hematology specimen characteristics. Three cases of clinically misleading artifacts affecting white blood cell and platelet counts. Am J Clin Pathol 1989 ; 92 : 295-9.

4. Roberts WL, Fontenot JD, Lehman CM. Overestimation of hemoglobin in a patient with an IgA-kappa monoclonal gammopathy. Arch Pathol Lab Med 2000 ; 124 : 616-8.

5. Vinatier I, Flandrin G. Avantages et limites de l'héogramme automatisé. Rev Prat 1993 ; 7 : 69-73.

Renseignements cliniques pour un biologiste

Microbiologie clinique

MISE AU POINT

Par Docteur MERZOUGUI Noudjoud

I-Introduction :

La biologie médicale occupe une place centrale dans la médecine moderne. car elle contribue à environ **60 à 70 %** des diagnostics réalisés. Les renseignements cliniques font partie intégrante des examens de biologie médicale, intervenant à l'étape pré-analytique, dans le choix des analyses à réaliser, et à l'étape post-analytique, dans l'interprétation contextuelle des résultats. Le biologiste s'appuie sur ces renseignements cliniques pour adapter si besoin, avec l'accord du clinicien, la prescription et réaliser les examens les plus pertinents pour conduire au diagnostic ou assurer le suivi thérapeutique.

Malgré les obligations réglementaires, les prescripteurs semblent peu sensibilisés à ce problème. Mais, les biologistes sollicitent-ils suffisamment leurs confrères ?

II-Causes de l'insuffisance de renseignements cliniques : L'insuffisance de renseignements cliniques accompagnant les prescriptions de biologie médicale est un sentiment répandu au sein de la communauté des biologistes. Les causes sont diverses :

Manque de temps des médecins, Ignorance de l'utilité des renseignements cliniques pour le biologiste, Désintérêt du médecin pour le travail du biologiste, L'habitude,.....

III-Contenu de la fiche de renseignements cliniques :

- Nom
- Prénom
- Date de naissance
- Date et heure de prélèvement doivent être mentionnées sur la fiche de prélèvement de biologie médicale
- nature et localisation du prélèvement
- traitement en cours ou pris auparavant (antibiothérapie, anticoagulant ...)
- terrain : neutropénie, immunodépression, grossesse
- principaux signes cliniques...
- les antécédents du patient
- l'historique des voyages et expositions
- le motif de la consultation
- **urgence** de la réponse (examen direct/cytologie) : indispensable si

suspicion d'endocardite (le laboratoire doit être impérativement prévenu)

- objectif de la demande (diagnostique, thérapeutique, pronostique, épidémiologique – portage) : surtout s'il s'agit d'une suspicion d'endocardite infectieuse, d'une méningite ou d'une méningo-encéphalite.

IV-Exemples de renseignements cliniques à obtenir :

• **En biochimie :**

Exemple : marqueurs (cardiaques, tumoraux, endocriniens), voire de bilans électrolytiques ou inflammatoires, etc. Toute information ou interrogation du prescripteur amène le biologiste à mieux interpréter et/ou à compléter la prescription grâce à sa compétence de spécialiste de la biologie médicale.

• **En hématologie :**

Exemple dans le bilan d'hémostase, l'INR : La connaissance du nom de l'AVK, de la dose prescrite, de l'heure de la prise, de l'objectif thérapeutique (préventif ou curatif) constitue des éléments informatifs incontournables

• **En bactériologie :** Les techniques microbiologiques étant très diverses, les renseignements cliniques fournis par le service sont primordiaux pour assister le laboratoire, afin ensuite de distinguer une contamination par une flore commensale d'une colonisation ou d'une infection réelle. il est important, autant pour le clinicien que pour le bactériologiste, de définir l'objectif de l'analyse, de savoir ce qu'il en attend précisément.

• **En sérologie infectieuse :**

Les prescriptions chez la femme enceinte relèvent d'une systématisation réglementaire. Point n'est donc besoin de renseignements (sauf situation particulière de la patiente).

En revanche, dans des situations plus banales, des informations complémentaires méritent d'être acquises, y compris pour des vérifications d'immunisation post vaccinales.

• **En auto immunité**

Les affections du système conjonctif et des articulations, couplées au système immunitaire, sont probablement parmi les plus difficiles à renseigner, le prescripteur partant souvent (passez-moi l'expression) « à la pêche » aux signes biologiques. LED, syndrome des antiphospholipides, PR, sclérodermie, polymyosite,

vascularite sont autant de pathologies où le partenariat clinicien-biologiste sera d'autant plus efficace qu'ils se parleront, discuteront sur les résultats des examens, évoqueront ensemble des examens complémentaires. Les résultats des HEP2, des tri-substrats ne se délivrent pas hors de ce contexte de communication, chaque fois que la réponse appelle des investigations secondaires.

• En biologie moléculaire

En ville : le plus souvent la pratique du moment se limite à une PCR chlamydiae. Un dialogue constructif a été établi (généralement) avec le gynécologue. La qualité du prélèvement est fondamentale

En milieu hospitalier : tout dépend du « menu » proposé par le LBM. Dans tous les cas, notamment ceux du VIH, du VHC et du VHB, la fusion des compétences biologiste/clinicien est une évidence factuelle. La quantification de la charge virale, le génotypage pour l'évaluation de la sensibilité aux ARV, le choix des thérapeutiques ne peuvent pas se dispenser de cette promiscuité intellectuelle et scientifique.

• En immuno-hématologie :

La demande est souvent associée à une prévision d'hospitalisation pour intervention chirurgicale. La prescription « GR-RH/Phéno » correspond à une entrée programmée en clinique (bilan de l'anesthésiste).

• En pharmacologie

Exemple : un « lithium » ou une « dépakine », le biologiste cherchera à obtenir les renseignements nécessaires à la bonne interprétation du dosage (nom, dose, heure(s) de prise (PK et PC) ; thérapeutique(s) associée(s).

NB : Précision : tout renseignement inscrit sur une ordonnance ne peut en aucun cas relever de la violation du secret médical.

Conclusion : Les renseignements cliniques sont les éléments d'informations permettant au laboratoire de connaître le contexte médical de la demande d'analyses, afin de faciliter l'interprétation des résultats ou la prise en charge du patient.

Il est important de sensibiliser les prescripteurs via des méthodes de communications individuelles (courrier, mail) ou collectives (réunions en soirée pour les médecins libéraux ou staffs à l'hôpital) et de mettre à disposition des prescripteurs des exemples de fiches de renseignements, en plus, Le laboratoire de biologie médicale doit s'attacher à obtenir les renseignements cliniques pertinents permettant la réalisation des examens appropriés et de rendre des résultats interprétés'

Bibliographie :

Thèse pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE Présentée et soutenue publiquement Par Monsieur Damien, Olivier DESPAS 2015 Titre de la thèse Insuffisance de renseignements cliniques sur les prescriptions de biologie médicale. Points de vue croisés des prescripteurs et de biologistes

Ref : INS-MU0-139-01 Version : 01 - Page 1 sur 1

La leucocidine de Panton et Valentine



Par Docteur N.H KOUDA
kouhoda@yahoo.fr

Microbiologie clinique

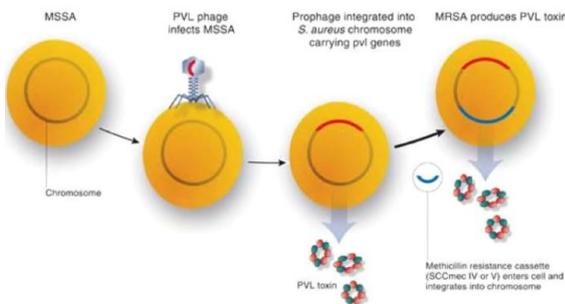
MISE AU POINT

Introduction :

L'espèce *Staphylococcus aureus* produit un certain nombre de molécules qui vont lui permettre de « Tromper » les réponses immunitaires innées de l'hôte. Ces facteurs de virulence incluent des cytotoxines, capables de provoquer la lyse de différentes cellules en formant des pores dans leur membrane cytoplasmique. L'une de ces leucotoxines est la leucocidine de Panton-Valentine (PVL). La LPV a été découverte en 1894 par Van de Velde. Panton et Valentine ont mis en évidence son activité leucotoxique en 1932 ainsi que son implication dans certaines infections cutanées (furuncles).

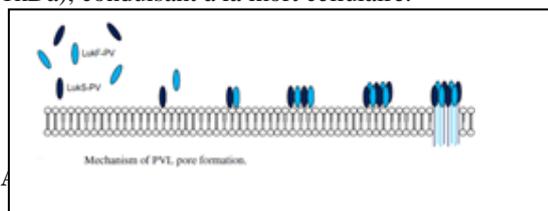
Structure et mode d'action de la PVL :

La leucocidine est une toxine synergohyménotrope. Cette famille de toxines est composée de deux sous-unités qui agissent de façon synergique pour lyser la membrane cellulaire. La LPV est constituée d'une protéine de classe S codée par le gène lukS-PV et d'une protéine de classe F codée par lukF-PV. Ces gènes sont portés par des bactériophages en particulier le SLT et transférés au *Staphylococcus aureus* par phénomène de



conversion lysogénique.

La PVL est une cible cytotoxique des polynucléaires neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Ces 2 sous unités S et FS 'assemblent en plusieurs étapes sur la paroi membranaire des cellules cibles, en se fixant sur des récepteurs du complément humain, sous la forme d'une molécule octamérique agissant comme une protéine transmembranaire intégrale « pores transmembranaires », permettant la fuite d'ions et de petites molécules (poids moléculaire d'environ 1kDa), conduisant à la mort cellulaire.



La leucocidine de Panton-Valentine est produite principalement (mais pas exclusivement) par les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline ou SARM. Ces derniers sont plus fréquemment d'origine communautaire et non hospitalière.

Ces souches ont un tropisme cutané marqué et peuvent être responsables d'infections cutanées sévères, à type de furoncles, mais parfois également d'anthrax, d'abcès, de dermo-hypodermite, de fasciite nécrosante et d'impétigo.



D'autres formes plus graves peuvent s'observer : la pneumonie nécrosante communautaire qui survient généralement chez l'enfant et l'adulte jeune sain au décours d'un syndrome pseudo-grippal.

Le tableau associe typiquement une hémoptysie, un épanchement pleural, des infiltrats alvéolaires multilobaires extensifs, une leucopénie et une aggravation vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë le plus souvent associé à un état de choc. L'issue est fatale dans 50 % des cas.

Les données anatomopathologiques révèlent une atteinte importante de l'arbre respiratoire. La trachée et les bronches sont ulcérées et nécrosées, recouvertes de sécrétions hémorragiques. Les poumons sont augmentés de volumes, durcis et hémorragiques. Microscopiquement, on retrouve dans les lésions des colonies de *S aureus* en grande quantité. Les alvéoles pulmonaires sont très hémorragiques. Des abcès de petite taille dans les poumons, mais aussi dans le cœur (accompagnés de nécrose myocardique), ont été décrits.



Des arthrites, des médiastinites, des ostéomyélites pelviennes et des thrombophlébites septiques sont également possibles.

Prévention et traitement :

La prévention des infections bactériennes repose sur les règles élémentaires d'hygiène.

Avant la prescription du traitement, un antibiogramme est recommandé. Il permet d'adapter l'antibiothérapie suivant la résistance et la sensibilité de la souche (cas des SARM). La clindamycine, la lincomycine (lincosamides) et le linézolide enrayent la traduction des protéines et donc la synthèse de la leucocidine. Ainsi, certaines souches isolées ont une résistance inductible à la clindamycine empêchant l'utilisation de cette molécule. La rifampicine et les fluoroquinolones, notamment la lévofloxacine et la moxifloxacine, font partie de l'arsenal thérapeutique. Pour la daptomycine, il a été démontré que son effet in vitro était remarquable contre les souches PVL+ mais, son activité est inhibée in vivo par le surfactant pulmonaire. Une association d'immunoglobulines G polyvalentes, permet une neutralisation directe de la toxine si signes associés à la mortalité (ex leucopénie profonde) ou choc toxinique.

Certaines classes d'antibiotiques comme les bêta-lactamines (amoxicilline) ou les glycopeptides (vancomycine) provoquent une libération massive de la leucocidine.

Conclusion

Les infections à *S. aureus* PVL+ sont des entités moins fréquentes mais potentiellement sévères. Une reconnaissance précoce des premiers signes est essentielle ; certains tableaux imposant une admission en unité de réanimation pour une prise en charge adaptée spécifique. Compte tenu du risque d'aggravation rapide des lésions, une antibiothérapie à visée anti toxinique, parfois associée à des Ig IV, semble primordiale dans les formes graves alors que d'autres cas relèvent d'une prise en charge « standard ». La connaissance des facteurs associés à la gravité est donc fondamentale.

Bibliographie :

1-NAWROTEK, Paweł, KARAKULSKA, Jolanta, et FIJALKOWSKI, Karol. The Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin (PVL). In: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. Academic Press, 2018. p. 117-125.

2-PIEMONT, Y. Les toxines synergohyménotropes des staphylocoques. *Médecine et maladies infectieuses*, 1997, vol. 27, p. 135-142.

3-HAIDARA, Wafaa. Pneumopathie nécrosante à *Staphylococcus aureus* producteur de Leucocidine de Panton et Valentine d'origine communautaire à propos d'un cas clinique. 2010. Thèse de doctorat.



Faut-il corriger la découverte des antibiotiques ?

A qui revient le mérite ?

Microbiologie clinique

Par Professeur A. KASSAH-LAOUAR

LCBM-CLCC-Batna

prkassah@yahoo.fr

En dehors de la définition d'un antibiotique qui est passée par plusieurs terminologies et qui ne peut s'arrêter qu'avec la disparition du dernier antibiotique, actuellement la plupart des scientifiques dans le domaine de la microbiologie sont d'accord que l'ère de la microbiologie moderne a commencé particulièrement le **03 août 1857 à Lille en France**, lorsque pour la première fois un éminent savant de l'époque Louis Pasteur présenta à l'université un mémoire traitant de la transformation des matières organiques par des microorganismes vivants non visibles à l'œil nu, thèse soutenue publiquement : **<fermentations lactiques>**. Pasteur, homme de science, persévérant, travaillant sur des phénomènes physiques, chimiques puis médicaux d'abord d'ordre vétérinaires puis humains lui ont permis de révolutionner le monde des sciences médicales et la biologie particulièrement le domaine de la microbiologie moderne qui l'a créé. A partir de ce moment deux voies essentielles vont s'amorcer : d'une part mettre en évidence les agents pathogènes responsables des maladies infectieuses mortelles et d'autre part trouver le remède pour lutter contre ses agents morbides qui ne sont que des microbes.

Dans ce contexte, la lutte va s'orienter d'elle-même et va emprunter deux voies différentes, dans un premier temps, on songe à stimuler l'immunité et à protéger l'individu d'une façon active par les vaccins ou d'une façon passive par l'utilisation de sérums et dans 2^{ème} temps c'est l'utilisation de substances étrangères à l'organisme pour lutter contre les agents infectieux. Cette dernière va s'ouvrir sur une voie miraculeuse qui durera six décennies et qui a commencé par l'utilisation des sulfamides découverts en 1935 par G. Domagk, qui le premier a permis à cette substance de faire une entrée fracassante sous le nom de protosil qui s'est prolongé pour donner plus tard les antibiotiques comme la streptomycine et la pénicilline.

La question posait, à qui doit-on attribuer la paternité de la découverte des antibiotiques ?

Les jurys du prix Nobel de médecine ont couronné le trio britannique, Fleming, Chain et Florey et l'américain S. Waksman, ce qui a divisé le monde scientifique en deux, particulièrement en ce qui concerne la découverte de la pénicilline, qui est le **bienfaiteur** de l'humanité ; Fleming ? ou Chain et Florey ?

Il faut être patient et revoquant la découverte des antibiotiques dans le temps.

Les premières observations dataient de l'ère pastorienne précisément en 1857 ou Louis Pasteur annonce au monde le nouveau temps de la microbiologie moderne suivi par le pressentiment de l'antagonisme bactérien en 1877 (Pasteur-Joubert) qui ouvrait sur les plus grandes espérances thérapeutiques. Malgré que l'antagonisme bactérien ait été décrit avant la période Fleming, au temps de Pasteur (1877), puis dix ans plus tard en 1887 sur les observations du jeune médecin français Ernest Duchesne (1887) qui fut le premier à remarquer le pouvoir antibactérien des moisissures du genre *Penicillium* et à envisager des possibilités thérapeutiques, mais son travail était trop précurseur et n'eut pas de suite.

A la fin des années 1920, Fleming a eu le gré d'avoir repéré au sein des antagonismes des bactéries, l'action du *Penicillium notatum* sur le staphylocoque, ensuite d'avoir cultivé la moisissure et d'en avoir recueilli le bouillon, mais sans jamais en extraire la moindre purifiée et sans jamais avoir la réflexion que ce pouvait guérir et sauver l'humanité.

C'est là le comble de la découverte, à qui revient le mérite ? L'histoire de la découverte doit être profondément revue, car en dehors des chercheurs qu'on connaît sur lesquels s'appuient la communauté scientifique, il y a ceux qui font partie des chercheurs de l'ombre, il faut revoir les dates historiques de cette découverte de même les chercheurs oubliés parfois de l'histoire. L'histoire doit être revue en totalité et rendre la gloire à ce qui la mérite.

- 03 août 1857, L. Pasteur et les mémoires sur la fermentation lactique, phénomène causé par des êtres vivants microscopiques ayant un pouvoir transformant.
- 16 juillet 1847, Pasteur et Joubert et la notion d'antagonisme bactérien.
- 1887, E. Duchesne et la concurrence vitale entre moisissures et bactéries.
- 1889, R. Emmerich et la pyocyanase.
- 1889, P. Villemin crée le mot antibiose et l'adjectif antibiotique.
- 1903, P Ehrlich découverte le TrypanRöd (premier antibiotique anti-parasitaire)
- 1909, P. Ehrlich découverte le Salvarsan (606), puissant anti-syphilitique.

- 1921, E. Fourneau synthétise le Stovarsol (anti-microbien peu toxique dérivé de l'arsenic).
- 1927, Papacostas et Galé tentatives malhabiles de bactériothérapie.
- 1927-39, R. Dubos et l'approche originale de la production d'antibiotique telle que la gramicidine.
- 1927, R. Dubos, spécialiste de la microbiologie du sol isole un germe inconnu du sol capable de détruire la capsule du pneumocoque, ère des antibiotiques a vu le jour, bien que cette substance découverte soit un enzyme.
- 1927-39, Shiller et Weindling purifient la gliotoxine isolée à partir *Trichodera Lignorum*.
- **1928**, A. Fleming et la redécouverte de la pénicilline à l'hôpital Saint Mary
- 1935 G. Dogmak synthétise le Prontosil anti-microbien général.
- 1935, J. Tréfouel et C Levaditi démontrent que l'activité antibactérienne des sulfamides dérive du Prontosil.

L'enzyme de Dubos ne sert à rien devant les nouvelles découvertes.

- 1938-40, R. Dubos poursuit ses études, isole *Bacillus brevis* et produit avec son équipe de grandes quantités de gramicidine. La surprise était que la substance isolée n'est pas un enzyme, mais un oligopeptide actif sur toutes les bactéries à Gram positif et non sur le staphylocoque seul.
- 1939, E. Chain résoud une énigme posée par Fleming en 1928 et qui préoccupait par H. Florey qu'était le lyzozyme isolé des larmes et de la salive et qui a un rôle destructeur sur *Micrococcus lyzodeikticus*. Chain entreprit l'extraction de la pénicilline sous l'impulsion de son ami Florey.
- 1939, R. Dubos et R. Hotchkiss isolent, à l'Institut Rockefeller de New York, la thyrotricine (ou gramicidine).
Il faut noter que ce sont les travaux de Dubos qui ont motivé et lancé Florey sur la voie des antibiotiques d'une par et le flair de Chain dès 1938 l'avait mis sur la piste de la pénicilline de Fleming ; qui n'était qu'un bouillon de culture inerte et désespéré.
- 1940, S. Waksman sur la voie de Dubos arrivait à mettre au point deux antibiotiques produits par des actinomycètes ; l'actinomycine antibiotique anti-cancéreux et la streptothricine.

- 1944, S. Waksman découvre la streptomycine, antibiotique actif contre les **bactéries** Gram négatives et, surtout, contre le **bacille de Koch** (traitement antituberculeux).
- 1945 Fleming, Florey et Chain reçoivent conjointement le prix Nobel de physiologie ou médecine pour la découverte, l'isolement et l'emploi thérapeutique de la pénicilline.
- 1946 Débuts de la préparation industrielle et de la commercialisation des **antibiotiques**.

Les recherches se sont déroulées indépendamment dans les deux camps, Waksman a, après René Dubos et avant Howard Florey, mis toute son énergie et ses connaissances des *actinomycètes* au service de la recherche antibiotique. Ne pas relier la découverte des antibiotiques au trio Fleming-Chain et Florey certes s'étaient des précurseurs, mais les antibiotiques pouvaient être découvertes même avec un peu de recul. R. Dubos paraît être un précurseur non cité par les historiens de la médecine, le mérite lui revient car il a tracé la route de la réussite et de la persévérance pour son ex.maître Waksman qui a su utiliser avec clairvoyance la série parfaite des travaux de son ancien élève. Un jour on dit à Waksman d'une façon assez méchante que sans la pénicilline, il ne serait rien, il répliqua d'une façon assez brutale « **La ruée vers l'or revient à l'isolement de la Gramicidine par Dubos et il est possible que la pénicilline soit un de ces cailloux** ».

Si on classe la découverte des antibiotiques, il faut savoir que le mérite revient à l'ensemble, précurseurs et chercheurs découvreurs sans oublier Pasteur, Joubert Villemin, Duchesne, Dubos, Domagk, Fleming, Chain, Florey, Tréfouel, Waksman,...

Personne n'aurait pu inventer la pénicilline, elle existait de temps immémorial, par la nature et par une certaine moisissure comme le déclarait A. Fleming dans son discours de réception à l'Académie de médecine à Paris le 04 septembre 1945.

Par la même occasion le 5 septembre 1945, au cours d'un dîner à Paris, en réponse à un propos laudatif de Georges Duhamel, Fleming protesta: « **Je ne suis rien sans Pasteur** » ; et dans une autre occasion : « **Pasteur était un génie. Il observait les choses et, ce qui est plus, il mesurait leur valeur et voyait ce qu'elles signifiaient. Une expérience de Pasteur était si décisive qu'elle en valait cent. La preuve en est qu'il pouvait toujours la répéter avec succès** ».

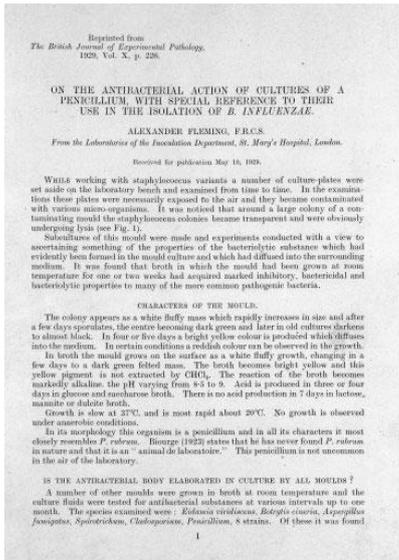
Et il répliqua pour Lister, lors de la réception d'une médaille d'or par Lord Webb Johnson, président du Royal Collège of Surgeons, Fleming, au vu des notes de travail de Lister, répondit de façon circonstanciée :

« Il est bien dommage que cette expérience de novembre 1871 n'ait pas abouti. Lister a eu l'idée de la pénicilline, mais il a cultivé la mauvaise moisissure, ou la mauvaise bactérie, ou les deux. Si le sort avait été bienveillant pour lui, l'histoire de la médecine

aurait été changée et Lister aurait vu, de son vivant, ce qu'il avait toujours cherché : un antiseptique non toxique».

« Lister aurait certes été heureux si telle chose lui était arrivée. »

On peut conclure quelques fois que le hasard fait les choses et les précurseurs jouent un rôle déterminant dans la progression de la recherche scientifique et la découverte, malgré que beaucoup d'entre eux fussent être oubliés.



1929. British Journal : *penicillium notatum*



1935 un des échantillons de moisissures que conservait Fleming



Implication du microbiote mammaire dans le cancer du sein

Par Docteur Kourar Imene

imenekourar@gmail.com

Introduction :

L'homme n'héberge pas un mais plusieurs microbiotes entretenant une relation de symbiose et ayant un rôle clé dans l'équilibre corporel.



C'est à la mode de parler du microbiote intestinal notre* DEUXIEME CERVEAU* qui a un impact sur notre santé physique et psychique, mais ce que l'on ne savait pas, ou presque, c'était que le tissu mammaire n'était pas stérile et qu'il héberge une flore microbienne spécifique et différente selon l'état de santé de chaque individu, c'est le **microbiote mammaire**.

Ainsi, toute modification de la composition de ce microbiote prédisposerait à un risque de maladie plus élevé.

Le cancer du sein est la principale cause de décès par cancer chez les femmes. Le sein comprend un épithélium, un stroma et un système immunitaire muqueux constituant un microenvironnement complexe. Certaines études ont récemment identifié des communautés microbiennes distinctes dans les tissus mammaires des femmes atteintes de tumeurs malignes par rapport aux femmes saines ce qui suggère que la composition des micro-organismes dans le sein pourrait jouer un rôle en augmentant ou en diminuant le risque de cancer.



Une étude originale :

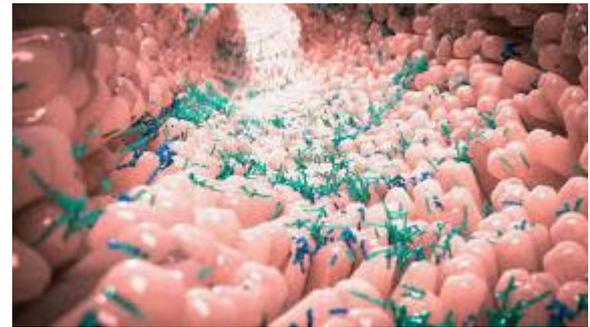
L'implication du microbiote dans le microenvironnement tumoral reste aujourd'hui peu connue. Afin de mieux développer cette hypothèse

Microbiologie clinique
MISE AU POINT

des chercheurs ont analysé l'ADN bactérien trouvé dans des échantillons de tissu mammaire de 58 femmes qui serait soumise à une ablation complète du sein par mastectomie en raison de tumeurs bénignes ou malignes, ainsi que des échantillons de 23 femmes en bonne santé ayant subi une réduction ou une augmentation mammaire. Les chercheurs ont tout d'abord déterminé par séquençage de l'ARNr 16S les groupes bactériens les plus représentés. Ensuite une analyse bio-informatique a permis d'identifier les associations entre profil bactérien et profil transcriptomique de la zone tumorale.

Résultats impressionnants : des bactéries associées au tissu tumoral :

Les femmes atteintes de cancer du sein présentaient un microbiote composé majoritairement par *Escherichia coli* et d'autre entérobactéries, *Staphylococcus epidermidis* et les *Bacillus*, tandis que chez les femmes non atteintes, il y a prédominance des *Lactobacillus* et des



Streptococcus.

Selon cette étude, les entérobactéries et les staphylocoques possèdent la capacité d'induire des cassures de l'ADN double brin. *Escherichia coli* possède des îlots de pathogénicité *pks* qui codent pour une toxine appelée colibactine causant des cassures de l'ADN et dont le mécanisme de réparation comporte un taux élevé d'erreurs conduisant finalement au développement de cancer. Le genre *Bacillus* n'induit pas de perturbations double brin, mais cette souche peut métaboliser l'hormone progestérone en 5-alpha-prégnane-3.20-dione (métabolite qui stimule la formation de tumeurs en augmentant la prolifération cellulaire). En revanche, les bactéries du genre *Lactobacillus* et *streptococcus* ont des propriétés anticancérigènes et peuvent jouer un rôle préventif. Les lactobacilles renforcent les cellules NK ; renforçant l'immunité cellulaire, et les streptocoques produisent des métabolites antioxydants neutralisant les radicaux libres oxygénés qui endommagent l'ADN.

Les probiotiques pour renforcer le microbiote mammaire :

Cette protection bactérienne pourrait être renforcée par la prise de probiotique notamment chez les femmes n'ayant jamais allaité, l'allaitement jouant un rôle dans la réduction du risque de cancer grâce aux bactéries bénéfiques contenues dans le lait maternel. En effet, les études ont montré que des lactobacilles peuvent atteindre la glande mammaire et y renforcer la flore bactérienne.

Conclusion :

L'implication du microbiote dans le microenvironnement tumoral reste aujourd'hui peu connue. Cette étude revient sur l'enchevêtrement de toutes les composantes liées à l'environnement tumoral : microbiote, hormones et sensibilité de l'hôte. Même si elle ne prétend pas offrir des perspectives thérapeutiques à court-terme, elle

apporte un élément nouveau utile à la compréhension de la physiopathologie du cancer du sein et à l'implication, parfois insoupçonnée, de notre microbiote dans certaines pathologies.

Bibliographie :

- 1- Urbaniak, C et al. Le microbiote du tissu mammaire et son association avec le cancer du sein. *Microbiologie appliquée et environnementale* ;82(16) :5039-48,2016.
- 2-Hieken, TJ et al. Le microbiome des tissus mammaires humains prélevés de manière aseptique dans les maladies bénignes et malignes. *Rapport scientifique* ;6 :30751,2016.
- 3- Thompson, KJ et al. A comprehensive analysis of breast cancer microbiota and host gene expression.2017



Diagnostic au laboratoire d'une infection à *Haemophilus influenzae*

Microbiologie clinique

MISE AU POINT

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR

LCBM-CLCC-Batna

prkassah@yahoo.fr

Résumé

La bactérie à Gram-négatif *Haemophilus sp* est à l'origine d'infections bénignes ou graves, telles que bactériémies, méningites, pneumonies, sinusites, otites moyennes aiguës, cellulites et épiglottites. Le diagnostic repose sur la culture et le sérotypage. Le traitement repose sur les antibiotiques.

Mots clés : *Haemophilus*-culture sérotypage

Introduction

De nombreux *Haemophilus sp* font partie de la flore normale des voies respiratoires supérieures chez l'enfant et chez l'adulte et sont rarement pathogènes. Les souches pathogènes pénètrent les voies respiratoires supérieures par inhalation de gouttelettes ou par contact direct. La contagion est rapide dans les populations non immunisées. Les enfants, en particulier de sexe masculin, les sujets noirs et les Amérindiens, présentent un risque majoré d'infection grave. Les facteurs de prédisposition sont la surpopulation, la fréquentation des crèches, les déficits immunitaires, l'asplénie et la drépanocytose.

Il existe plusieurs espèces pathogènes d'*Haemophilus*; le plus fréquent est *H. influenzae*, qui a 6 sérotypes encapsulés distincts (a à f) et de nombreuses souches non encapsulées, non typables. Avant l'utilisation d'un vaccin anti-*H. influenzae* de type b (du vaccin conjugué contre Hib), la plupart des cas de maladies invasives graves étaient dus à ce type b.

Diagnostic bactériologique :

- La confirmation d'un cas de « maladie invasive » causée par l'Hib nécessite l'isolement et la culture de la bactérie à partir d'un site normalement stérile, tels que le liquide céphalo-rachidien (LCR), le sang, un liquide articulaire, un épanchement pleural, un épanchement péricardique, du liquide péritonéal, le placenta et le liquide amniotique.

Les méthodes de laboratoire utilisées pour détecter l'agent pathogène sont la **culture**, la **sérologie**, les tests **immuno-diagnostiques**, la détection de **l'antigène**, la détection de **l'acide nucléique**, le **génotypage** et le **séquençage**.

Prélèvements habituels

- Comme pour tout diagnostic bactériologique, la **qualité du prélèvement** réalisé chez le patient va conditionner la qualité de l'examen et du résultat.

LCR, sécrétions bronchiques, prélèvements de la sphère ORL (éviter ou limiter la contamination par la flore oropharyngée), prélèvements oculaires, hémoculture, prélèvements génitaux, pus profonds.

Diagnostic Direct

• Microscopie

Est la première étape de l'examen bactériologique, réalisé avec ou sans coloration.

La coloration de Gram permet de reconnaître **de petits bacilles ou coccobacilles à Gram négatif**, parfois capsulés et **polymorphes**, associés à des formes longues (situation parfois retrouvée dans le LCR).

.

Culture

- Les **milieux de culture** doivent satisfaire les exigences de l'espèce et contenir les facteurs X et V. L'appartenance au genre *Haemophilus* repose sur l'exigence en facteur X et V.
 - Culture sur des milieux enrichis en facteur X (hémine) et V (NAD, NADH). Les géloses chocolat ou au sang cuit apportent suffisamment d'hémine mais doivent être supplémentées en NAD.
- Dans les produits poly-microbiens la recherche de *H. influenzae* se fera sur milieux sélectifs obtenus par addition d'antibiotiques (ex : gélose chocolat *Haemophilus* avec bacitracine, vancomycine et amphotéricine B).
- Culture à 35-37°C, favorisée par une atmosphère humide, enrichie en CO₂. Croissance en 18 à 24 heures
 - Différents types de colonies :
 - souches capsulées : colonies muqueuses, iridescentes ;
 - souches non capsulées : colonies lisses, plus petites, sans iridescence

Identification

- L'identification est basée sur l'exigence des *Haemophilus* en sang ou facteurs sanguins d'où l'utilisation de milieux enrichis.

La première étape de l'identification consiste donc en la mise en évidence de l'exigence en facteur X et/ou V par :

- l'utilisation d'une gélose ordinaire à laquelle on ajoutera les facteurs sous forme de disques déposés à la surface de la gélose.

Phénomène de satellitisme sur gélose au sang (ex : 1 strie de colonies de *S. aureus* qui réalisent un apport de facteur V).

- L'identification est complétée par l'étude des caractères biochimiques, l'examen microscopique des colonies, le polymorphisme et le sérotypage
 - Détermination du sérotype des souches capsulées par agglutination sur lame, gonflement de la capsule, ou électrophorèse.

Diagnostic Immunologique

- Détermination du sérotype des souches capsulées par agglutination sur lame, gonflement de la capsule, ou électrophorèse.
 - Diagnostic rapide par la recherche d'antigènes capsulaires solubles, d'origine polysaccharidique uniquement pour *H. influenzae* sérotype b, dans le LCR, le sérum, les urines, par électrophorèse, agglutination de particules de latex revêtues d'anticorps, co-agglutination, ELISA.
- Indications : infections systémiques chez l'enfant.
- Méthodes Moléculaires
 - spectrométrie de masse.

Sensibilité aux antibiotiques

- Généralement sensibles aux principales familles d'antibiotiques : pénicillines, céphalosporines de II et IIIème générations, tétracyclines, sulfamides, rifampicine, fluoroquinolones, synergistines, chloramphenicol (sauf kanamycine), aminosides.
 - La **résistance naturelle** concerne les macrolides comportant un cycle de 16 atomes, les lincosamines, la bacitracine, le mécillinaam, l'oxacilline et les glycopeptides. C'est une espèce modérément sensible aux macrolides (cycle 14 et 15 atomes)(érythromycine ou ERY), les streptogramines, les

céphalosporines de première génération (céfalotine ou CF).

- Comme d'autres espèces bactériennes, *H. influenzae* est concerné par la **résistance acquise** touchant plusieurs familles d'antibiotiques.
 - * **B-lactamines**: le mécanisme le plus fréquent est la production de bêta-lactamase (bla de type TEM).
- L'activité des aminopénicillines est restaurée en présence d'un inhibiteur de β -lactamase.
- Un mécanisme non enzymatique est aussi observé reposant sur une modification de la cible des bêta-lactamines, les PLP ou protéines de liaison à la pénicilline, ayant subi des mutations ponctuelles entraînant des substitutions d'acides aminés et une diminution de l'affinité pour les bêta-lactamines.
- Ces PLP sont aussi les enzymes impliqués dans la synthèse d'un composant de la paroi bactérienne, le peptidoglycane.
- Indispensable de rechercher la production de bêta lactamase pour toutes les souches isolées en situation pathogène : utilisation d'un test chromogénique

* La **résistance acquise** concerne la famille des tétracyclines (TET), des phénicolés (C), des fluoroquinolones ou encore le triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT), mais pour certains, l'incidence est très faible.

Prophylaxie

- La prophylaxie (rifampicine) est recommandée pour les contacts suivants :
- 1) Tous les contacts vivant sous le même toit (indépendamment de l'âge) dans les circonstances suivantes :
 - Famille avec au moins 1 enfant de moins de 4 ans non ou incomplètement vacciné (la vaccination est considérée comme complète quand l'enfant a reçu les trois doses durant la première année et un rappel à 15 mois ou si deux doses ont été données entre 6 et 12 mois plus une dose de rappel ou si une seule dose a été donné entre 1 et 5 ans) ;
 - Famille avec un enfant immunodéprimé, indépendamment du statut vaccinal de l'enfant et de l'âge (même si > 5 ans) car la vaccination pourrait ne pas être efficace.
- 2) Les autres contacts (indépendamment de l'âge) ayant passé, avec le cas index, 4 heures ou plus chaque jour durant au moins 5 des 7 jours précédant l'apparition du cas et dont le ménage comprend un ou plusieurs enfants de moins de 4 ans non ou incomplètement vaccinés.

- 3) Tous les contacts dans les écoles maternelles, garderies, crèches : seulement si 2 cas ou plus d'infection invasive à Hib se sont succédés dans les 60 jours ET si parmi les enfants, certains sont non ou incomplètement vaccinés. La prophylaxie sera donnée à tous les membres du personnel et à tous les enfants de la même classe ou du même groupe, indépendamment du statut vaccinal et de l'âge.
- En plus de la prophylaxie, les enfants qui ne sont pas en ordre de vaccination devront recevoir 1 dose de vaccin Hib; Il n'y a pas suffisamment d'évidence pour donner la prophylaxie à ces contacts si une seule infection invasive à Hib est déclarée.
- Par contre, une information aux parents et au personnel doit être donnée afin d'être attentif au développement de symptômes chez les enfants non ou incomplètement vaccinés.

Bibliographie :

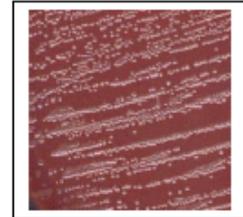
H. Dabernat, M.J Sanson-Le Pors. *Haemophilus* in Bactériologie médicale,1990, 521-44

J.L Avril, Dabernat H., Denis F., Monteil H., *Haemophilus* in Bactériologie Clinique,242-51.

C
A
R
T
E

D
I
D
E
N
T
I
T
E

Fiche synoptique micro-organisme



Genre : *Haemophilus*
Espèce : *influenzae*

Cocco-bacilles à Gram
négatif

Culture sur milieux usuels: OUI
Exigeant : gélose au sang cuit

Pathogène : strict - occasionnel - opportuniste - non pathogène
Réservoir : homme - animaux - environnement
Bactérie commensale des voies respiratoires supérieures de l'adulte et
de l'enfant, ± muqueuses vaginale et digestive
Transmission : inter humaine directe par gouttelettes oro-pharyngées

Éléments clés d'identification :

- Dans les prélèvements ORL et respiratoires, *H. influenzae* est à différencier d'une autre espèce *H. parainfluenzae* dont le pouvoir pathogène est quasi nul
- Les *H. influenzae* responsables d'infections invasives sont capsulés (principalement le sérotype b)

P
A
T
H
O
G
E
N
C
I
T
EPouvoir pathogène de *H. influenzae* :

- Infections communautaires de la sphère ORL (sinusites, otites) chez l'enfant et l'adulte
- Surinfections broncho-pulmonaires chez l'adulte (souches non capsulées)
- Infections invasives chez l'enfant et le sujet âgé :
 - o méningites
 - o bactériémies
 - o épiglottites
 - o arthrite

liées aux souches capsulées principalement de sérotype b. Les infections invasives ont quasiment disparues depuis la vaccination des nourrissons vis à vis de *H. influenzae* serotype b

T
R
A
I
T
E
M
E
N
T

P
R
E
V
E
N
T
I
O
N

Sensibilité aux antibiotiques

Sensibilité naturelle :

~~Pénicilline A~~ - Pénicilline A + acide clavulanique - Céphalosporines - Aminosides - Fluoroquinolones - Cotrimoxazole - Rifampicine

Résistance naturelle :

~~Pénicilline G~~ - ~~Pénicilline M~~ - Glycopeptides - Macrolides

Résistances acquises :

Pénicillinase = BLPAR β -lactamase positive ampicillin resistant (20-15%)

~~Pénicilline A~~ - Pénicilline A + acide clavulanique - Céphalosporines

Modification des PLP = BLNAR β -lactamase négative ampicillin resistant (10-5 %).

~~Pénicilline A~~ - ~~Pénicilline A + acide clavulanique~~ - Céphalosporines

Antibiotique(s) de 1^{ère} intention :

Infections ORL / respiratoires : Amoxicilline + acide clavulanique

Méningites et infections invasives : C3G injectable

Prévention / Hygiène / Déclaration

Vaccination : prévention des infections invasives à *H. influenzae* sérotype b (vaccin conjugué combiné)

Règles générales d'hygiène.

Techniques de diagnostic virologique de l'infection à CMV



Par Docteur : A. Benharra
LCBM-CLCC-Batna
a.benharra@gmail.com

Microbiologie clinique
MISE AU POINT

Résumé :

Le cytomégalo virus (CMV) est un herpesvirus strictement humain. Peu pathogène chez l'immunocompétent, il est responsable d'infections graves chez les personnes immunodéprimées et chez le fœtus. Le virus est recherché dans divers prélèvements en fonction du contexte clinique. Les techniques de diagnostics sont divers : examen cytologique de tissu, culture cellulaire, recherche de l'antigène par immunofluorescence indirecte, détection du génome viral par des techniques de Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel. Ces derniers ont supplanté les techniques de PCR en point final car plus sensibles, plus précises, plus reproductibles et adaptées aux grandes séries.

Mots clés : pathogène, divers prélèvements, PCR en temps réel.

Introduction

Le cytomégalo virus (CMV) est un herpesvirus strictement humain. Peu pathogène chez l'immunocompétent, il est responsable d'infections graves chez les personnes immunodéprimées et chez le fœtus. La séroprévalence varie selon le niveau socio-économique. Le virus est transmis par la salive, les urines, les sécrétions génitales, le lait maternel, le sang ou les organes greffés, et par voie transplacentaire. L'acquisition de l'infection se fait le plus souvent dans l'enfance, particulièrement en collectivité, et à l'adolescence. Après l'infection, une dissémination hématogène dans les monocytes et les polynucléaires permet au virus d'atteindre les organes cibles. Des réactivations du virus latent, locales ou avec dissémination hématogène, sont possibles à la faveur d'un stress ou d'une immunodépression. Des réinfections par de nouvelles souches sont également observées.

Examen cytologique des tissus

Les cellules infectées sont de grande taille et possèdent des inclusions intra-cytoplasmiques et intranucléaires. L'aspect le plus caractéristique est celui de « l'inclusion en œil de hibou », volumineuse inclusion intranucléaire séparée de la membrane nucléaire par un halo clair. Cet examen est effectué sur des frottis, des appositions sur lames et surtout des coupes de tissu.

Culture cellulaire

Les cellules de choix sont les fibroblastes humains. L'effet cytopathique caractéristique (ECP), est constitué de foyers ovalaires de cellules augmentées de volume et réfringentes, qui progressent lentement selon le grand axe des fibroblastes. En pratique, un délai de 8 à 20 jours est nécessaire pour observer les premiers foyers mais il peut aller jusqu'à 6 semaines. Cette technique n'est plus utilisée pour le diagnostic des infections en raison de son délai de rendu, de sa lourdeur et de sa

sensibilité inférieure à celle des techniques de biologie moléculaire.

La culture dite rapide associe une centrifugation des prélèvements sur les fibroblastes, et la détection par immunocytochimie, après 24 à 48 heures d'incubation, des antigènes très précoces synthétisés au cours du premier cycle de réplication virale. Cette méthode est plus sensible que l'isolement pour les prélèvements contenant du virus libre (urine par exemple) et de sensibilité équivalente pour les prélèvements contenant du virus lié aux cellules (sang, biopsies) et ne permet pas l'isolement de la souche et sa mise en œuvre est lourde. Elle tend à être abandonnée au profit des méthodes de biologie moléculaire.

Détection des antigènes viraux

L'antigénémie à CMV correspond à la présence de la phosphoprotéine pp65 (ppUL83) dans les noyaux des polynucléaires circulants. Elle est mise en évidence par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps monoclonaux après cytocentrifugation des leucocytes. Les résultats, exprimés en nombre de cellules positives pour 2×10^5 leucocytes examinés, sont obtenus en 4 à 5 heures. Ce test sensible n'est pas adapté aux grandes séries du fait de sa lourdeur de mise en œuvre et du délai à respecter entre prélèvement et technique (2 à 3 heures) et il est en défaut chez les patients en aplasie. Les antigènes intracellulaires synthétisés dans la cellule infectée à différentes étapes de la réplication virale (très précoce, précoce ou tardive) sont recherchés à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques. Ces techniques manquent de sensibilité. Elles ne gardent leur intérêt que pour caractériser des cellules infectées sur coupes histologiques.

Détection de l'ADN viral

La détection qualitative ou quantitative du génome viral est réalisée par des techniques de *polymerase chain reaction* (PCR) en temps réel qui ont

supplanté les techniques de PCR en point final car plus sensibles, plus précises, plus reproductibles et adaptées aux grandes séries. Le risque de faux positif par contamination est également réduit. Des troupes commercialisées sont actuellement disponibles et certaines sont adaptées à une automatisation complète. La mesure de la charge virale du CMV peut être effectuée à partir du sang total, du plasma ou des leucocytes. La diversité des techniques de PCR en temps réel pratiquées dans les différents laboratoires, tant pour le protocole de PCR utilisé que pour le compartiment sanguin analysé, rend les comparaisons délicates. La mise à disposition d'un standard international (WHO International Standard) permet d'exprimer les résultats en unités internationales (UI) par millilitre de sang total ou plasma, ou million de cellules. Les charges virales déterminées par PCR en temps réel sont concordantes avec les mesures d'antigénémie dans la majorité des études comparant les deux techniques. Cependant, la PCR en temps réel permet de détecter l'infection plus précocement. Les techniques d'hybridation in situ, peu sensibles, sont réservées aux études physiopathologiques. Elles peuvent être combinées avec la détection d'antigènes viraux ou cellulaires par immunocytochimie, ce qui permet de reconnaître des infections mixtes ou d'identifier la cellule infectée.

Sérodiagnostic

La recherche des IgG est faite par technique ELISA, avec immunocapture pour les IgM car elles limitent le risque de réactions faussement positives liées à la présence de facteur rhumatoïde.

La présence d'IgM n'est pas toujours un marqueur de primo-infection récente. Ces dernières peuvent persister plusieurs mois, être détectées au cours des réactivations endogènes ou des réinfections, lors de stimulations polyclonales non spécifiques du système immunitaire induites par une autre infection ou en raison de réactions croisées. En dehors d'un contexte clinique évocateur, il n'est pas toujours facile de rattacher la détection d'IgM à une primo-infection récente. L'avidité des IgG permet de calculer l'index de maturation des IgG par mesure du titre sérique en présence et en absence d'urée (agent dénaturant). L'indice d'avidité des IgG est dans plus de 90 % des cas inférieur à 50 % dans les primo-infections récentes alors que, dans les infections anciennes et les infections secondaires, l'indice d'avidité est élevé (60–100 %). Il existe désormais des techniques commerciales mais l'interprétation varie selon le test utilisé.

Suivi virologique du patient immunodéprimé

La surveillance des marqueurs de dissémination sanguine du virus, qui précède et/ou accompagne le

développement d'une atteinte viscérale, constitue l'élément majeur du suivi virologique.

D'autres prélèvements sont pratiqués en fonction des signes d'appel. Il existe une corrélation positive entre un haut niveau de charge virale, son augmentation rapide et l'apparition d'une maladie à CMV. La surveillance de la charge virale circulante permet ainsi de prédire la survenue d'une localisation viscérale et d'initier un traitement anticipé, et également d'évaluer la réponse au traitement. Sous traitement antiviral efficace, une réduction de moitié du niveau de l'ADNémie est obtenue en un à deux jours et celle-ci devient indétectable en 15 à 21 jours. Ce délai dépend cependant de la charge virale initiale. Une décroissance lente de la charge virale peut être associée à une récurrence à l'arrêt du traitement, beaucoup plus rarement à une résistance.

L'antigénémie devient indétectable en dix à 15 jours après parfois une élévation transitoire. Chez les receveurs d'allogreffe, quel que soit le type de transplantation, une surveillance hebdomadaire de la charge virale est instituée après la greffe et poursuivie au moins les trois premiers mois. Le choix de la méthode dépend de la pratique du laboratoire. Du fait de la variété des méthodes de quantification proposées, il est préférable de conserver la même technique de quantification tout au long du suivi. Il existe une corrélation entre les valeurs d'antigénémie et la charge virale dans le sang total ou les leucocytes mais cette corrélation n'est pas linéaire. En transplantation rénale et hépatique, le seuil de charge virale de 10 000 copies par millilitre de sang total ou par 5×10^5 leucocytes utilisé pour initier un traitement correspond à 25 à 50 cellules pp65-positives. Après greffe de cellules souches hématopoïétiques, compte tenu de la mortalité associée à la pneumonie à CMV, le traitement est initié dès la certitude d'une infection active, à partir de 1000 copies/ml ou dès la première antigénémie. La décroissance de la charge virale sous traitement est un élément d'évaluation de la réponse au traitement. La place des tests de mesure de l'immunité cellulaire anti-CMV dans la prédiction de l'infection active et de la réponse au traitement reste à documenter. Au cours du sida, une surveillance virologique n'est en pratique nécessaire que chez les patients dont le nombre de lymphocytes CD4+ est inférieur à 100/mm³, voire 50/mm³.

Bibliographie

1. M.-C. Mazon, *et al* : « EMC - Maladies infectieuses » Volume 12-n°4 - novembre 2015
2. S. Christine *et al* « Rémic 2015 tome II cytomegalovirus »

Onychomycoses : Modalités de diagnostic au laboratoire

Parasito-mycologie
MISE AU POINT



Docteur H. ZEMMOURI
CLCC-Batna

Résumé :

Les onychomycoses ne représentent pas plus de 50 % de la pathologie unguéale. Les dermatophytes (*Trichophyton rubrum* et *T. mentagrophytes interdigitale*) sont les principaux agents rencontrés au niveau des pieds. Les levures du genre *Trichosporon* et surtout *Candida* (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*...) prédominent aux mains associées le plus souvent une atteinte unguéale et un périonyxis. D'autres champignons que les classiques dermatophytes et les levures peuvent être isolés mais plus rarement d'ongles pathologiques. Parmi eux, on trouve surtout des espèces appartenant aux genres *Scopulariopsis*, *Aspergillus* et *Fusarium*, leur pouvoir pathogène doit être cependant bien précisé. Les autres moisissures, ayant une affinité particulière pour la kératine (pseudodermatophytes) appartenant au genre *Neoscytalidium* (ex : *Scytaalidium*) issues des régions tropicales et subtropicales, sont considérées comme de vrais pathogènes et isolés d'ongles pathologiques, il en est de même pour *Onychocola canadensis*, issu en revanche de pays tempérés ou froids, impliqué surtout dans les onyxis des pieds de sujets âgés. Le rôle du laboratoire est d'identifier l'espèce en cause, et de démontrer que le champignon isolé des prélèvements d'ongle pathologique est bien le pathogène incriminé.

Mots clés : *Onychomycoses, dermatophytes, pseudodermatophytes, diagnostic mycologique.*

Introduction

Une onychomycose est définie comme une infection fongique de l'appareil unguéal provoquée par des dermatophytes, des levures ou des moisissures. Leur fréquence est de 6 à 9 p. 100 dans la population générale. Les raisons de la consultation pour un malade vont du caractère inesthétique, à la gêne, voire la douleur locale, et éventuellement à la récurrence. Des études ont montré que cette pathologie pouvait avoir un retentissement sur la qualité de vie : gêne, problèmes fonctionnels au travail, réduction des activités sociales, crainte de la contagion aux proches, fréquence significative de la douleur. Des médicaments sont efficaces, mais doivent être prescrits sur la base d'un diagnostic précis ; selon le type clinique de l'onychomycose et la nature du champignon, plusieurs modalités sont possibles.

L'existence d'une atteinte clinique d'un ongle (onychopathie) ne signifie pas onychomycose : cette dernière représente de 18 à 50 p. 100 des onychopathies selon les séries. Les autres causes sont le fait des traumatismes, d'autres affections dermatologiques ou générales : psoriasis, etc. Mais une onychopathie n'est pas toujours liée à une mycose [3]. Plusieurs espèces de champignons sont responsables (tableau I).

La fréquence des onychomycoses varie selon l'âge (rare chez l'enfant, fréquent chez l'adulte) 6 à 9 % en moyenne dans la population générale Elle est élevée dans la population sportive et les sujets âgés (48 % pour les plus de 70 ans).

Il existe de nombreux facteurs favorisants dont il doit être tenu compte dans la prise en charge et la prévention, en plus du traitement spécifique de la mycose. Outre des facteurs immunitaires, peut-être génétiques, peu fréquents, les principaux facteurs pour les dermatophytoses des pieds sont

environnementaux : la pratique sportive (en particulier piscine, sports de combat, marathoniens, etc.), la profession (militaires, maîtres nageurs) et le mode de vie. L'hallux valgus est un facteur favorisant local habituel. Une atteinte familiale est fréquente. Le port de chaussures fermées joue un rôle important dans les pays développés. Pour tous les agents mycosiques, les microtraumatismes, certaines professions ou maladies associées sont trouvées pour l'atteinte des mains, en particulier chez les femmes (*Candida*). Les malades atteints de psoriasis ont une plus grande fréquence de dermatophytoses des pieds. Le diabète, les troubles trophiques des membres inférieurs chez les sujets âgés, le traitement systémique corticoïde sont aussi des facteurs favorisants. Par ailleurs, l'onychomycose est une source d'intertrigo et indirectement d'érysipèle. La candidose des mains peut être une maladie professionnelle.

la réalisation d'un prélèvement mycologique à visée diagnostique est incontournable pour poser un diagnostic étiologique [6]. Le biologiste se voit ainsi fréquemment confier la tâche de confirmer la mycose et d'en préciser l'agent responsable. Un traitement antifongique adapté sera le plus souvent instauré en fonction des résultats de ces analyses [7]. Il est parfois argumenté que l'examen mycologique est un coût supplémentaire inutile, et que cette pathologie reste majoritairement bénigne [4]. À cela, il faut rétorquer que le coût des analyses de laboratoires est bien faible par rapport à un traitement antifongique local ou général inutile sur une dystrophie unguéale mécanique ou un psoriasis unguéal. De même, les effets secondaires de la tebinafine ou du kétoconazole prescrits par voie générale pendant plusieurs mois sont loin d'être négligeables. Dans les onychopathies non mycosiques, ces traitements inutiles peuvent être délétères pour le patient

Tableau 1 Principales espèces fongiques isolées d'un ongle pathologique selon la localisation et l'origine, d'après [1].

Espèces ou genres	Localisation		Origine principale
	Mains	Pieds	
Dermatophytes			
Habituels			
<i>Trichophyton rubrum</i>	++	+++	Homme a
<i>Trichophyton interdigitale</i>	+	+++	Homme a
Rares			
<i>Epidermophyton floccosum</i>	+	-	Homme a
<i>Trichophyton soudanense</i>	+++	-	Homme a
<i>Trichophyton violaceum</i>	+++	-	Homme a
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+++	-	Homme a
<i>Microsporum audouinii</i>	+++	-	Homme a
<i>Microsporum canis</i>	+++	-	Chat, chien
Moisissures			
Habituelles			
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	++	+++	Sol
<i>Acremonium sp. (A. strictum)</i>	++	+++	Sol
<i>Fusarium sp.</i>	++	++	Sol, plantes
Rares			
<i>Aspergillus sp. (A. versicolor, A. candidus, A. sydowi,</i>	++	++	Sol, plantes
<i>A. terreus, A. flavus, A. sclerotium. . .)</i>	++	++	Sol
<i>Paecilomyces sp. (P. lilacinus)</i>			
<i>Pseudodermatophytes</i>	-	+++	Sol ? eau ?
<i>Onychocola canadensis</i>	+	+	Sol, plantes
<i>Neoscytalidium dimidiatum, Scytalidium hyalinum</i> (régions tropicales)			
Levures			
Habituelles			
<i>Candida albicans</i>	+++	+	Homme
<i>Candida parapsilosis</i>	+++	+	Homme
<i>Candida guilliermondii</i>	-	+	Homme
Rares			
<i>Cryptococcus sp</i>	+	-	Sol
<i>Trichosporon sp.</i>	+	-	Homme
<i>Autres espèces du genre Candida</i>			

(+++) fréquent, (++) peu fréquent, (+) rare, (-) exceptionnel.
a Auto-inoculation.

Classification clinique

Elle dépend du lieu de pénétration de l'agent infectieux et du stade évolutif. Elle comprend cinq types (fig. 1 à 3).

L'onychomycose sous-unguéale distolatérale est la plus fréquente ; elle est provoquée dans la majorité des cas par un dermatophyte champignon pénètre par l'hyponychium, souvent au niveau du sillon latéral, puis pénètre le lit de l'ongle entraînant une hyperkératose sous-unguéale et un détachement de la tablette unguéale qui peut être ensuite envahie. L'atteinte s'étend progressivement à la zone matricielle proximale. L'atteinte de l'appareil

unguéal peut être partielle ou totale, tant au niveau des orteils qu'aux doigts.

L'onychomycose sous-unguéale proximale est rare, le plus souvent provoquée par un dermatophyte. Elle se présente habituellement comme une leuconychie qui apparaît à la lunule. Le mode d'installation du dermatophyte dans l'appareil unguéal n'est pas très clair. Elle survient plus volontiers sur un terrain immunodéprimé de manière subaiguë, à la fois polydactylique et simultanée. Il existe deux variantes: la forme bipolaire (superficielle et profonde) plus fréquente, et la forme avec pénétration profonde du champignon.

La leuconychomycose superficielle peut être due à un dermatophyte, parfois à une moisissure. Le champignon pénètre la tablette unguéale de dehors en dedans, probablement après un traumatisme local ou une macération entretenue par un chevauchement d'orteils.

L'onychomycodystrophie totale (dite secondaire) est le stade ultime des variétés précédentes. Elle traduit l'envahissement lentement progressif et la destruction de toute la tablette unguéale par le champignon. Une paronychie peut être observée en particulier dans certaines infections (moisissures).

L'onychomycose candidosique débute habituellement par une paronychie d'évolution subaiguë ou chronique avec dystrophie secondaire de la tablette unguéale qui devient striée et bosselée transversalement avec une coloration marron verdâtre des zones proximales et latérales. Plus rarement, elle se présente comme une onycholyse distolatérale, souvent douloureuse lors de son installation. Elle survient principalement au niveau des ongles des doigts. Elle peut être primaire (due presque toujours à *C. albicans*) ou secondaire (due à diverses espèces de *Candida*), surinfection d'une onychopathie d'autre étiologie [2].



Figure- 1. Onychomycose sous-unguéale disto-latérale avec leuconychle.



Figure- 2a. Atteinte sous unguéale disto-latérale



Figure- 2b. Atteinte sous unguéale disto-latérale



Figure 3. Onychodystrophie totale

Le prélèvement mycologique

Le prélèvement mycologique est une étape essentielle. Il doit être réalisé sur des ongles bien essuyés afin d'éliminer toute souillure de moisissures environnementales et pour éviter des « faux négatifs », il doit être réalisé loin d'un traitement local et général. Si l'ongle a déjà été traité par une thérapeutique antifongique, il conviendra, avant le prélèvement, de réaliser une fenêtre thérapeutique d'environ 3 mois lorsqu'il s'agit d'un traitement systémique, d'un traitement local par vernis ou une solution filmogène. Lorsqu'il n'y a eu qu'une application par une crème antifongique, l'attente peut être réduite à 15 jours. Le prélèvement de l'échantillon pour l'analyse

mycologique est l'étape critique pour assurer la qualité de l'examen. **Il est donc préférable d'adresser le patient dans un laboratoire expérimenté dans cette analyse.**

TECHNIQUE

La technique du prélèvement est adaptée à la symptomatologie des lésions, le principe est le suivant : il faut prélever là où le champignon est en activité, c'est-à-dire vivant, souvent invasif à la jonction partie saine-partie malade. Dans la forme la plus fréquente des onychomycoses. On prélèvera le produit pathologique suspect le plus loin possible de la zone touchée, souvent invasif à la jonction partie saine-partie malade.

Pour une atteinte disto-latérale avec hyperkératose sous unguéale et détachement de la tablette, un découpage à la pince à ongle est pratiqué jusqu'à la jonction zone unguéale infectée-zone saine, puis un grattage des débris kératosiques friables recouvrant le lit unguéal est réalisé dans cette zone (fig.4).

En cas de leuconychie superficielle ou profonde, après avoir nettoyé la tablette avec de l'alcool, un grattage ou un découpage de la leuconychie est effectué jusqu'à atteindre la zone blanche friable au sein de laquelle est recueilli l'échantillon (fig. 5). S'il existe une paronychie avec atteinte des

sillons latéraux, comme c'est habituellement le cas pour une candidose unguéale, un grattage est réalisé sous le repli sus-unguéal, puis dans les zones latérales après découpage de la tablette (fig. 6).

Pour cela on utilise fréquemment une curette tranchante de Brocq ou un vaccinostyle à bord tranchant. Le matériel parasité (poussière d'ongle) est recueilli dans une boîte de Pétri ou autre récipient destiné à la « paillasse » de mycologie (figure 7).



Figure- 4. Onychomycose latéro-distale à dermatophyte : hyperkératose sous unguéale et onycholyse. Prélèvement à la jonction ongle sain - ongle malade.



Figure- 5. Après une toilette de la tablette avec de l'alcool, grattage superficiel pour obtenir une poudre blanche. Ce geste est également thérapeutique.

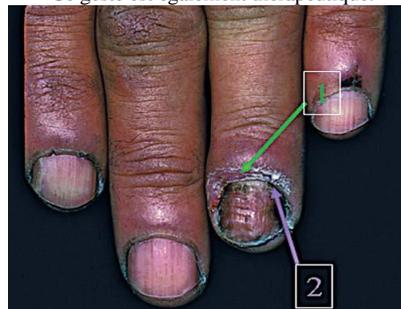


Figure- 6. Onychomycose à *Candida albicans*. (1) Gratter sous le repli sus-unguéal avec un vaccinostyle (2) Découper à la pince à ongle les zones latérales et gratter le lit de l'ongle.



Figure- 7. Prélèvement mycologique.

L'examen direct en mycologie

L'examen direct est indispensable et doit être réalisé rapidement afin d'apporter une réponse rapide au clinicien prescripteur. Il s'effectue à partir des fragments ou de poussières d'ongle issues du grattage, des squames cutanées en regard et les sérosités des replis unguéaux. Pour visualiser les éléments fongiques, on utilise de la potasse à 10 %, ou 20 % ou des liquides éclaircissants comme le chlorolactophénol d'Amman. L'utilisation de colorants facilite la lecture comme le noir chlorazole (non commercialisé) ou mieux le rouge Congo (Mycetocolor®). Certains mycologues utilisent des colorants fluorescents pour cet examen direct, mais cela nécessite un microscope à fluorescence. Cet examen direct confirme en quelques heures l'origine mycosique de l'onychomycose et peut même orienter vers l'agent pathogène (dermatophyte, levure, moisissure) et préciser la vitalité des éléments fongiques pour un œil de biologiste très averti. Néanmoins, **seule la culture permet l'identification précise du champignon responsable (genre et espèce).**

Histomycologie de l'ongle

Un examen histologique n'est contributif au diagnostic d'onychomycose que si l'échantillon est prélevé au sein de la zone infectée incluant le lit de l'ongle. Il nécessite des colorations spéciales (PAS) et un biologiste expérimenté pour identifier les éléments fongiques observés. Ces données sont similaires à celles de l'examen direct en mycologie. **L'examen histologique ne permet pas d'identifier le champignon et ne préjuge pas de sa vitalité.**

Culture mycologique

La culture est un complément indispensable de l'examen direct. En effet, l'isolement en culture du champignon responsable et son identification (qui ne peut être réalisée par le seul examen direct) sont importants, puisque le traitement peut être différent en fonction de l'espèce isolée.

Le temps de développement de colonies fongiques identifiables sur les milieux de culture est variable : quelques jours pour les levures et les moisissures, deux à trois semaines pour les dermatophytes.

le milieu de référence pour les dermatophytes est le milieu de Sabouraud, additionné d'antibiotique(s) (chloramphénicol ± gentamicine). Les cultures sont incubées habituellement à 20-25 °C. Une durée d'incubation de 4 semaines minimum doit être respectée avant de rendre des résultats négatifs.

Les cultures sont observées en général deux fois par semaine, soit le champignon est immédiatement identifié, soit il est nécessaire pour obtenir un pigment caractéristique ou des fructifications abondantes après un repiquage sur milieu spécifique selon les situations.

Identification directe par spectrométrie de masse

Des essais utilisant la spectrométrie de masse de type MALDITO font montré la possibilité d'identifier *T. rubrum* directement partir d'un échantillon d'ongle pathologique [8].

Interprétation des résultats et conclusions

Les résultats de l'examen mycologique, lors de l'isolement et l'identification d'un champignon, doivent être bien interprétés pour le clinicien afin de conclure ou non à une onychomycose. Si l'examen a été bien réalisé, il existe une bonne concordance entre le résultat de l'examen direct et celui de la culture (**figure 8**).

En cas de dermatophytose, l'examen direct objective la présence de filaments mycéliens septés et la culture identifie le dermatophyte responsable. Il existe pratiquement toujours une atteinte associée des espaces inter orteils et/ou des plantes avec le même dermatophyte. Un tel résultat concerne plus de 90 % des prélèvements des ongles des orteils.

En cas d'affection à pseudo dermatophytes (*Neoscytalidium* sp. et *Onychocola*), ces espèces sont considérées comme ayant un pouvoir pathogène sur l'ongle proche des dermatophytes, il convient de le signaler au clinicien prescripteur.

Candidose et dermatophytose se partagent souvent l'étiologie des onychomycoses des doigts. La présence de colonies de *Candida albicans* dans un prélèvement unguéal est un véritable indice de pathogénicité car *Candida albicans* n'est pas habituellement présent sur une peau saine. L'examen direct devrait alors mettre en évidence des pseudofilaments qui témoignent de sa forme infectieuse mais cet examen direct est souvent de

lecture difficile. La culture prime alors pour cette espèce. Si le *Candida* isolé n'est pas *C. albicans*, seul l'examen direct (présence ou non de pseudo-filaments) et une culture pure permettent la distinction entre la colonisation d'une onychopathie, comme par exemple un psoriasis unguéal ou une paronychie chronique, et une réelle onychomycose à levures.

L'interprétation d'une moisissure en culture est plus difficile car outre le fait que ce sont souvent des contaminants de laboratoire, elles colonisent volontiers sans effet pathogène le revêtement cutané et la kératine distale de l'appareil unguéal. Il est donc banal d'en isoler d'un prélèvement d'ongle. Cependant, la présence d'une moisissure

en culture pure sans dermatophyte (ni pseudo dermatophytes) avec un de un examen direct montrant des filaments évocateurs de moisissure est très suspecte d'onychomycose à moisissure.

En cas de doute, un second prélèvement doit être réalisé dans un laboratoire expérimenté. Ce second prélèvement doit mettre en évidence les mêmes résultats, il est nécessaire pour confirmer le diagnostic. Nous concluons que chaque fois qu'un clinicien émet un doute sur les résultats que lui a adressé le laboratoire par une confrontation avec l'examen clinique de l'onychopathie de son patient, il est préférable de répéter l'examen, et d'envisager une étude histologique avant toute décision thérapeutique.

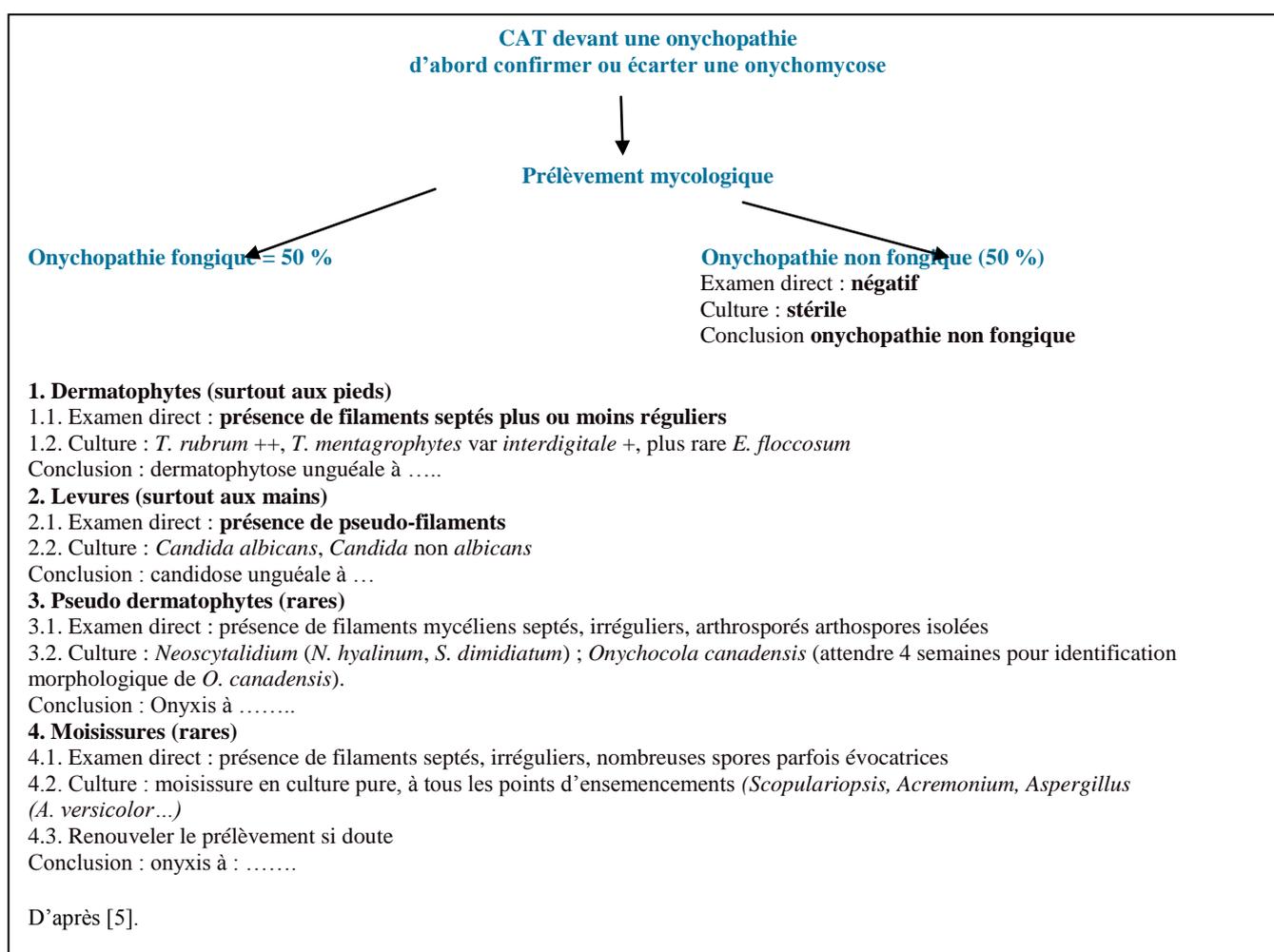


Fig. 8. Conduite à tenir devant une onychopathie évoquant une onychomycose.

Références

1-Groupe de travail de la Société française de dermatologie, Recommandations pour la pratique clinique. Onychomycoses : modalités de diagnostic et de prise en charge. Ann Dermatol Vénéréol 2007;134:S7-16.

3-Feuilhade de Chauvin M. Les onychomycoses. Rev Prat.2000;50:2223-30.

4-Revuz J. Les recommandations pour la pratique clinique « onychomycose », recommandations virtuelles pour un monde imaginaire. Ann Dermatol Vénéréol 2007;134:5S3-4.

2- R. Baran Nouvelle classification clinique des onychomycoses Journal de Mycologie Médicale (2014) 24, 247 26

5-Anonyme. Onychomycoses, modalités de diagnostic et prise en charge, J Med Med 2007;17:282-4.

6-Brillowska-Dabrowska A, Saunte DML, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophytes nails infections with specific detection of *T. rubrum*. J Clin Microbiol 2007;45:1200-4.

7-Gentles JC, Evans EGV. Infection of the feet and nails wit

Place de l'Ordinateur dans le Développement des Nouveaux Candidats Médicaments Antibiotiques

Pharmacologie
MISE AU POINT

Derouicha Matmour^{1,2,4}, Nawel Achachi^{4,5}, Abdelaali Belhachem⁴, Hanane Zitouni⁴, Habiba Fetati⁴, Asma Memou⁴, Yahia Dellaoui⁴, Fatima Hadjadj Aoul³, Houari Toumi⁴.

¹Laboratoire de Chimie Thérapeutique, CHU-Université de Sidi Bel-Abbès. ³Laboratoire de Chimie Thérapeutique- Université-²Alger.

⁴Laboratoire de Recherche en Développement Pharmaceutique, Université -Oran. ⁵Laboratoire central de biologie médicale, CLCC -Batna.

Correspondance : Email : drmatmour24@hotmail.fr

Résumé :

*L'émergence et la propagation d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques constituent un problème majeur de santé publique, alors que de nombreuses sociétés pharmaceutiques ont abandonné le développement des antibiotiques à la recherche de traitements plus lucratifs. Les stratégies traditionnelles de développement de nouvelles molécules sont plus coûteuses. Cependant, les techniques assistées par ordinateur sont très utilisées actuellement pour le développement de médicaments car elles sont moins chères, plus rapides et elles peuvent accélérer l'identification de nouveaux antibiotiques, ce qui permet d'améliorer les taux de réussite. L'objectif de cet article est de décrire les approches permettant la mise en évidence de nouveaux candidats antibiotiques par des techniques informatiques dites **In Silico**.*

Mots-clés : Cible bactérienne, Drug Design, In silico, Ligands.

Introduction

Faire face à la menace des bactéries résistantes aux médicaments est l'un des plus grands défis de la médecine moderne. Auparavant, seule l'observation parfois fortuite des effets d'une substance permettait de mettre au point de nouveaux remèdes. Nous citons l'exemple de découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, qui a été décrit comme un " tournant de l'histoire" [1], a rapidement été suivi par la constatation décourageante que les bactéries peuvent constituer une contre-attaque. De nombreuses autres souches bactériennes ont par la suite développé une résistance aux plusieurs antibiotiques [1,2].

Compte tenu de l'ampleur de la menace, le développement de nouveaux traitements pourrait sembler initialement rentable, mais les sociétés pharmaceutiques se sont en fait éloignées du développement des antibiotiques ces dernières années à la recherche de traitements plus lucratifs à long terme pour gérer les maladies chroniques [3,4]. Aujourd'hui, grâce à l'ordinateur, les chercheurs parviennent à simuler l'action de substances avant même qu'elles n'existent. L'expression " **Drug Design**", témoigne bien de cette révolution de la pharmacie : les scientifiques actuels ne se contentent plus de tester des substances existantes. Ils en " dessinent " de nouvelles [5]. Des médicaments déjà commercialisés sont ainsi nés sur un écran d'ordinateur." C'est le cas du **Tamiflu**, le nouveau médicament de Roche contre la grippe, ainsi que de certaines molécules utilisées contre le SIDA dans les trithérapies" [5].

Deux approches permettant la mise en évidence de nouveaux candidats Antibiotiques par des techniques informatiques dites **In Silico**.

1. Choix et validation d'une cible bactérienne pertinente

La cible thérapeutique doit être une enzyme ayant une fonction critique dans une voie biochimique d'importance centrale pour la cellule bactérienne. Dans le cadre de recherche de nouveaux antibiotiques, il faut identifier des nouvelles cibles bactériennes pour qu'il n'y ait pas de résistance préexistante [6].

2. Conception de nouveaux candidats antibiotiques

Les approches présentées ci-dessous sont basées sur une analyse comparative des ligands "**ligand-based drug design**" et une analyse des interactions entre un ligand et une cible bactérienne "**structure-based drug design**".

Actuellement, les deux approches ont tendance logiquement à se croiser, dans la mesure où un pharmacophore peut être complété par des données issues d'un récepteur [7].

2.1. Approche basée sur les ligands

Le principe de base du criblage virtuel basé sur la comparaison de ligands est que des molécules similaires partagent des propriétés (physico-chimiques, biologiques) similaires. Pour une molécule A de propriété P connue, toute nouvelle molécule suffisamment similaire à A présente de fortes chances de présenter également la propriété P. Le criblage virtuel d'une chimiothèque va donc consister en deux étapes [8]:

- Comparer deux à deux toutes les molécules d'une chimiothèque à la molécule A de référence ;
- Classer les molécules de la chimiothèque par similarité décroissante à la référence A.

2.1. Approche basée sur la structure de la cible bactérienne

Les méthodes basées sur la structure de la protéine cible bactérienne sont en théorie les plus précises puisqu'elles estiment la manière dont le ligand va se lier à la protéine d'intérêt et la force de cette interaction, c'est-à-dire son affinité. Il n'en

demeure pas moins que ces méthodes sont très utilisées car très intuitives à analyser [9].

Le **docking moléculaire** est la méthode la plus naturelle pour prédire l'affinité d'un ligand à une cible bactérienne de structure 3D connue. Appliquée dans un contexte de criblage virtuel de nombreuses molécules, cette méthode (**figure 1**) consiste à résoudre rapidement (< 30 s/molécule) trois énigmes[9]:

- Prédire la conformation active du ligand ;
- Prédire l'orientation relative du ligand par rapport à la protéine cible ;
- Prédire l'énergie libre de liaison (affinité) du ligand vis-à-vis de sa cible.

En général, le docking moléculaire est limité à un site de liaison préalablement défini (site catalytique d'une enzyme, poche de liaison de ligands connus).

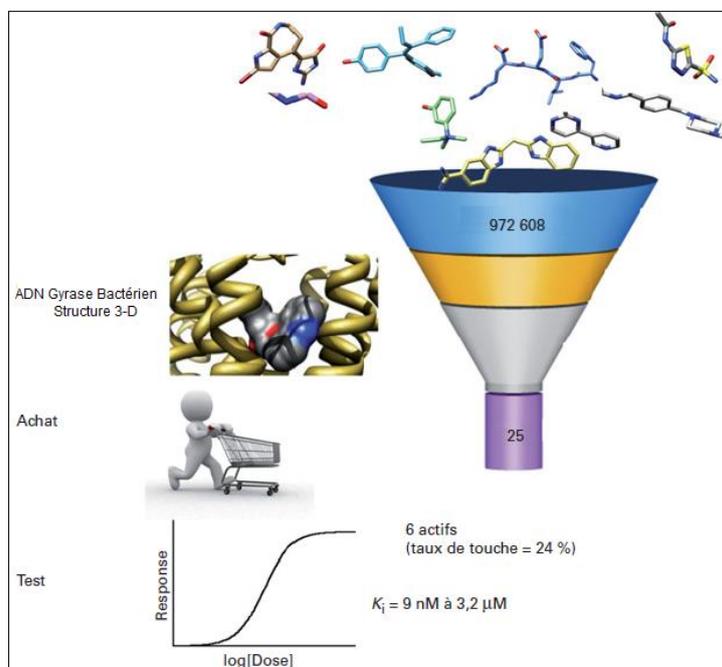


Figure 1. Criblage virtuel par docking moléculaire d'une chimiothèque de 1 million de molécules conduisant à de nouveaux ligands de l'enzyme ADN-Gyrase Bactérien [10].

Conclusion

Faire face à l'abandon des industries pharmaceutiques pour le développement des antibiotiques à la recherche de traitements plus lucratifs, les chercheurs académiques sont particulièrement bien placés pour combler le vide qui en résulte. Et ceci en utilisant les techniques de conception assistées par ordinateur, qui sont moins chères et plus rapides, dans le but d'accélérer l'identification de nouveaux médicaments antibiotiques.

Bibliographie:

- 1- Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol R.* 2010; 74:417.
- 2- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004; 10:S122–S9.
- 3- Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9:894–6.

4- Projan SJ. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6:427–30.

5- Adriano DA, Lívia BS, Donald JA. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9:771-790.

6- Diarmaid H, Andres K. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *UPSALA J MED SCI.* 2014; 119: 162–169.

7-Ronan B. Modélisation moléculaire et conception de nouveaux ligands d'intérêts biologiques. *Éditions TI.* 2014; 4:1-17.

8. Schneider G. Virtual screening: an endless staircase. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:273-276.

9- Ripphausen P, Nisius B, Bajorath J. State-of-the-art in ligand-based virtual screening. *Drug Discovery Today.* 2011; 16:372-376.

10- Kolb P, Rosenbaum DM, Irwin JJ, FUNG JJ, KOBILKA BK et Shoichet BK. Structure-based discovery of DNA_Gyrase ligands. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2009; 106:6843-6848.

Composition Chimique Et Influence De Différents Tweens Sur Le Pouvoir Antimicrobien Des Huiles Essentielles de *Brocchia cinerea* et *Eucalyptus globulus*

Pharmacognosie
Article original

Ben Moussa M.T., M.DJENAIHI, D. HAFIDI, K.KHELIL,A. KASSAH LAOUAR-Y.HADEF

Résumé

La présente étude visait d'une part à déterminer la composition chimique, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) des huiles essentielles extraites de *Brocchia cinerea* et *Eucalyptus globulus* d'origine algérien (Afrique du Nord) sur trois germes de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherchia coli* ATCC 4872), et d'autre part à évaluer l'influence de différents tweens sur le potentiel antimicrobien des deux huiles sur les trois germes. Ainsi, grâce à un appareil normalisé par pharmacopée européenne, l'extraction des huiles a été effectuée par hydrodistillation et leur composition chimique a été déterminée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'activité antimicrobienne des huiles a été évaluée par la méthode de microdilution dans des microplaques ELISA. Au terme de cette étude, le tween 80 s'est révélé meilleur au tween 60, car assure une bonne dispersion et diffusion des essences. Avec les deux tweens (60 et 80), l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* s'est révélée la plus efficace que celle de *Brocchia cinerea*, car elle présente les plus faibles CMI (0,15 mg/ml) et CMB (0.625 mg/ml) pour *Staphylococcus aureus* et CMI (0,3125 mg/ml) et CMB (1.25 mg/ml) pour *Escherchia coli*. L'analyse par CPG/SM de ces huiles essentielles la présence de plusieurs composés dont les majoritaires sont: Beta.-Thujone (46.80%) pour *Brocchia cinerea* et 1,8 cinéole pour *Eucalyptus globulus*.

Mots clés: Huile essentielle, plante médicinale, activité antimicrobienne

Introduction

De nos jours, l'évolution galopante de la résistance bactérienne aux antibiotiques à large spectre constitue une des plus grandes menaces de l'arsenal pharmaceutique. Il s'avère donc nécessaire de chercher d'autres alternatives qui prendront la relève des traitements anti infectieux. (1)

Les plantes par le biais des principes actifs qu'elles contiennent constituent un arsenal thérapeutique incontournable, ces plantes sont utilisées sous forme de décocté, macéré, infusé ou aussi sous forme d'huiles essentielles. Les huiles essentielles sont devenues très estimable, d'utilisation facile et sont souvent efficaces attirant de plus en plus les chercheurs. (2, 3)

En effet, l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles « dans le cadre de notre thèse il s'agit de l'activité anti-bactérienne de l'huiles essentielle de *Brocchia Cinerea* et *Eucalyptus Globulus* » Nécessite la réalisation des essais microbiologiques sur des milieux de cultures, en outre ces milieux, qu'ils soient solide ou liquide sont de nature hydrophile, cela empêche la diffusion des huiles essentielles dans le milieu de culture et réduit par conséquence leur effet, par ailleurs ce problème ne se limite pas au domaine de la recherche mais il concerne aussi la formulation des huiles essentielles en un produit sure, stable et agréable à utiliser. Pour cela l'utilisation d'un tensioactif est incontournable, d'une part il va assurer une bonne diffusion et dispersion de l'huile essentielle dans le milieu, d'autre part il va créer des émulsions qui vont minimiser sa volatilité. Malheureusement jusqu'à présent, il n'existe pas un

protocole standard généralisé à suivre lors de l'utilisation de ces tensioactifs.

Dans ce présent travail, nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de certaines molécules tensioactives (tween 20, 60 et 80) sur l'activité antimicrobiennes des huiles essentielles extraites des deux plantes qui sont *Brocchia Cinerea* et *Eucalyptus Globulus* connues par leurs diverses vertus thérapeutiques utilisés en médecine traditionnelle depuis des siècles. Ceci afin d'optimiser leur activité pour les appliquer comme remède alternatif aux antibiotiques.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des plantes médicinales suivantes:

Brocchiacinerea (Delile) Vis., 1836. (Asteraceae), *Eucalyptus globulus* Labill., 1800 (Myrtaceae) Ces plantes sont des plantes aromatiques fréquemment utilisées dans le traitement des affections respiratoires.

La récolte des parties aériennes *Brocchia Cinerea* a été faite le 12/03/2016 à Mlili, Biskra ; séchée et conservée dans un endroit aéré et sec à température ambiante.

Les d'*Eucalyptus globulus* ont été collecté dans la ville de Batna le 22/04/ 2017 dans le département de pharmacie.

Un climat désertique est présent à M'Lili. Tout au long de l'année, la pluie y est techniquement inexistante. Par contre le climat de Batna est de type semi-aride, avec quatre saisons bien distinctes.

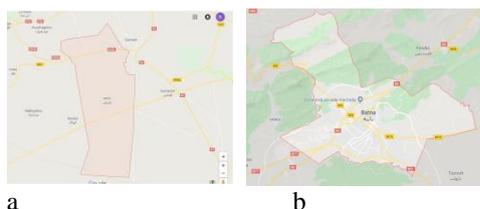


Figure 1 Photo de la région de a- M'lili Biskra b-Batna

Microorganismes

Deux souches bactériennes dont une à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et une à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922) ont été utilisées dans cette étude. Elles ont été obtenues du Laboratoire de Microbiologie (CHU Batna). Elles sont conservées dans du bouillon Muller Hinton additionné de glycérol (10%) à -20 °C.

Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation des parties aériennes des deux espèces pendant 3 heures de temps à l'aide d'un appareil d'extraction normalisé par la pharmacopée européenne (voire Figure) . L'opération est répétée plusieurs fois pour chaque échantillon de la matière végétale sèche. Le rendement en huile essentielle est déterminé en mL/Kg de matière sèche. L'huile essentielle est ensuite stockée à 4°C à l'abri de la lumière.

Etude in vitro de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

La sensibilité des germes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922) en étude aux deux huiles essentielles a été évaluée par la technique de microdilution utilisant les microplaques de 96 puits (Yayi-Ladekan et al., 2011).(4)

Détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu. La détermination de la CMI des deux extraits a été faite par microdilution et se déroule en plusieurs étapes.

Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le Bouillon Mueller Hinton (BMH) stérile seul ou avec une concentration de 0.25%, 0.5% et 1% de tween 60 ou tween 80.

Préparation de la suspension microbienne

La préparation d'inoculum bactérien est habituellement effectuée après plusieurs étapes. Initialement, les échantillons maintenus congelés ou réfrigérés doivent être activés dans un milieu MH liquide. Après 6 à 8 heures à 35 ° C, une aliquote est transférée dans un milieu de MH. Après 24 h à 35 ° C, les colonies de culture axénique peuvent être mises en suspension dans 5 mL de solution saline stérile (8,5 g / L de NaCl) et mesuré à l'aide d'un densitomètre 0,5 McFarland (correspondant à 1 -2 x 10⁸ UFC / mL) (5).

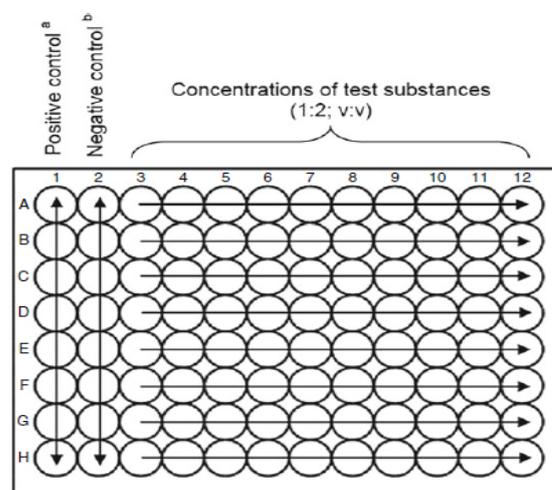
Préparation des microplaques

La technique est généralement réalisée dans des plaques en U avec 96 puits et présente des variations par rapport à la méthode originale décrite par Eloff (6). 20 µL de l'huile essentielle est ajouté dans le premier puits qui contient 170 µL de bouillon Mueller-Hinton (avec ou sans tween) les autres puits contient déjà 95 µl Mueller-Hinton (avec ou sans tween)

Après homogénéisation du premier puits 95 µl du mélange du premier puits est transféré au deuxième puits et ainsi de suite, les 95 µl du dernier puits sont éliminé.

À la fin 5 µL d'une suspension bactérienne de 3,5 × 10⁷ CFU / mL sont ajoutés à chaque puits.

Les résultats sont lus après une période d'incubation de 24 / 35 °C.



^a Microorganism + culture media;
^b Microorganism + culture media + antibiotic.

Figure 2 : Microplaques 96 puits Elisa

Détermination de la concentration minimale bactéricide des huiles

La détermination de Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des extraits d'huiles essentielles s'est effectuée conjointement à celle de la CMI.

Elle a été déterminée par ensemencement de tous les puits en partant de la CMI vers les concentrations les plus élevées sur milieu gélosé Mueller Hinton et incubés à 37 °C pendant 24 h. A l'observation, la plus faible concentration de l'extrait qui ne laisse survivre la bactérie (absence de croissance) correspond à la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).

Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Le rapport CMB/CMI de chaque huile essentielle informe sur le pouvoir antimicrobien (bactéricide ou la bactériostatique) des dites huiles sur les germes étudiés. En effet, lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, l'huile est dite bactéricide alors que s'il est supérieur à 4, l'huile est dite bactériostatique.

Analyse chromatographique des huiles essentielles

L'analyse chromatographique des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse de type Clarus 600 D MS (Perkin Elmer USA). La colonne capillaire utilisée est de type RESTEK Rtx® -5MS de 30 mètres de longueur, 0,25 mm de diamètre interne épaisseur du film 0.25µm, la phase stationnaire. Les injections ont été faites en mode splitless. L'hélium a été employé comme gaz vecteur à un débit de 1mL/min. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert ont été portées à 250 °C. La température initiale a été fixée à 60 °C et maintenue pendant 1 minute, puis augmentée de 3 °C/ min jusqu'à 200 °C et on maintient en isotherme pendant 13 minutes.

L'acquisition est faite en impact électronique à 70 eV, avec une source à 250 °C en mode Scan (de 40 jusqu'à 600). L'identification des composés ont été réalisés par comparaison des spectres de masse avec ceux donnés par les bibliothèques WILEY et NIST.

Les huiles essentielles ont été diluées dans de l'éthanol absolu à une concentration de 1 g/L.

La teneur en pourcentage des constituants des huiles essentielles est déterminée par la méthode de normalisation interne.

Traitement des données

Un masque de saisie a été conçu sous le logiciel IBM SPSS Statistics 22. Il incluait les différents microorganismes, les tweens et les huiles essentielles en étude. L'importation de ce masque dans le tableur Microsoft Excel (version 2013) a permis de générer les tableaux et les figures sur la base des données moyennes. La carte présentant les localités où les plantes ont été collectées a été réalisée par le logiciel ArcMap version 9.2.

Résultats

Rendement et composition chimique des huiles essentielles

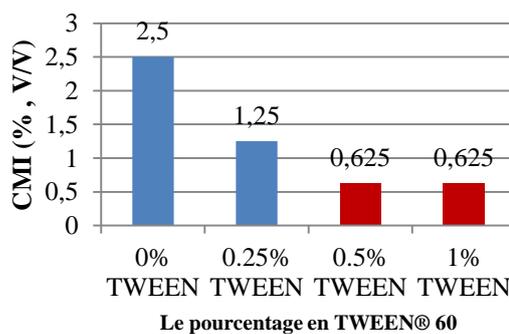
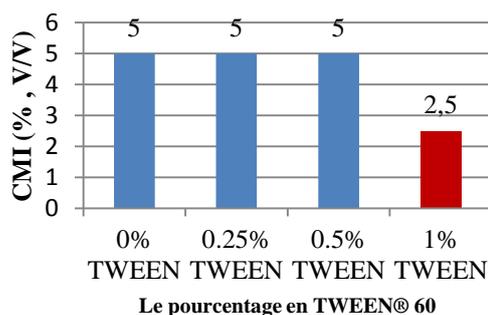
Le rendement le plus élevé en huile essentielle a été obtenu avec *E. globulus* (20 mL/Kg) et le plus faible avec *B. cinerea* (8 mL/Kg).

Le résultat de l'analyse chromatographique des huiles essentielles est présenté dans le tableau 1. De l'analyse de ce tableau, il en ressort que la plupart des constituants majoritaires identifiés sont des composés terpéniques oxygénés. Il s'agit de Beta.-Thujone pour *Brocchia cinerea* et de 1,8 cinéole, pour *Eucalyptus globulus*.

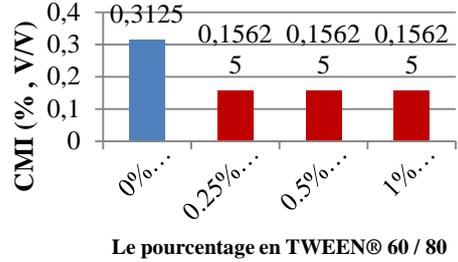
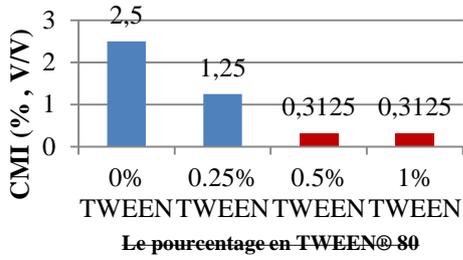
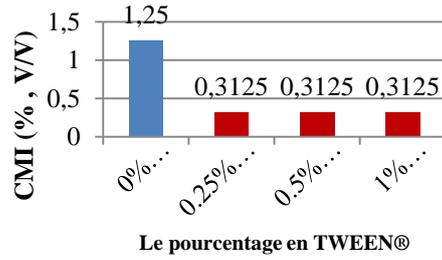
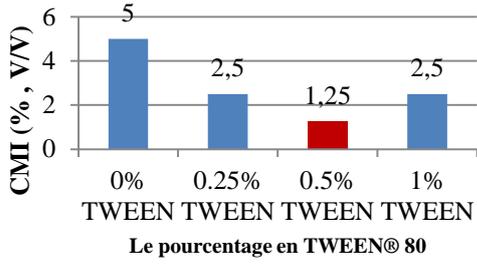
Tableau 1 : Principaux composés des huiles essentielles des deux plantes

Espèces végétales	Principaux composés
<i>Brocchia cinerea</i>	Beta.-Thujone (46.80%) 1-Methyl-2-(1'-methylethenyl)-3'-ethenylcyclopropylmethanol (15.59 %) 1,8-Cineole (12,63%) limonen-10-ol (9,47 %) 1(7),3,8-o-Menthatriene (3,45%) (-)-Camphor (2.11%)
<i>Eucalyptus globulus</i>	1,8-cinéole : (70,0 %), limonène (12,0 %), α-pinène : (9,0 %), α-phellandène (1,5 %), β-pinène (1,5 %) sabinène (0,3 %),

La figure 3 présente l'effet combiné des huiles et des tweens sur la croissance microbienne des deux germes en étude. L'analyse de la Figure 2a montre que les valeurs de CMI et de CMB de de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* décroissent de tween 60 au tween 80. Les valeurs de CMB et CMI obtenues avec le tween 80 sont pareilles à celles obtenues avec le tween 60 pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.



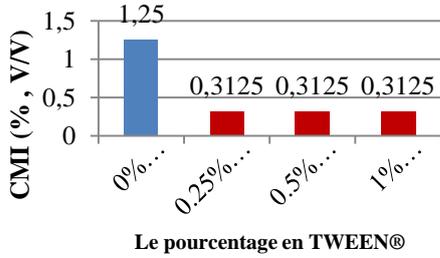
Brocchia cinerea E coli
Brocchia cinerea S aureus



Brocchia cinerea E coli
Brocchia cinerea S aureus

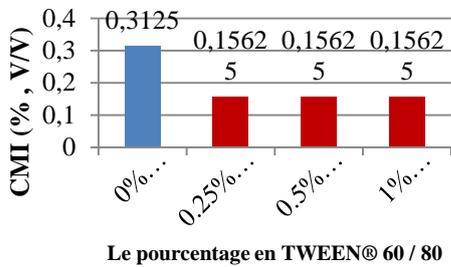
E globulus E coli 80
E globulus S aureus 80

Figure 3 : Influence des différents Tweens sur les CMI



Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Le tableau 3 montre le rapport CMB/CMI de chaque huile essentielle sur les germes étudiés. De l'analyse de ce tableau, il ressort que les deux huiles essentielles ont une propriété bactéricide (CMB/CMI ≤ 32) sur les deux bactéries en étude.



E globulus E coli 60
E globulus S aureus 60

Tableau 2 : Rapports CMB/CMI d'une huile essentielle de *Brocchia cinerea* avec ou sans TWEEN 80/60 pour *Escherichiacoli* et *Staphylococcus aureus*.

		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0%		5/5 = 1	10/2.5 = 4
T60	0.25%	5/5 = 1	10/1.25 = 8
	0.5%	5/5 = 1	10/0.625 = 16
	1%	2.5/2.5 = 1	10/0.625 = 16
T80	0.25%	2.5/2.5 = 1	10/1.25 = 8
	0.5%	1.25/1.25 = 1	10/0.3125 = 32
	1%	2.5/2.5 = 1	10/0.3125 = 32

Tableau 3 : Rapports CMB/CMI d'une huile essentielle (EG) avec ou sans TWEEN 80/60 pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0%		2.5/1.25 = 2	1.25/0.3125 = 4
T60	0.25%	0.625/0.3125 = 2	2.5/0.15625 = 16
	0.5%	0.625/0.3125 = 2	2.5/0.15625 = 16
	1%	0.625/0.3125 = 2	1.25/0.15625 = 8
T80	0.25%	0.3125/0.3125 = 1	1.25/0.15625 = 8
	0.5%	0.3125/0.3125 = 1	0.625/0.15625 = 4
	1%	0.625/0.3125 = 2	1.25/0.15625 = 8

Discussion

Le rendement le plus élevé en huile essentielle a été obtenu avec *Eucalyptus globulus* (20 mL/Kg) et le plus faible (8 mL/Kg) avec *Brocchia cinerea*. Cette variation de rendement peut être due aux aptitudes intrinsèques des espèces végétales à produire de l'huile essentielle, mais aussi aux conditions climatiques et pédologiques des sites de collecte du matériel végétal.

L'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles de *Brocchia cinerea* et *Eucalyptus globulus* sur les deux bactéries en étude a conduit à des résultats très intéressants. En effet, *Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif) se révèle plus résistante aux huiles essentielles que *Staphylococcus aureus* (bactéries à Gram positif). L'organisation architecturale de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives est moins complexe que celle des bactéries Gram négatives. Cette complexité réside dans le fait que la membrane externe des bactéries Gram négatif est hydrophile et peut bloquer la pénétration de composés

hydrophobes dans la membrane cellulaire cible. Cette différence structurale rend ainsi les bactéries Gram positif plus sensibles à l'action des huiles essentielles Kalembe, & Kunicka, 2003). La sensibilité plus marquée des bactéries Gram positif vis-à-vis des composés des huiles essentielles avait été aussi observée par d'autres auteurs (Kalembe, & Kunicka, 2003).

L'analyse de la figure 2 relative à l'influence des différents tweens sur les CMI et les CMB des huiles essentielles sur les deux germes révèle de façon générale, que les CMI et les CMB des deux huiles essentielles varient en fonction des pourcentages des tweens. Les valeurs de CMI et de CMB de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* mixée avec le tween sur *Staphylococcus aureus*, décroissent de tween 60 au tween 80 mais et aussi décroissent en fonction de pourcentage de 0 à 0.5% par contre ces valeurs se décroissent pour le tween 60 (1%) et tween 80 (0.25, 1 et 0.5 %) sur *Escherichia coli*. Les valeurs de CMI et de CMB de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sur les deux bactéries décroissent avec l'ajout de tween mais restent

constantes du tween 60 au tween 80 avec tous les pourcentages.

Des travaux antérieurs ont montré que la nature ainsi que la concentration d'un agent émulsifiant peuvent influencer l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle (Bencheqroun et al., 2012)(7). En effet, la structure amphiphile des tweens 60 et 80 leur permet de bien se disposer aussi bien à l'interface de la phase hydrophile que celle de la phase hydrophobe formant ainsi des films moléculaires (Nogarede & Amram, 1983)(8) induisant une bonne dispersion des essences dans les milieux liquides et leur bonne diffusion dans les milieux gélifiés (Kpavode, 2005)(9).

Au nombre des composants majoritaires, notons la présence du 1.8 cinéole et de beta-thujone. L'importance du 1.8 cinéole (eucalyptol) dans l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a été soulignée par plusieurs études. En fait, le 1.8 cinéole (de la famille des monoterpènes oxygénés), est un composé oxygéné particulièrement présent dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. Il entre dans la composition de différents médicaments grâce à ses propriétés antibactérienne, antiseptique et antifongique. On le retrouve dans le traitement des affections bronchiques.

Conclusion

Pour conclure, notre étude nous a amené à envisager les possibilités d'utiliser les vertus d'huiles essentielles de *Brocchia cinerea* et d'*Eucalyptus globulus* pour la prévention ou le traitement de certaines maladies infectieuses et combattre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques usuels. Cette étude pourrait constituer une base pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antimicrobiens naturels pouvant être utilisés chez l'Homme sous différentes formes galéniques, en solution aqueuse, émulsion ou autre, à usage oral ou cutané, en utilisant le Tween80 comme agent tensioactif, spécifiquement à 0.5 % pour l'huile essentielle de *Brocchia cineria*.

Bibliographie

1. De Billerbeck V-G. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 2007;5(5):249-53.
2. Chebaibi A, Marouf Z, Rhazi-Filali F, Fahim M, Ed-Dra A. Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*. 2016;14(6):355-62.

3. Baba-Moussa F, Noumavo PA, Adéoti K, Akpagana K. Composition Chimique Et Influence De Différents Tweens Sur Le Pouvoir Antimicrobien Des Huiles Essentielles De *Ocimum Gratissimum*, *Ocimum Basilicum*, *Laurus Nobilis* Et *Melaleuca Quinquenervia*.

4. Yayi-Ladekan E, Kpoviessi DSS, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi BGH, Gbenou J, Jolival C, et al. Variation diurne de la composition chimique et influence sur les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Ocimum canum Sims* cultivé au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2011;5(4):1462-75.

5. Institute CaLS. standardization of sensitivity tests with antimicrobials by disc diffusion. Guideline 2003;M2-A8(CLSI, Wayne, PA).

6. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica*. 1998;64(08):711-3.

7. Bencheqroun HK, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Chaouch A. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la société Royale des sciences de Liège*. 2012;81:21-4.

8. Nogarede A, Amram H. Les tensioactifs. *Actual Pharm*. 1983;204:93-5.

9. Kpodekon M, Boko C, Mainil J, Farougou S, Sessou P, Yehouenou B, et al. Composition chimique et test d'efficacité in vitro des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (*Ocimum basilicum*) et du basilic tropical (*Ocimum gratissimum*) sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. 2013;35:41-8.



Le dosage de médicaments pour le suivi thérapeutique pharmacologique : les principes

Pharmacologie

MISE AU POINT

N. ACHACHI^{1,2}, D. MATMOUR², A. KASSAH LAOUAR¹, H. TOUMI²¹Laboratoire Central de Biologie Médicale, CLCC-Faculté de Médecine-Batna. ²Laboratoire de Recherche en Développement Pharmaceutique, Service de Pharmacovigilance, EHU 1^{er} Novembre, Faculté de Médecine d'Oran.

Correspondance

Email : nawel.ach@gmail.com

Résumé

Le clinicien qui prescrit un traitement s'efforce d'en ajuster la posologie de manière à obtenir l'effet thérapeutique désiré avec le minimum de réactions indésirables. Bien que, la réponse aux médicaments est souvent variable d'un individu à l'autre : une même dose de médicament administrée à différents patients peut provoquer des effets pharmacologiques de nature et d'intensité très différentes. Ces effets sont très souvent la conséquence d'une variabilité de la pharmacocinétique des médicaments entraînant une modification de leur biodisponibilité. De ce fait, la demande d'un dosage sanguin de médicaments qui s'inscrit dans le cadre global du «suivi thérapeutique des médicaments» (STP) retrouve sa place incontournable. Il consiste à mesurer la concentration sanguine d'un médicament afin de déterminer si une adaptation de posologie est nécessaire pour optimiser l'efficacité thérapeutique tout en minimisant le risque de toxicité. Toutefois, tous les médicaments ne possèdent pas l'ensemble des caractéristiques requises pour un programme de STP. Ils doivent notamment posséder une marge thérapeutique étroite et une forte variabilité interindividuelle. Il nécessite ainsi d'être pratiqué de façon rationnelle, dès la discussion de l'indication à un dosage jusqu'à la décision d'adaptation posologique.

Mots clés : suivi thérapeutique pharmacologique, dosage sanguin, efficacité thérapeutique, toxicité, adaptation de posologie

Introduction

Le suivi des concentrations sanguines du lithium chez le patient souffrant d'un trouble bipolaire est largement documenté depuis les années 1950 [1]. Cependant, la notion de suivi thérapeutique pharmacologique (STP) n'est apparue que dans les années 1970, avec la mise en évidence de son utilité pour le suivi d'antibiothérapies à base d'aminosides ou encore de psychotropes comme les antiépileptiques ou les antidépresseurs tricycliques [2]. Le STP a pour objectif principal d'augmenter l'efficacité clinique du médicament et de minimiser leurs effets toxiques afin d'améliorer le bien-être du patient [3]. Qu'est-ce donc exactement que le STP (adaptation française de TDM : *therapeutic drug monitoring*) ? D'après l'*International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology* (IATDMCT), «Le «suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est une spécialité clinique multidisciplinaire dont l'objectif est d'améliorer les soins aux patients en ajustant de manière individuelle la dose des médicaments pour lesquels l'expérience clinique ou les essais cliniques ont montré que cette pratique améliorerait leur devenir, soit chez tous les patients, soit dans des populations particulières. Le STP peut être fondé sur des informations pharmacogénétiques, biométriques ou cliniques a priori et/ou sur la mesure a posteriori des concentrations sanguines des médicaments (suivi pharmacocinétique) ou de marqueurs biologiques d'effets, intermédiaires ou cliniques (suivi pharmacodynamique)» [4,5].

Il peut être résumé en trois étapes successives [4]:

- la mesure précise et fiable de la concentration sanguine d'un médicament (ou exposition au médicament) ;
- l'interprétation de cette valeur de concentration en fonction des connaissances disponibles sur les relations concentrations-effets de ce médicament ;
- le calcul et la proposition d'une posologie (à l'aide d'une modélisation pharmacocinétique), permettant a priori de maximiser les chances de succès du traitement chez un individu donné.

Pourquoi doser un médicament?

Les objectifs du dosage des médicaments dans les milieux biologiques pour surveillance thérapeutique sont divers:

- [1] vérifier l'observance du patient vis-à-vis du traitement,
- [2] optimiser une posologie pour parvenir rapidement à l'efficacité et éviter les toxicités, en particulier pour les médicaments à marge thérapeutique étroite,
- [3] vérifier qu'un événement intercurrent ne modifie pas le rapport posologie/concentration (maladie, interaction, changement de forme galénique...)[6].
- [4] établir une valeur de base efficace sans effet indésirables/toxiques, chez un patient, lors d'une thérapeutique chronique (personnalisation) [7],
- [5] vérifier une adaptation de posologie basée sur le STP.

Parfois, il sera utile dans d'autres situations [2]:

- i. suspicion d'une interaction médicamenteuse ;
- ii. traitement prophylactique ;
- iii. effets indésirables comparables à ceux de la maladie ; suspicion d'un phénomène de tolérance

ou d'échappement thérapeutique ;signes cliniques de toxicité ou inefficacité inexpliquée.

Des recherches qualitatives et/ou des déterminations quantitatives de médicaments ou de drogues peuvent être réalisées également dans un but toxicologique [6].

Quand doser les médicaments ?

En pratique, la majorité des traitements de longue durée méritent d'être pilotés d'une manière ou d'une autre [8]. En revanche, le STP n'est pas utile pour tous les médicaments ni tous les patients.

S'il est facile de mesurer cliniquement ou biologiquement le lien entre modification de posologie et efficacité, il n'aura généralement pas sa place[2]; ainsi, hors contexte particulier, il n'y a pas lieu de mesurer les concentrations sanguines d'un antihypertenseur alors que son efficacité est facilement contrôlable par la mesure de la tension artérielle ; également, le STP ne se justifierait pas pour lesquels la zone cible des concentrations est encore mal connue les antidépresseurs, les neuroleptiques ou les antiépileptiques les plus récents, ainsi pour ceux à marge et/ou zone thérapeutique très large [7, 9].

Lorsque de bons marqueurs pharmacodynamiques font défaut, le suivi des concentrations du médicament (marqueur pharmacocinétique) peut suppléer et contribuer à garantir l'efficacité d'un traitement tout en minimisant la toxicité [9].

Un médicament soumis au STP doit présenter à la fois [4]:

- une relation concentration-effet pharmacologique (thérapeutique ou toxique) meilleure que sa relation dose-effet ;
- une grande variabilité interindividuelle de la relation dose-concentration ;
- une variabilité intra-individuelle faible ou prévisible, au moins à court terme ;
- une marge et/ou zone thérapeutique étroite ;
- une réponse pharmacologique difficilement mesurable par une mesure d'effet ou encore s'il n'existe pas d'autres critères d'évaluation de l'effet du médicament [2] ;
- disponibilité d'une méthode de dosage appropriée à un cout supportable [10].

Tableau 1. Liste non exhaustive de médicaments éligibles au suivi thérapeutique pharmacologique [2].		
Niveau de preuve selon la Société française de pharmacologie et de thérapeutique (SFPT)	Médicaments	Arguments
1 : indispensable	Aminosides (gentamicine, amikacine, tobramycine)	Recommandations de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Toxicité rénale du médicament, impact important de la fonction rénale sur la concentration.
	Lithium	Exigence du résumé des caractéristiques du produit (RCP). Marge thérapeutique étroite, beaucoup d'interactions médicamenteuses (IM), impact important de la fonction rénale sur la concentration.
	Digoxine	Exigence du RCP. Marge thérapeutique étroite, impact important de la fonction rénale sur la concentration.
	Ciclosporine, tacrolimus, sirolimus	Exigence du RCP. Forte variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique, réponse difficilement évaluable cliniquement, marge thérapeutique étroite.
2 : recommandé	Vancomycine, teicoplanine	Toxicité rénale du médicament, impact important de la fonction rénale sur la concentration.
	Antidépresseurs tricycliques : amitriptyline, clomipramine, imipramine, nortriptyline	Phénytoïne : métabolisme saturable, pas de lien entre dose et concentration, marge thérapeutique étroite.
	Antipsychotiques : clozapine, olanzapine	Autres psychotropes : intérêt du STP démontré par des essais cliniques randomisés, intervalle thérapeutique disponible.
	Antiépileptiques : phénobarbital, acide valproïque, phénytoïne	Index thérapeutique faible, forte variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique, beaucoup d'IM.
	Théophylline	Forte variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique, beaucoup d'IM.
Ribavirine, saquinavir, efavirenz, indinavir, lopinavir, atazanavir	Marge thérapeutique étroite, impact possible du polymorphisme génétique sur la pharmacocinétique, forte variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique.	
Isoniazide, voriconazole, posaconazole	Contrôle de la toxicité par des mesures correctives dépendantes de la concentration (par exemple, acide folique/ carboxypeptidases pour le MTX) ou par une adaptation personnalisée de la posologie	
Certains anticancéreux : méthotrexate (MTX), carboplatine, inhibiteurs des tyrosines kinases		

Tableau 2. Liste non exhaustive de médicaments non éligibles au suivi thérapeutique pharmacologique [2].	
Médicaments	Arguments
Antidiabétiques oraux (exploration d'hypoglycémie inexpliquée, par exemple)	Mesure de la glycémie généralement suffisante
Anticoagulants oraux tels anti-vitamines K (résistance, par exemple)	Mesure de l'International normalized ratio (INR) généralement suffisante
La plupart des antihypertenseurs	Mesure de la pression artérielle suffisante
Antalgiques	Adaptation de la posologie à l'aide d'échelles visuelles analogiques (EVA)
Diurétiques (exploration d'une hypokaliémie inexpliquée, par exemple)	Ionogramme/pression artérielle suffisants
Certains psychotropes : agomélatine, asénapine, vigabatrine, la plupart des benzodiazépines	Intervalle thérapeutique mal défini ou absence de lien entre concentration et efficacité/toxicité

Modalités pratiques duSTP

Toutes les étapes comprises entre le prélèvement et le résultat d'un dosage de médicament dans un milieu biologique doivent respecter, comme toute autre analyse, les exigences réglementaires dans le domaine de la biologie.

Le matériel de prélèvement, le tube de recueil, l'anticoagulant doivent être appropriés, les conditions de transport doivent être connues et respectées, une feuille de suivi indiquant ces conditions et les renseignements chronologiques et clinico-biologiques doit accompagner le prélèvement. La méthode de dosage, validée, doit être adaptée au but du dosage, en particulier en fonction du degré d'urgence, de la spécificité, de la plage de concentrations, de la précision souhaitée.

Chaque série de dosages est valide sur le plan analytique en tenant compte notamment des résultats des contrôles de qualité. En pratique clinique, la validation biologique, après avoir situé le résultat dans son contexte chronologique, clinique et biologique, doit aller jusqu'au conseil de posologie individualisée avec ou sans soutien informatique [6].

La mesure de la concentration d'un médicament peut être réalisée à partir d'un échantillon plasmatique, sérique ou de sang total. Le choix de la matrice de dosage détermine la nature des tubes à utiliser pour le prélèvement (tubes héparinés, contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique [EDTA] ou encore tubes "secs" c'est-à-dire sans anticoagulant). Ce choix peut être fonction des caractéristiques des molécules. Parmi les immunosuppresseurs, le tacrolimus ou la ciclosporine ; se concentrent fortement dans les globules rouges, justifiant l'utilisation du sang total, alors que l'acide mycophénolique est dosé dans le plasma.

L'intervalle thérapeutique est souvent déterminé à partir d'une matrice donnée (sérum, plasma ou sang total) ; réaliser un dosage à partir d'une autre matrice peut fausser le résultat et son interprétation. La conservation d'un tube dans des conditions inadaptées (température, lumière) peut également fausser la mesure des concentrations médicamenteuses. Les préleveurs doivent se référer aux modalités de prélèvement et d'acheminement fournies par le laboratoire qui réalisera le dosage.

Pour un traitement administré de façon répétée à intervalle régulier et à posologie constante, il est généralement nécessaire que l'état d'équilibre pharmacocinétique soit atteint pour que le résultat du dosage puisse être interprété. À l'équilibre, la dose administrée compense la quantité de médicament éliminée par l'organisme entre deux prises : les concentrations du médicament fluctuent alors entre une C_{max} (au pic) et une C_{min} dite "résiduelle" (la plus petite concentration sanguine

entre deux doses de médicaments) qui restent constantes entre le jour N et N+1 et entre le jour N+1 et N+2 si la posologie est inchangée. Le plus souvent, l'intervalle thérapeutique concerne des concentrations en situation résiduelle.

Le prélèvement est ainsi réalisé juste avant l'administration de la dose suivante. La C_{max} est utile dans quelques cas très particuliers, notamment pour les antibiotiques à effet concentration-dépendant comme les aminosides. Il est considéré que l'équilibre est atteint environ cinq demi-vies après l'instauration du traitement (figure 1) [2].

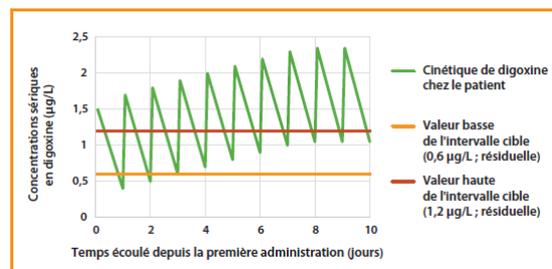


Figure 1. Évolution des concentrations sériques de digoxine en situation thérapeutique (la demi-vie est en moyenne de 36 heures)[2].

L'analyse des médicaments se fait à l'aide de méthodes diverses. Les plus fréquemment utilisées sont :

1. Les dosages immunométriques (dosage immunoenzymatique EIA ; dosage enzyme-multiplié – EMIT; dosage par polarisation de fluorescence – FPIA).
2. Les méthodes chromatographiques (chromatographie gazeuse – CPG ; liquide à haute performance – HPLC).
3. Les méthodes chromatographiques couplées à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS ; LC-MS ; LCMS/MS, appelée aussi tandem MS).

Le choix de la méthode de dosage du médicament est crucial pour quantifier la dose in vivo du médicament [3]. Ces différentes techniques se différencient notamment par leur spécificité, leur sensibilité, leur complexité, le délai d'obtention du résultat et leur tarification (points OFAS). Les méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse servent souvent de référence car ce sont les plus spécifiques et les plus sensibles, mais elles nécessitent aussi la mise en place d'une technologie poussée et coûteuse. Pour les médicaments courants, les dosages immunologiques sont de loin les plus utilisés et suffisent au suivi des patients. L'automatisation des dosages par anticorps (Ac) a grandement facilité le STP, permettant l'obtention de résultats en urgence, la nuit ou le week-end. Leur désavantage réside dans leur spécificité généralement moindre que celle des méthodes chromatographiques, en raison d'une réactivité croisée possible avec d'autres molécules ressemblantes ou des métabolites actifs

ou inactifs. L'importance de ce biais varie selon le test, le type d'Ac utilisé (polyclonal ou monoclonal) et les épitopes reconnus [10].

Interprétation des résultats de dosage de médicaments et adaptation de posologie

Interpréter correctement une concentration du médicament implique de connaître la méthode utilisée, l'intervalle de référence étant souvent fonction de cette méthode. Pour le suivi d'un patient, il est important de conserver la même méthode analytique. Après validation analytique du dosage, le praticien reçoit du laboratoire le résultat (exemple : 1,2 mg/L) et les fourchettes thérapeutiques correspondant à la méthode utilisée (exemple : 0,8-2,0 mg/L) [11, 12].

Le laboratoire de STP ne peut pas se contenter de rendre un chiffre, c'est-à-dire une concentration sans interprétation. Cette dernière doit être fondée sur les données cliniques, le délai entre l'administration et le prélèvement, les zones thérapeutiques, la population à laquelle appartient le patient, ainsi que les performances et les limites des techniques analytiques employées [13].

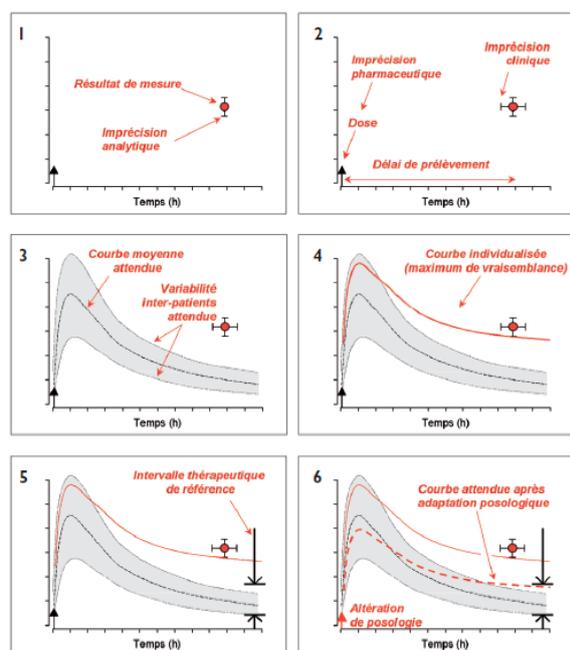


Figure 2. Les étapes de l'interprétation d'un résultat de concentration de médicament [10].

Également, pour avoir une interprétation adaptée de la concentration obtenue, le laboratoire doit disposer d'informations sur le traitement, le patient, sa pathologie, etc... [2]. Les données cliniques essentielles concernent l'indication pour laquelle le médicament est administré, les effets actuels du traitement, les pathologies associées ou l'état morbide et les données morphométriques essentielles, (taille, poids, sexe, âge). En fonction du médicament étudié, d'autres données paracliniques peuvent être nécessaires, telles que la

clairance de la créatinine. La concentration sanguine ou plasmatique d'un médicament étant une variable et non une grandeur régulée comme les constantes physiologiques, la connaissance de l'heure de prélèvement et de l'heure d'administration précédente est indispensable à l'interprétation correcte des résultats. Malheureusement, cette notion simple est difficile à recueillir auprès des équipes soignantes, en particulier paramédicales [3].

Après interprétation d'un résultat de dosage médicamenteux, il faut parfois adapter la posologie. Cette adaptation individuelle de posologie tient compte des caractéristiques morphologiques, physiologiques, pathologiques propres au patient, et non plus seulement des connaissances acquises sur la pharmacocinétique et les effets d'un médicament. Elle doit également prendre en considération les critères d'efficacité recherchés et de toxicité acceptables chez un individu.

En d'autres termes, l'objectif de concentration dépend largement du contexte : suis-je à la recherche d'une efficacité maximale quitte à prendre le risque d'entraîner une toxicité ? Au contraire, suis-je dans un cas où toute toxicité doit être évitée ? Cette approche doit faire relativiser la notion parfois simpliste d'une "zone thérapeutique" assimilée à une zone de concentration protégeant à coup sûr le patient d'un échec par sous-dosage ou surdosage [4].

Il convient de tenir compte de deux facteurs : la (ou les) maladie(s) dont souffre le patient et les médicaments associés, car de nombreuses interactions médicamenteuses sont susceptibles de modifier la pharmacocinétique des médicaments et par conséquent des effets thérapeutiques attendus différents [3].

Aspect économique du STP

Bien que la pratique du STP soit largement répandue dans les pays développés, il y a lieu de se demander si ses bénéfices cliniques justifient véritablement les coûts engendrés. Les firmes pharmaceutiques sont en principe réticentes au STP, craignant que cette approche complique l'utilisation de leur médicament et en augmente le coût [14]. Cette vision correspond toutefois mal à la réalité reflétée par diverses études coût-efficacité réalisées ces dernières décennies [15]. La majorité de ces études se sont toutefois focalisées sur les aminosides pour lesquels le STP a clairement démontré un rapport coût-efficacité favorable [16]. Dans une étude, des surdités sévères étaient observées chez plus de 1 % des prématurés avant l'implémentation d'une approche STP, du fait notamment d'une surexposition aux aminoglycosides [17]. Ces surdités, associées à des coûts médicaux et sociaux importants, sont maintenant évitées. Ainsi, le STP permet d'éviter certains gaspillages de médicaments consécutifs à

une posologie inadéquate ou certaines associations inutiles [7].

Pharmaco-économie de l'association internationale de STP [18] conclut que l'efficacité du STP est fortement corrélée à la provision d'une interprétation pharmacocinétique qualifiée, mais que l'on manque encore d'études sur de nombreuses classes de médicaments actuellement dosés. Les bénéfices encourageants observés en termes de réduction de morbidité et de mortalité imposent de combler ces lacunes et de développer la pratique du STP de la façon la plus efficace et cliniquement utile [3].

Conclusion

Un dosage médicamenteux approprié est essentiel dans le cas de STP, l'élaboration d'une stratégie d'adaptation posologique pourrait même jouer un rôle important dans la diminution de la toxicité médicamenteuse, et aussi augmenter l'efficacité thérapeutique. De nombreuses pistes existent pour rendre plus performant le suivi thérapeutique des médicaments, non seulement au niveau préanalytique ou analytique, mais aussi dans une globalité intégrant d'autres approches comme la pharmacogénétique [2].

L'avenir de la discipline devrait passer par des méthodes analytiques fondées sur la spectrométrie de masse, moins de prescriptions systématiques de dosages des médicaments et plus de demandes d'aide pharmacologique à l'individualisation thérapeutique associant pharmacocinétique et pharmacogénétique, et par la spécialisation d'équipes de pharmacologie par pathologie ou classe thérapeutique, avec implication dans la recherche clinique et/ou fondamentale correspondante [3].

Bibliographie

- 1-Schou M. Forty years of lithium treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54(1):9-13; 14-5.
- 2-Couderc, S. et N. Picard (2017). Le suivi thérapeutique pharmacologique. *Actualités Pharmaceutiques*, 56 (570), 47-50.
- 3-Abdessadek M, Khabbal Y. Personnalisation posologique des médicaments Quel apport du suivi thérapeutique pharmacologique ? *Ann Biol Clin* 2014 ; 72 (1) : 15-24.
- 4-Labarde, S. (2015). Enjeux du suivi thérapeutique pharmacologique. *Actualités Pharmaceutiques*, 54(549), 39-41.
- 5-Marquet P. Vingt ans de suivi thérapeutique pharmacologique ! *La Lettre du Pharmacologue* - vol. 21 - nos 1-2 - janvier-juin 2007.
- 6-Roux A. Dosage des médicaments .du prélèvement au résultat. *International Biol Spéc* 1999 ; 14 : 32-34 - © Elsevier, Paris.
- 7-Feuillu A. Pourquoi et quand doser les médicaments ? *Cahier de Formation- Dosage des médicaments* 1997.

Une revue systématique récente de 8-Buclin T, Decosterd LA. Pharmacologie et toxicologie : le suivi thérapeutique des médicaments – vers un pilotage précis des traitements. *Forum Med Suisse* 2005;5:1301-3.

9-Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(Suppl. 1):5S-10S.

10-Widmer N et al. Suivi thérapeutique des médicaments (I) Les principes ; *Rev Med Suisse* 2008 ; 4 : 1644-8.

11-Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 2001 ; 52 : 5S-10S.

12-Van Lent-Evers NA, Mathôt RA, Geus WP, van Hout BA, Vinks AA. Impact of goal-oriented and model-based clinical pharmacokinetic dosing of aminoglycosides on clinical outcome : a cost-effectiveness analysis. *Ther Drug Monit* 1999 ; 21 : 63-73.

13-Somma J, Donner A, Zomorodi K, Sladen R, Ramsay J, Geller E, et al. Population pharmacodynamic of midazolam administered by target controlled infusion in SUCI patients after CABG surgery. *Anesthesiology* 1998 ; 89 : 430-43.

14-Buclin T, Decosterd LA. Pharmacologie et toxicologie : le suivi thérapeutique des médicaments vers un pilotage précis des traitements. *Forum Med Suisse* 2005 ; 5 : 1301-3.

15-Sheiner LB, Beal S, Rosenberg B, Marathe VV. Forecasting individual pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1979 ; 26 : 294-305.

16-Ensom MH, Davis GA, Cropp CD, Ensom RJ. Clinical pharmacokinetics in the 21st century. Does the evidence support definitive outcome ? *Clin Pharmacokinet* 1998 ; 34 : 265-79.

17-Borradori C, Fawer CL, Buclin T, Calame A. Risk factors of sensorineural hearing loss in preterm infants. *Biol Neonat* 1997 ; 71 : 1-10.

18-Vinik HR, Revues JG, Greenblatt DJ, Abernethy DR, Slith LR. The pharmacokinetics of midazolam in chronic renal failure. *Anesthesiology* 1983 ; 59 : 390-4.



L'évènement du mois

Les deuxièmes journées Aurassiennes de Biologie Moléculaire (JABM II)

La journée scientifique (JAMB II) est une des activités centrales des programmes du Laboratoire Central de Biologie Moléculaire (LCBM). Nous vivons depuis l'année passée (2018), des journées de formation et d'information en Biologie Moléculaire, les étudiants et chercheurs se réunissent pour une journée annuelle dont le niveau se compare très favorablement aux congrès internationaux de biologie moléculaire. Au cours de cette journée, les professeurs, maître de conférences, maître-

assistants spécialistes, résidents et étudiants de maîtrise et de doctorat en biologie présentent leurs travaux sous forme d'affiches ou de présentations orales. Cette journée qui invite le monde des biologistes à participer massivement aux prochaines rencontres est l'occasion de nombreuses discussions entre les étudiants et les chercheurs/professeurs. La journée a vu la participation d'un nombre important de scientifiques des différentes disciplines biologiques, médecins, pharmaciens, biologistes, vétérinaires...

A cette occasion le président du comité d'organisation Professeur A. KASSAH-LAOUAR a prononcé un mot lors de l'inauguration dans lequel, il a retracé l'histoire de la biologie moléculaire à travers le temps.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Centre de Lutte Contre le Cancer
Laboratoire Central de Biologie Médicale



2^{ème} Journée Aurassienne de Biologie Moléculaire

Thème :

Place de la Biologie Moléculaire en Biologie Médicale

Président de la journée : Pr Kassah-Laouar Ahmed

Secrétaire générale : Dr Khebri Mouna

23 & 24 Octobre 2019
La salle des conférences 2ème étage / CLCC Batna

Tel : 0553531255 Email : lcbm.cacbatna@gmail.com



Affiche des JABM II





Le temps de la Biologie Moléculaire

Nous vivons en ce moment une période débordante d'enthousiasme et offrant un large éventail de possibilités pour la recherche biomédicale. Les disciplines en médecine et en sciences naturelles, notamment la biologie, se rapprochent plus que jamais, et les technologies modernes permettent de répondre aux questions avec un niveau de précision et de compréhension qui dépasse tout ce que nous avons vécu jusqu'ici. Les génomes de multiples êtres vivants sont aujourd'hui déchiffrés. C'est en 1900 que le botaniste hollandais Hugo de Vries redécouvrit les lois de Mendel qui permettait de comprendre les règles de la transmission héréditaire des traits caractéristiques des organismes. On ignorait alors sous quelle forme concrète existait le patrimoine héréditaire dans les cellules. En 1915, Thomas Morgan (New-York Usa) démontra que l'ensemble des chromosomes portait les "gènes". En 1944, O.Avery découvrait l'acide désoxyribonucléique ou ADN, ce qui permettait à Crick et Watson (Cambridge Grande-Bretagne) de comprendre en 1953 comment l'information héréditaire était enregistrée sous forme d'un message codé dans les gènes. Leur découverte, sans doute l'une des plus grandes du XX^e siècle, démontre comment le message héréditaire est écrit dans les gènes sous forme d'une suite de symboles constitués par les unités chimiques de l'ADN (nucléotides).

Vingt ans plus tard, le génie génétique se développe grâce aux progrès de la chimie des acides nucléiques. Des enzymes particulières sont mises au point au début des années 1970. Grâce à ces

"manipulations génétiques", les biologistes ont pu faire produire dès 1978 à des bactéries des hormones humaines (insuline, hormone de croissance). Les autres outils du génie génétique ont été mis au point à la fin des années 1970 ("sondes génétiques"). Il faut noter que la PCR est probablement l'une des découvertes scientifiques les plus importantes et les plus innovantes, c'est grâce à cette technique, que la biologie moléculaire a accompli en peu d'années des progrès sans précédent. On comprend son intérêt dans le domaine de la biologie moléculaire lorsqu'on souhaite identifier une séquence précise d'ADN, la modifier, rechercher une mutation puisqu'on peut travailler sur une énorme quantité de matériel. Grâce à cette technique couramment utilisée dans tous les laboratoires de recherche, il a été possible de s'attaquer au projet de décodage complet du génome humain. Les applications de la PCR s'étendent à de nombreux secteurs de la recherche scientifique allant de l'examen des momies égyptiennes à la criminologie pour identifier un criminel à partir d'un seul cheveux... La PCR sert aussi à diagnostiquer certaines maladies, notamment infectieuses. En effet, pour reconnaître la présence d'un virus ou d'une bactérie chez un malade, il suffit de prélever un échantillon biologique puis d'amplifier une séquence génétique spécifique de l'agent infectieux. Quelques fragments d'ADN bactérien ou viral suffisent. Les infections à chlamydiae, le sida bénéficient déjà de ces recherches.

Je vous souhaite la BIENVENUE.

Professeur A.KASSAH-LAOUAR

Intérêt de la quantification de la charge virale dans le Dgc et le suivi des infections à *Herpesviridae*: expérience du LCBM- CLCC-Batna

Communication présentée lors des JABMII

Biologie moléculaire

Article original

A. KASSAH-LAOUAR-M.K.KHEBRI-A.BENHARRA- Y.LOMBARKIA-S.BACHIR-. K.HELLAL.

Unité de Biologie Moléculaire-LCBM-CLCC-Faculté de Médecine-BATNA

Correspondance : Email : prkassah@yahoo.fr

Résumé :

La mesure de la charge virale est un progrès important pour la compréhension physiopathologique, le diagnostic et le suivi thérapeutique des infections virales. Les méthodes de PCR quantitative, en particulier la PCR en temps réel, ont rendu la mesure des acides nucléiques viraux (ADN-ARN) sensible, reproductible, accessible et applicable à un grand nombre de liquide biologique (sang total, plasma, LCR...). La mesure de la charge virale des infections à *Herpesviridae* (CMV, EBV et HHV6) est actuellement devenue un élément incontournable dans le diagnostic et la surveillance des sujets immunodéprimés. De même cette quantification est utilisée pour anticiper la survenue des lymphoproliférations associées en cas d'infection à EBV.

Mots clés : charge virale-CMV-EBV-HHV6

« L'arsenal diagnostique est pléthorique et performant mais doit être utilisé avec un certain esprit critique, sous peine de s'égarer et de perdre du temps et de l'argent»

Introduction

La mesure de la charge virale (CV) est un progrès important dans la compréhension: de la physiopathologique, le diagnostic et le suivi thérapeutique des infections virales (CMV, EBV et HHV6 et 8). La RT-PCR a rendu la mesure des acides nucléiques sensible, reproductible, accessible et applicable à un grand nombre de matrices biologiques, au premier rang desquelles le **sang total**, le **plasma**, **urines**, **liquide broncho-alvéolaire (LBA)** et le liquide cérébro-spinal (LCR). La mesure de la CV à CMV est un élément essentiel de la surveillance des sujets **immunodéprimés**, de même elle anticipe la survenue de syndromes **lymphoprolifératifs** associées dans le cas des atteintes à EBV.

Objectifs:

- Évaluer la prévalence des HHVs (CMV-EBV-HHV6) dans une population
- Evaluer la mesure de la charge virale des HHVs (CMV-EBV-HHV6) par amplification génique.

Séroprévalence

Alpha – Herpes virus	Bêta-Herpes virus	Gama –Herpes virus
HSV-1 : 70-80% HSV-2 : 20-30% VZV :> 90%	CMV : 50-60% HHV6 : > 90% HHV-7> 90%	EBV : >90% HHV-8 : 2-5%

Mesure et signification de la charge virale

La quantité de virus présent dans un tissu ou un fluide biologique est appelée **charge virale**. Cette CV est un Paramètre biologique essentiel pour le diagnostic, le Pronostic et le suivi Thérapeutique des infections virales humaines. Cette **CV est mesurée par PCR en temps réel qui est une technique sensible** qui permet une large plage de quantification et un **seuil** de détection de **20UI**. Depuis 2013, les résultats sont exprimés en **UI/ml**.

1IU/ml-→2,4-5,2 copies/ml

La CV est un évènement majeur qui permet la quantification des ac. Nucléiques par une technique de PCR, spécifique, rapide et précise. L'ADN bicaténaire génomique des herpes virus, qui se trouve soit dans les particules virales, soit dans les noyaux des cellules infectées, est détectable grâce à **l'hybridation moléculaire**. La quantification des **ARN messagers** ou **transcrits** reste un objectif pertinent pour le diagnostic formel d'une **réactivation** virale survenant à partir de l'état de latence mais nécessite encore des développements techniques pour gagner en spécificité et en sensibilité.

La spécificité de la réaction repose sur l'utilisation d'amorces strictement complémentaires de l'ADN du virus cible. La quantité de produits amplifiés est estimée, à tout moment de la réaction et sans ouvrir

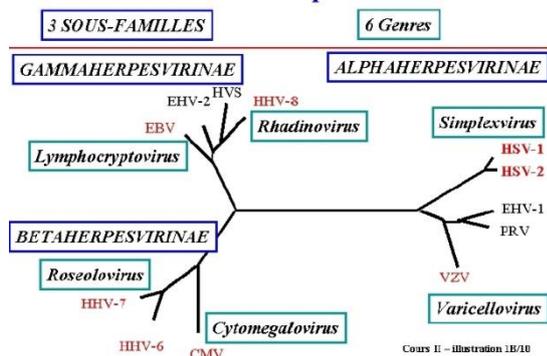
Séroprévalence du HHV-8 en Afrique : 30-50 %

le tube réactionnel, par mesure de la fluorescence produite par une sonde spécifique. Le résultat de l'échantillon de départ est exprimé en nombre de copies du génome viral par référence à une gamme étalon externe qui sera converti en IU/ml.

Dans certaines infections virales chroniques (CMV, EBV..) une PCR positive n'est pas synonyme de maladie, le développement et la standardisation des PCR quantitatives permettront de définir des seuils ou d'observer des cinétiques associées à une pathologie.

Classification des Herpesviridae

Il existe plus de 120 espèces avec une espèce pathogène pour l'homme, Virus B du singe : *Herpes virus simiae*



Huit virus herpes humains sont identifiés

Propriétés communes

Ces virus ont en commun certains caractères. virus à DNA de poids moléculaire élevé (150 à 230.000 paires de bases), codant donc un grand nombre de protéines (une centaine). Une capsidie icosaédrique faite sur le même modèle et un péplos ou enveloppe, dérivé de la membrane nucléaire
Epidémiologie: ubiquitaires, Réservoir spécifiquement humain, séroprévalence élevée, 60 % à 100 % de la population générale est séropositive

- biologie : établissement d'une latence
- Importance médicale
- fréquence des infections
 - ❖ - gravité en fonction du terrain
 - ❖ Asymptomatique chez l'individu sain mais persiste à vie sous forme latente
 - ❖ Symptomatique chez les immunodéprimés (VIH, greffés) et nouveau-nés.

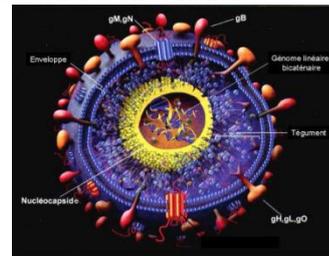
Transmission par le sang, la salive et les urines, les sécrétions génitales, le lait maternel ; l'excrétion est asymptomatique.

Deux pics d'acquisition : CMV et EBV

- **Petite enfance, avant 3 ans**
 - Crèches, collectivités
 - Frères et sœurs
 - Allaitement
- Adolescence
 - Transmission **sexuelle**
- **et pendant la Grossesse**
 - 70% des cas avec exposition professionnelle ou familiale à des enfants en bas âge (salive urines)

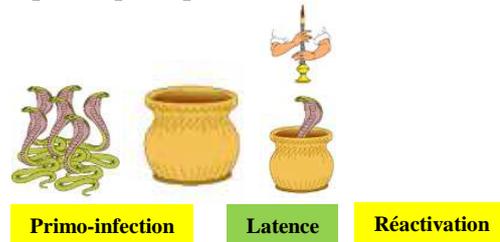
Pathogénie.

- Interaction étroite avec le système immunitaire
- Tropisme pour les cellules épithéliales et fibroblastiques et pour les cellules souches hématopoïétiques (CSH)
- Infection des cellules dendritiques
- Latence dans les précurseurs médullaires et les cellules endothéliales.



Reddehase. *Molecular Biology and Immunology* 2006

3 phases principales:



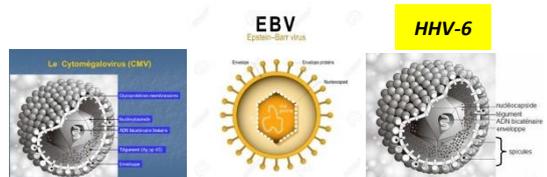
Sites de latence :

Les cellules constituant le siège de la latence virale diffèrent selon les virus
 - EBV: Lymphocytes B, cellules épithéliales
 -CMV Monocytes-macrophages, cellules CD34+ de la moelle osseuse, cellules endothéliale
 - HHV-6A- HHV-6B Lymphocyte T, CD4+, CD8+, NK, Monocytes-macrophages, cellules épithéliales salivaire,

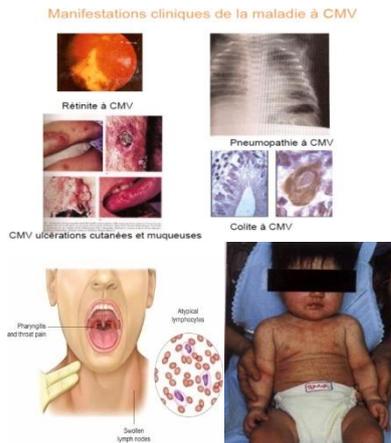
Clinique

Mononucléose infectieuse (MNI) : CMV-EBV

Exanthème subit/ (HHV6) et de la roséole.



Mode de transmission



- Graves chez l'immunodéprimé - la femme enceinte.

Réactivation++ : rôle de la prolifération allogénique (transfusion, allogreffe)

Intérêt de la surveillance de la réplication virale dans les infection à *Herpesviridae*.

La quantification de la CV aide à :

- l'identification de patients à risque
- déterminer le seuil de charge virale au-delà duquel le risque de maladie est haut
- détermine le début précoce du traitement de l'infection à CMV +++(virus se réplique rapidement).
- Mesures de charge virale utiles pour surveiller la réponse au traitement et prédire le temps requis pour réduire la charge virale au minimum (cinétique),

Nombreux cancers:

- Lymphome de Burkitt,
- Cancer du nasopharynx,
- Cancer du colon, du cerveau...

Latence

- infections asymptomatiques ou bénignes

Mesure de la charge virale circulante.

Virus	Surveillance CV	Seuils proposés
CMV	Surveillance de la CV: sang total/plasma: ↑ CV → prédictive de maladie à CMV Antigénémie pp65 → seuil 25-50 cellules/2.10E5) : IFI ADNémie par RT-PCR (Inf,active) (virus ne circule pas libre dans le sang) Sang total sur EDTA: matrice tous virus--- ADNémie plus précoce dans le sang total/plasma - →RT PCR+++	<ul style="list-style-type: none"> • Seuil : 1000-10 000 copies/ml (UI/ml) • Receveurs organe solide: 2275 (3,35 log) UI/ml • CSH: <ul style="list-style-type: none"> - 135 (2,13 log) UI/ml de plasma - 2500-5500 (3,4-3,7 log) UI/ml de sang total <p>Corrélation imparfaite Agpp65/ADNémie : utiliser l'un ou l'autre pas les deux</p>
EBV	<ul style="list-style-type: none"> • qCV: sang et plasma (virus sont à la fois en phase de latence et en phase productive) • 	<ul style="list-style-type: none"> • ADNémie > 10 000 UI/mL ou 10 000 copies/mL • Indication du TRt en cas de greffes de CSH: <ul style="list-style-type: none"> • 10 000 UI/mL (anticipé) • > 100 000UI/mL (greffé ou non) --> ξd L.P. • 10 000-100 000 UI/mL → zone grise --> confrontation clinico-biologique,
HHV6	<ul style="list-style-type: none"> • Q CV: sang total+++ (virus intra-leucocytaire) • 	<ul style="list-style-type: none"> • ADNémie: 1000 copies/ml de génome viral par ml de sang total. • ADNémie: > 10⁶ UI/mL, très élevée et stable --> une intégration chromosomique de HHV6A et HHV6B. • -> Confirmer par échantillon. de follicules pileux ou d'ongles. • CV Tissu > CV Sg total -> multiplication in situ (tissu)

Evolution de la charge virale circulante sous traitement

- **Négativation de la PCR en 15-21 jours (dépend de la charge virale initiale)**
- Seuil de sensibilité:
 - Sensibilité 200 –500 copies/mL

→ Valeur de CV détectée dans 95% des cas

→ Valeur de CV NON détectée dans 5% des cas

Notre expérience

Matériels et Méthodes

Cadre et population d'étude:

- Type d'étude: rétrospective
- Echantillonnage: 221 prélèvements recueillis sur tube **EDTA**
- Centre de l'étude: LCBM-BM-CLCC-Batna,
- Période: Décembre 2017-Septembre 2019,
- origine des prélèvements: tt ETB confondus (CHU-EPH Batna-CCLCC Batna et externes),**tous les prélèvements étaient à visé Diagnostic (pré-greffes/post-greffes)**

2- Méthodes d'étude:

- **Collecte des échantillons:** Les échantillons de sang prélevés ont été conservés à - 20°C. pour une utilisation ultérieure,

Extraction et amplification de l'ADN viral (EBV, CMV, HHV6):

l'ADN viral a été extrait a partir du **sang tota**/du plasma a l'aide du kit «DNA-Sorb-B » (SACACE biotechnologies R, Italie). L'amplification a été réalisée en utilisant le kit«Multiplex Real Time PCR Kit for quantitative détection and differentiation of Cytomegalovirus, Epstein Barr virus and Human Herpes 6 virus, SACACE biotechnologies R, Italie»a l'aide de l'appareil PCR, SaCycler-96 Real Time PCR v.7.3 (Sacace Biotechnologies). Le volume réactionnel était de 25µl dont 10µl d'ADN.

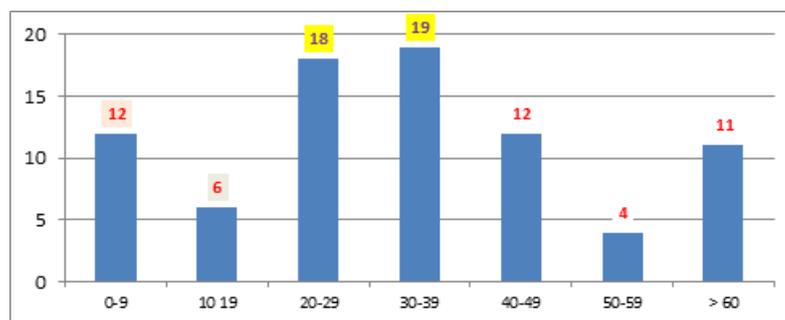
Le programme d'amplification sur SaCycler-96 pour la PCR multiplex en temps réel des HHVs était le suivant: 1 cycle de 95°C pendant 15 minutes, 5cycles composes de 95°C pendant 05s, 60°C pendant 20s, 72°C pendant 15s; et 40 cycles composes de 95°C pendant 05s, 60°C pendant 30s et 72°C pendant 15s.

Résultats

Tableau I : Prescription RT PCR en fonction des services:

	Néphro	Infectieux	Chirurgie	Med.interne	Autres	Total
Ech.	128	24	14	212	43	221
Fréq.%	57.9	10.85	6.33	5.4	19.45	100

Graphe 1 : Distribution en fonction de l'âge



Sex-ratio: 1.4

Moyenne d'âge: 34,5

Prévalence des infections HHVs (EBV, CMV, HHV6) dans la population d'étude par RT-PCR :

- sur les 221 échantillons analyses, **54,3%** (120/221) étaient positifs à au moins un des trois herpes virus (EBV=49, CMV=67, HHV6= 4).

L'infection la plus fréquente était celle liée au CMV (**30,3%** soit 67/221) suivie des infections à EBV (**32,45%** soit 49/154) et au HHV6 (**2,6%** soit 4/154).

Co-infections:

	CMV + EBV	CMV + HHV6	EBV + HHV6	CMV + EBV + HHV6
Ech.	17	0	2	2
Fréq.%	11	00	1.6	1.2

Nous avons trouvé 21 cas de coïnfections sur les 154 prélèvements reçus par au moins un des trois herpès virus humains (21/154), soit une fréquence de 13,6%. La coïnfection CMV+EBV était majoritaire (17/154 soit 11%).

Discussion

- **2013:**
 - Etude 200 échantillons de plasma sanguin de femmes enceintes au Burkina-Faso:
 - 18 (9,0%) étaient positifs à au moins un des trois virus,
 - 12 (6,0%) au EBV, 13 (6,5%) au CMV et 12 (6,0%) positifs au HHV-6.
 - 10/18 cas (55,6%) coïnfections
 - 90,0% (9/10) d'infection multiple EBV/CMV/HHV6
 - 10,0% de coïnfection EBV/HHV6.
- **CMV:**
 - Koweit: 4.5%-10,11%
 - Egypt: 12%, 18.18%, 30% et 30.16%
- **HHV6:**
 - Italie: 1.00%
 - New York (USA): 22.80% et 22.20% (sang périphérique et Cellules mononucléées. Cette discordance des résultats HHVs peut s'expliquer non seulement par: lanature du fluide biologique utilisé mais aussi par les stades d'infection (primo-infection, réactivation, réinfection), Etat immunologique des patients, Sensibilité et spécificité des tests (PCR multiplex en temps réel et la PCR quantitative en temps réel). En effet, la virémie serait plus élevée dans l'urine maternelle et le liquide amniotique que dans le plasma sanguin.

Conclusion

- La mesure de la CV par PCR quantitative est un progrès important dans la compréhension et la prise en charge médicale des infections à CMV, EBV,HHV-6 et HHV-8.
- Penser à une meilleure standardisation des techniques.

- **Avenir proche: Marqueurs biologiques de transcription virale, de modifications épigénétiques des génomes viraux, effecteurs cellulaires et humoraux de la réponse immunitaire antivirale** --> compléter les contributions de la mesure de la charge virale dans la gestion des infections à herpèsvirus

Bibliographie :

- 1-Adjei Andrew A, Armah Henry B, Gbagbo Foster, Boamah Isaac, Adu-Gyamfi Clement, Asare Isaac. Serovalence of HHV-8, CMV and EBV among the general population in Ghana, West Africa. BMC Infect Dis. 2008 Aug 18; 8:11. **PubMed | Google Scholar**
2. Al-Awadhi Rana, Al-Harmi Jihad, Alfadhli Suad. Prevalence of cytomegalovirus DNA in cord blood and voided urine obtained from pregnant women at the end of pregnancy. Med Princ Pract. 2013; 22(2): 194-9. **PubMed | Google Scholar**
3. Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. Obstet Gynecol. 2001; 97(3): 443-8. **PubMed | Google Scholar**
4. Bagheri Leila, Mokhtarian Hossein, Sarshar Narges, Ghahramani Mohammad. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection during pregnancy in Gonabad, east of Iran: a crosssectional study. J Res Health Sci. 2012; 12(1): 38-44. **PubMed | Google Scholar**
- 5- El-Sayed Zaki Maysaa, Goda Hossam. Relevance of parvovirus B19, herpes simplex virus 2, and cytomegalovirus virologic markers in maternal serum for diagnosis of unexplained recurrent abortions. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131(6): 956-60. **PubMed | Google Scholar**

Louis PASTEUR (1822-1895)

Première PartieAdapté de Wikipedia

Le pionnier de la bactériologie



Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-Batna
prkassah@yahoo.fr

"Le hasard ne favorise l'invention que pour des esprits préparés aux découvertes par de patientes études et de persévérants efforts."

Biologiste et chimiste français, créateur de la bactériologie et de la microbiologie.

"Louis PASTEUR n'a été ni médecin ni chirurgien, mais nul n'a fait pour la médecine et la chirurgie autant que lui. Parmi les hommes à qui la Science et l'Humanité doit beaucoup, Pasteur est resté souverain." Henri Mondor de l'Académie Française.

La vie de Pasteur est toute empreinte de simplicité et de qualité morale. Tout dans son œuvre scientifique est articulé avec tant d'harmonie, qu'on dirait l'homme prédestiné et sa mission réglée par quelque puissance surnaturelle.

Chimiste de formation, il sera à l'origine des plus formidables révolutions scientifiques du XIX^{ème} siècle, dans les domaines de la biologie, l'agriculture, la médecine ou encore l'hygiène, jusqu'à la mise au point du vaccin contre la rage.

Emaillée de découvertes révolutionnaires, la vie de Louis Pasteur est aussi marquée par plusieurs drames qui ont sans doute contribué à motiver sa soif de comprendre les maladies de son époque. Infatigable et passionné, il n'a pas hésité à traverser la France pour aller au bout de ses théories ou pour résoudre les problèmes agricoles et industriels posés par les maladies infectieuses.

Considéré comme l'un des pères de la **microbiologie**, Louis Pasteur s'est dévoué corps et âme pour faire avancer la science et la médecine. Au cours de sa carrière, il n'a pas seulement découvert le vaccin contre la rage, il s'est penché sur de nombreux domaines. De la fermentation au développement scientifique de la vaccination, Louis Pasteur a montré une détermination sans borne.

Très tôt, il fait preuve d'un vif intérêt pour les leçons qui lui sont enseignées et ses capacités intellectuelles ravissent tous ses professeurs.

La tâche est rude, mais quelques années de préparation lui permettent d'atteindre son objectif et

de se consacrer pleinement à la chimie et à la physique. **Son attention se fixe plus particulièrement sur la cristallographie, qui devient le sujet de sa thèse. Ainsi, il pose les fondements de la stéréochimie.** Couronné de succès, il obtient un poste de professeur à Dijon. Il enseigne par la suite à Strasbourg avant d'être nommé doyen et professeur de chimie à la nouvelle université de sciences, à Lille.

Naissance et enfance de L. Pasteur

Louis Pasteur est né en 1822 dans la maison familiale de Dole, dans le Jura, troisième enfant de Jean-Joseph Pasteur et de Jeanne-Étienne Roqui. Il est baptisé dans la Collégiale Notre-Dame de Dole le 15 janvier 1823. Son père, après avoir été sergent dans l'armée napoléonienne, reprit la profession familiale de tanneur. En 1827 la famille quitte Dole pour Marnoz lieu de la maison familiale des Roqui, pour finalement s'installer en 1830 à Arbois (maison de Louis Pasteur à Arbois), localité plus propice à l'activité de tannage. Le jeune Pasteur suit à Arbois les cours d'enseignement mutuel puis entre au collège de la ville. C'est à cette époque qu'il se fait connaître pour ses talents de peintre ; il a d'ailleurs fait de nombreux portraits de membres de sa famille et des habitants de la petite ville.

Dès son enfance il adorait dessiner. À cet âge, son talent pour le dessin était bien supérieur à ses

capacités scientifiques. Personne n'aurait pu imaginer la carrière qu'il a suivie par la suite !

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, il n'était pas un élève brillant. À l'époque, les sciences ne le passionnaient pas. Il adorait peindre ou graver des dessins. Son père souhaitait qu'il devienne professeur. Il a obtenu un baccalauréat littéraire en 1840 et ce n'est que deux ans plus tard que qu'il s'est orienté vers les mathématiques. Il est persuadé que pour faire avancer la science, il faut associer différentes disciplines. C'est pour cela qu'il a voulu être également diplômé de physique, chimie et biologie.

Sa formation

Il part au lycée royal de Besançon. Puis, en octobre 1838, il le quitte pour l'Institut Barbet à Paris afin de se préparer au baccalauréat puis aux concours. Cependant, déprimé par cette nouvelle vie, il abandonne cette idée, quitte Paris et termine son année scolaire 1838-1839 au Collège d'Arbois. À la rentrée 1839, il réintègre le collège royal de Franche-Comté, à Besançon. En 1840, il obtient le baccalauréat en lettres puis, en 1842, après un échec, le baccalauréat en sciences mathématiques. Pasteur retourne à Paris en novembre. Logé à la pension Barbet où il fait aussi office de répétiteur, il suit les cours du lycée Saint-Louis et assiste avec enthousiasme à ceux donnés à la Sorbonne par Jean-Baptiste Dumas ; il a pu également prendre quelques leçons avec Claude Pouillet.

A Paris il suit des conférences à la Sorbonne et effectue au lycée Saint-Louis une année de préparation à l'entrée à l'École Normale. En 1843 il est finalement admis – quatrième – à l'École normale. Il a pour maître Jean-Baptiste Dumas, ce professeur fait sur lui une impression profonde : "... Un de ces éveilleurs d'idées qui suscitent les vocations scientifiques.

Licencié ès sciences en 1845, il est nommé professeur de physique au lycée de Tournon en Ardèche, mais reste attaché à l'École Normale Supérieure comme agrégé préparateur.

Dorénavant les travaux de Pasteur vont se dérouler sur trois périodes.

Il exerce comme professeur de physique au lycée de Dijon en 1848. Il entreprend des recherches sur le dimorphisme et fait à l'Académie des Sciences une communication historique "Sur la relation qui peut exister entre la forme cristalline et la composition chimique, et sur la cause de la polarisation rotatoire" (le dédoublement du paratartrate de soude et d'ammoniaque) qui par sa qualité, lui assure bientôt la notoriété. Puis en 1849 il est nommé professeur agrégé suppléant de chimie à la faculté des sciences de Strasbourg.

Mariage de Pasteur.

Il épouse, le 29 mai 1849, Marie Laurent, fille du recteur de l'académie de la ville. Pour se faire accueillir, il fait état de ses plus nobles projets,

pense plus sérieusement à l'Institut. Mais c'est un amoureux émotif et attendri, doutant et espérant, il écrit : "Je sens bien que je n'ai rien de ce qui, tout d'abord, plaît à une jeune fille. Mais mes souvenirs me disent que quand j'ai été beaucoup connu des personnes, elles m'ont aimé." Il songe presque à abandonner ses cristaux tant son cœur est déchiré et impatient. Le mariage sera qualifié "d'union exemplaire." De 1850 à 1863 naissent, dans le ménage de Pasteur quatre filles et un fils; trois des filles meurent entre 1859 et 1866. Durant quelques mois, à la suite de la mort de sa mère, Pasteur va rester effacé, plongé dans un chagrin profond. Son équilibre affectif retrouvé, il s'intéressa à nouveau avec plus d'ardeur à ses travaux.

En 1851 et 1852 Pasteur publie deux mémoires sur les acides aspartique et malique.

Il devient titulaire de la chaire de chimie de la faculté de Strasbourg en 1852 et découvre qu'un rayon de lumière polarisée est dévié ou non, selon la nature de la solution qu'il traverse. La stéréochimie des cristaux est née.

Cette même année, c'est la Révolution. Pasteur rassemble ses modestes économies pour les offrir à la Patrie en un autel élevé place du Panthéon.

En 1853, Pasteur est fait Chevalier de l'Ordre Impérial de la Légion d'Honneur. Il reçoit le prix de la Société de Pharmacie de Paris pour la synthèse de l'acide racémique.

En 1854, après plusieurs années de recherche et d'enseignement à Dijon et à Strasbourg, Pasteur est nommé professeur et doyen de la faculté des sciences de Lille.

Pasteur partit pour Lille, devint doyen de la faculté des sciences et professeur de chimie. A l'origine, cette faculté avait été fondée, en partie au moins, pour résoudre les problèmes pratiques de certaines industries de la région, en particulier dans le domaine de la production de boissons alcoolisées.

Dès 1855, Pasteur débute des études sur la fermentation et la vie anaérobie.

Au temps de Pasteur, le terme de fermentation était appliqué aux altérations qui se produisent souvent dans les solutions organiques et qui aboutissent à des substances alcoolisées ou acides. Les processus fermentaires étaient déjà connus dans l'Antiquité: ils permettent en effet d'obtenir des aliments agréables et des boissons savoureuses.

Les changements qui se produisent dans les cuves de fermentation laissaient croire à l'existence de forces mystérieuses. L'idée que les levures jouent un certain rôle dans ce phénomène n'était pas nouvelle, mais c'est Pasteur qui démontra en 1856 que la production d'alcool est bien due à des micro-organismes très difficiles à voir au microscope.

C'est en examinant une solution d'acide paratartrique qu'il s'était aperçu que, sous l'effet d'une moisissure, cet acide avait fermenté et qu'il s'était dissocié : on ne trouvait plus dans le liquide fermenté que l'acide tartrique gauche, l'acide

tartrique droit avait été décomposé "désassemblé". Ainsi, une substance inactive sur la lumière polarisée (acide paratartrique) était devenue active (acide tartrique gauche) sous l'influence d'une fermentation.

En 1857, il est rappelé à Paris, où il est nommé administrateur et directeur des études scientifiques de l'école Normale Supérieure de Paris.

Cette même année il publie deux mémoires un "*Mémoire sur la fermentation appelée lactique*", l'autre sur la fermentation alcoolique qui établit l'origine microbienne de la fermentation et peut être considéré comme l'acte de naissance de la microbiologie.

Dans les conditions naturelles, toutes les fermentations sont l'œuvre d'un micro-organisme vivant : le ferment. "**Les fermentations sont une œuvre de vie.**" et à chaque fermentation répond un ferment particulier. Il arrive à multiplier ces micro-organismes et c'est à cette occasion qu'il imagina la méthode des cultures pures qui sera dorénavant la base des études bactériologiques. Certains ferments ne peuvent vivre qu'en présence d'oxygène. Pour d'autres, au contraire, l'oxygène a la valeur d'un poison. Ainsi la distinction était faite pour la première fois entre deux modes de vie: l'aérobiose et l'anaérobiose. Il démontre que les germes n'apparaissent pas spontanément dans les milieux fermentescibles, mais qu'ils proviennent du milieu environnant et se multiplient lorsqu'ils rencontrent des conditions favorables. Un milieu nutritif stérilisé par chauffage ne peut pas fermenter s'il est conservé à l'abri des germes: telle est la fameuse conclusion des expériences avec les ballons à "col de cygne". On parlait ainsi de fermentation alcoolique, de fermentation acétique ou de fermentation butyrique.

C'est l'origine de toute la technique microbiologique. Pasteur s'est ainsi affirmé comme chimiste-biologiste.

L'année suivante il installe son laboratoire dans les greniers de l'école Normale, rue d'Ulm et

commence son enquête sur la "génération spontanée".



Louis Pasteur dans son laboratoire de l'École Normale Supérieure (rue d'Ulm). Gravure d'Adrien Marie publié dans l'Univers Illustré le 12 Décembre 1885.
Copyright©Institut Pasteur

En 1859 le Prix de Physiologie Expérimentale de l'Académie des Sciences lui ait décerné pour ses travaux sur les fermentations.

Il étudie la formation du vinaigre et la transformation de l'alcool en acide acétique par un micro-organisme, le *Mycoderma aceti*, qui fixe l'oxygène de l'air sur l'alcool. Il montre aux vinaigriers comment obtenir un vinaigre d'une qualité constante

Le 5 novembre 1860 suite à une précédente communication relative aux générations dites spontanées il déclare devant l'Académie des Sciences dont il n'est pas encore membre: "Ce qu'il y aurait de plus désirable, serait de conduire assez loin ces études pour préparer la voie à une recherche sérieuse de l'origine des diverses maladies".

En 1861 le Prix Jecker Académie des Sciences pour les recherches sur les fermentations lui ait attribué, il publie dans le bulletin de la Société chimique de Paris l'ensemble des résultats sur la question du vinaigre.

A suivre...

CAS CLINQUE

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR

Microbiologie clinique

- 1- Un homme de 30 ans présente depuis hier une dysurie intense avec pollakiurie. A l'examen on observe une goutte de pus franc au méat urétral. L'examen est par ailleurs normal.

Quelle est la bactérie la plus probablement en cause ?

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma urealyticum*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Réponse :

- 2- Une femme de 25 ans présente une forte dysurie avec pollakiurie. Elle décrit 1 épisode semblable dans l'année écoulée. L'examen clinique est par ailleurs normal. Vous recueillez des urines à mi-jet : elles vous apparaissent troubles.

Quelle est la bactérie le plus souvent en cause dans cette pathologie ?

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Enterococcus spp.*
- *Escherichia coli*.
- *Chlamydia trachomatis*

Réponse :

- 3- Une femme de 40 ans, revenant d'un voyage en Afrique tropicale présente une diarrhée intermittente avec émission de glaires sanglantes. Elle se plaint de violentes crampes anales et rectales et de faux besoins. Sa température est de 39° C. La déshydratation est peu importante.

Quel est le genre bactérien le plus probablement en cause ?

- *Salmonella spp.*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Escherichia coli* Entero-hémorragique
- *Shigella*
- *S.aureus*

Réponse :

- 4- Vous travaillez dans un centre médical avec antenne chirurgicale en brousse au Sahel. On vous amène 5 patients âgés entre 15 et 30 ans présentant depuis quelques heures une diarrhée aqueuse intense. 3 sont normo thermiques, 2 sont hypothermiques. Tous sont déshydratés. 3

présentent des vomissements en jet. Ces sujets étaient en bonne santé jusqu'alors.

La culture bactérienne objective un: *Vibrio cholerae*.

Quelle analyse simple vous permettra, dans ce contexte, d'affirmer le diagnostic avec des sensibilités et spécificité de 90 % ?

- Test à l'oxydase
- Coloration de Gram
- Culture sur milieu GNAB
- Examen microscopique des selles entre lame et lamelle
- Aspect macroscopique des selles
- Identification par galerie API 20E

Réponse :

- 5- Il s'agit d'une patiente de 57 ans qui vient d'être admise en réanimation. Depuis 15 jours, cette patiente présentait une asthénie avec dyspnée, toux sèche, sueur, frissons et rachialgie pour lesquels elle consulte le 03/08/2005 le remplaçant de son médecin traitant. Devant la prédominance de la plainte rachidienne, il prescrit des anti-inflammatoires, et des antalgiques. Devant l'absence d'amélioration, notamment de l'asthénie et des douleurs dorsales, la patiente consulte le 08/08/2005 au Service d'Accueil des Urgences.

Au Service d'Accueil des Urgences, l'examen clinique retrouve un rachis cervical et dorsal douloureux d'une façon diffuse. La patiente présente de la fièvre à 40°C. L'auscultation pulmonaire retrouve des crépitations de l'ensemble du poumon gauche. Sur le plan para clinique, on retrouve une CRP à 628, une hyperleucocytose à 18 500 globules blancs, une natrémie à 130 mmol/L ainsi qu'une cytolysse et une cholestase.

Le médecin pose le diagnostic clinique(non étiologique) de Pneumopathie.

a- Quels sont les agents infectieux les plus Probablement en cause, par ordre de fréquence :

Réponse :

Des examens microbiologiques sont prescrits comme : Recherche d'antigènes urinaires de pneumocoque et *Legionella*, bactériologie des crachats, éventuellement sérologie *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma*.

Le laboratoire de microbiologie vous informe, le jour même, des premiers résultats pour cette patiente : ils sont positifs pour un des germes évoqué.

b-- De quel examen vous parle-t-on ?

Antigènes urinaires

Bactériologie des crachats

Sérologie de *chlamydia* et

Mycoplasma

Culture du pneumocoque

tabagique (30 paquets années),
quels tests de diagnostic bactériologique rapide
devez-vous pratiquer ?

- Bactériologie des crachats
- Recherche du MBT dans les crachats
- Sérologie d *Chlamydia* et *Mycoplasma*
- Recherche d'antigènes urinaire de *legionella* et de pneumocoque.

Réponse:.

6-. Dans le contexte d'une pneumonie motivant

l'hospitalisation chez un homme de 50 ans

Recherche des antigènes solubles dans le sang.

Recherche d'antigènes urinaire de *legionella* et de pneumocoque.

Réponse :

HISTOIRE DES MOTS CROISÉS ET FLÉCHÉS

Par Professeur KASSAH-LAOUAR Ahmed
Laboratoire Central de Biologie Médicale-CLCC-Batna

En inventant les cases noires, un violoniste américain d'origine anglaise, Arthur Wynne, a véritablement inventé les mots croisés ; il a proposé sa première grille en Angleterre, sans succès.

Le 21 décembre 1913, il l'a publiée dans un journal américain, le «New York World» (dans son supplément le «Fun»), mais sans les cases noires, qu'il a introduites plus tard. Le succès a suivi. D'abord via l'Angleterre (Morley Adams, 1924, dans le «Sunday Express» - il fonda la première agence de mots croisés), puis en France la même année (à la une du «Dimanche-Illustré», puis dans «le Gaulois» et «l'Excelsior»).

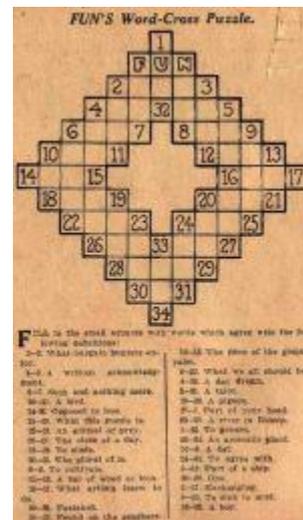
Tristan Bernard consolide la bonne fortune du jeu, en casant des petits dessins dans sa grille, des petits dessins faits de cases noires. Quand elles contenaient trop d'astuces, ses grilles étaient accompagnées d'explications. Jean Richepin et Renée David lui emboîtent le pas.

Le 2 novembre 1924, la première grille de **mots croisés** britannique est publiée dans le Sunday Express. Cette grille avait été en fait achetée à Arthur Wynne. En France, la première grille a été publiée le 9 novembre 1924 par l'hebdomadaire Dimanche-Illustré, sous le nom de « Mosaïque mystérieuse ».

L'Antiquité. Le plus célèbre d'entre eux est le carré magique "Sator", dont le plus vieil exemplaire a été retrouvé enfoui dans les ruines de Pompéi.



Les mots croisés de l'ère moderne apparaissent aux Etats-Unis en décembre 1913. Arthur Wynne, émigré anglais, travaille comme journaliste au New York World. Il a l'idée de créer une grille en losange, à laquelle il ajoute des cases noires pour séparer les mots. Par la suite, les grilles deviendront carrées ou rectangulaires mais garderont souvent une architecture symétrique.



LA MOSAÏQUE MYSTÉRIEUSE

Nous proposons aujourd'hui à nos lecteurs pour qui les distractions du dimanche ne sont agitées que par des lettres et non d'une lettre par une lettre, s'entretenir au milieu d'une Mosaïque mystérieuse dans un dictionnaire.

Les cases blanches de ce dessin doivent être complétées par des lettres à raison d'une lettre par case ; composent les mots dont nous donnerons plus loin le sens ou le système.

Chaque case blanche doit contenir une case portant un chiffre. Pour ceux dont nous donnons ci-dessous la définition dans la colonne :

HORIZONTALMENT, chaque dessin portant du nombre indiqué doit s'étendre horizontalement aussi loin qu'il ne rencontre pas une case noire ; s'il se rencontre pas de case noire, il va jusqu'à bord du dessin. De même pour les mots écrits dans la colonne :

VERTICALEMENT, chaque dessin portant un nombre doit s'étendre verticalement aussi loin qu'il ne rencontre pas de case noire ; s'il se rencontre pas de case noire, il va jusqu'à bord du dessin. De même pour les mots écrits dans la colonne :

VERTICALEMENT, chaque dessin portant un nombre doit s'étendre verticalement aussi loin qu'il ne rencontre pas de case noire ; s'il se rencontre pas de case noire, il va jusqu'à bord du dessin. De même pour les mots écrits dans la colonne :

1	2	3	4	5	6	7
8				9		
10		11			12	
	13			14		
15			16			
	17			18		
19		20			21	
22		23		24		
25						

Voici le sens ou le système des mots à trouver :

HORIZONTALMENT		VERTICALEMENT	
1	Champenois	1	Temps de verre
8	Favorable	2	Conscience humaine
9	Châlle	3	Note
11	Note	4	Personnage légendaire
11	Arme	5	Ferme de jeu
12	Proposition	6	Départ de liquidation
15	Éclair	7	Départ
18	Égal de quelque chose	13	Flétrie
19	Provençal	14	Peut-être
21	Appel	17	Vêtement
21	Note	19	Motivé
22	Arbre	2	La même
24	Particule d'attente	23	Négation
27	Vive la mort	24	Provençal

Cet amusant passe-temps est compris, sous le no. 1, parmi les distractions du dimanche, de ceux de récompense, qui composent une nouveauté de commencement dans ce numéro. Nos lecteurs trouveront à la dernière page les problèmes et les "Mosaïque mystérieuse".

Au commencement étaient les "mots carrés", sans cases noires, dont on trouve quelques exemples dès

Après la première Guerre Mondiale, ils arrivent au Royaume-Uni puis en France en 1924 sous le nom de "mosaïque mystérieuse" et rencontrent rapidement le succès, avec des définitions dans un premier temps très "terre-à-terre". Par la suite, le romancier Tristan Bernard deviendra un

verbicruciste reconnu et contribuera largement à l'essor des mots croisés en France, grâce à des définitions amusantes et pleines d'esprit. D'autres auteurs suivront, comme Renée David et Jean Richepin.

La définition, et donc le mot, primant sur l'aspect esthétique de la grille, les verbicrucistes français abandonneront bien vite l'orthodoxie symétrique des grilles anglo-saxonnes. D'autres règles bien françaises apparaîtront, comme le faible nombre de cases noires, augmentation la difficulté de la grille, ou l'absence de cases noires sur le pourtour de la grille (règle que s'était imposée le verbicruciste Robert Scipion).

En 1969, un certain Jacques Capelovici importe de Suède un nouveau concept de grilles de mots croisés dont les définitions se trouvent dans les cases. Ce sont les fameux "mots fléchés". Maître Capello, parallèlement à sa carrière à la télévision, rédigera les mots fléchés de Télé 7 Jours jusqu'en 2010, pendant plus de 40 ans.

Bibliographie :

Pour aller plus loin dans l'histoire des mots croisés, vous pouvez utilement consulter les sites suivants :

Article "Mots croisés" sur [l'encyclopédie Wikipedia](#)

- Un [article de Jacques Drillon](#) dans le *Nouvel Obs*, à l'occasion du centenaire des mots croisés
- Et surtout le dossier très complet de [Cruci.com](#)

LA MOSAÏQUE MYSTÉRIEUSE

Vous pouvez aussi lire le livre *Le verbe et le mot* de Robert Scipion, éd. Grasset, 1974.

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...

16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...
21. ...
22. ...
23. ...
24. ...
25. ...

26. ...
27. ...
28. ...
29. ...
30. ...

31. ...
32. ...
33. ...
34. ...
35. ...

36. ...
37. ...
38. ...
39. ...
40. ...

41. ...
42. ...
43. ...
44. ...
45. ...

46. ...
47. ...
48. ...
49. ...
50. ...

51. ...
52. ...
53. ...
54. ...
55. ...

56. ...
57. ...
58. ...
59. ...
60. ...

61. ...
62. ...
63. ...
64. ...
65. ...

66. ...
67. ...
68. ...
69. ...
70. ...

71. ...
72. ...
73. ...
74. ...
75. ...

76. ...
77. ...
78. ...
79. ...
80. ...

81. ...
82. ...
83. ...
84. ...
85. ...

86. ...
87. ...
88. ...
89. ...
90. ...

91. ...
92. ...
93. ...
94. ...
95. ...

96. ...
97. ...
98. ...
99. ...
100. ...

101. ...
102. ...
103. ...
104. ...
105. ...

106. ...
107. ...
108. ...
109. ...
110. ...

111. ...
112. ...
113. ...
114. ...
115. ...

116. ...
117. ...
118. ...
119. ...
120. ...

121. ...
122. ...
123. ...
124. ...
125. ...

126. ...
127. ...
128. ...
129. ...
130. ...

131. ...
132. ...
133. ...
134. ...
135. ...

136. ...
137. ...
138. ...
139. ...
140. ...

141. ...
142. ...
143. ...
144. ...
145. ...

146. ...
147. ...
148. ...
149. ...
150. ...

151. ...
152. ...
153. ...
154. ...
155. ...

156. ...
157. ...
158. ...
159. ...
160. ...

161. ...
162. ...
163. ...
164. ...
165. ...

166. ...
167. ...
168. ...
169. ...
170. ...

171. ...
172. ...
173. ...
174. ...
175. ...

176. ...
177. ...
178. ...
179. ...
180. ...

181. ...
182. ...
183. ...
184. ...
185. ...

186. ...
187. ...
188. ...
189. ...
190. ...

191. ...
192. ...
193. ...
194. ...
195. ...

196. ...
197. ...
198. ...
199. ...
200. ...

201. ...
202. ...
203. ...
204. ...
205. ...

206. ...
207. ...
208. ...
209. ...
210. ...

211. ...
212. ...
213. ...
214. ...
215. ...

216. ...
217. ...
218. ...
219. ...
220. ...

221. ...
222. ...
223. ...
224. ...
225. ...

226. ...
227. ...
228. ...
229. ...
230. ...

231. ...
232. ...
233. ...
234. ...
235. ...

236. ...
237. ...
238. ...
239. ...
240. ...

241. ...
242. ...
243. ...
244. ...
245. ...

246. ...
247. ...
248. ...
249. ...
250. ...

251. ...
252. ...
253. ...
254. ...
255. ...

256. ...
257. ...
258. ...
259. ...
260. ...

261. ...
262. ...
263. ...
264. ...
265. ...

266. ...
267. ...
268. ...
269. ...
270. ...

271. ...
272. ...
273. ...
274. ...
275. ...

276. ...
277. ...
278. ...
279. ...
280. ...

281. ...
282. ...
283. ...
284. ...
285. ...

286. ...
287. ...
288. ...
289. ...
290. ...

291. ...
292. ...
293. ...
294. ...
295. ...

296. ...
297. ...
298. ...
299. ...
300. ...

301. ...
302. ...
303. ...
304. ...
305. ...

306. ...
307. ...
308. ...
309. ...
310. ...

311. ...
312. ...
313. ...
314. ...
315. ...

316. ...
317. ...
318. ...
319. ...
320. ...

321. ...
322. ...
323. ...
324. ...
325. ...

326. ...
327. ...
328. ...
329. ...
330. ...

331. ...
332. ...
333. ...
334. ...
335. ...

336. ...
337. ...
338. ...
339. ...
340. ...

341. ...
342. ...
343. ...
344. ...
345. ...

346. ...
347. ...
348. ...
349. ...
350. ...

351. ...
352. ...
353. ...
354. ...
355. ...

356. ...
357. ...
358. ...
359. ...
360. ...

361. ...
362. ...
363. ...
364. ...
365. ...

366. ...
367. ...
368. ...
369. ...
370. ...

371. ...
372. ...
373. ...
374. ...
375. ...

376. ...
377. ...
378. ...
379. ...
380. ...

381. ...
382. ...
383. ...
384. ...
385. ...

386. ...
387. ...
388. ...
389. ...
390. ...

391. ...
392. ...
393. ...
394. ...
395. ...

396. ...
397. ...
398. ...
399. ...
400. ...

401. ...
402. ...
403. ...
404. ...
405. ...

406. ...
407. ...
408. ...
409. ...
410. ...

411. ...
412. ...
413. ...
414. ...
415. ...

416. ...
417. ...
418. ...
419. ...
420. ...

421. ...
422. ...
423. ...
424. ...
425. ...

426. ...
427. ...
428. ...
429. ...
430. ...

431. ...
432. ...
433. ...
434. ...
435. ...

436. ...
437. ...
438. ...
439. ...
440. ...

441. ...
442. ...
443. ...
444. ...
445. ...

446. ...
447. ...
448. ...
449. ...
450. ...

451. ...
452. ...
453. ...
454. ...
455. ...

456. ...
457. ...
458. ...
459. ...
460. ...

461. ...
462. ...
463. ...
464. ...
465. ...

466. ...
467. ...
468. ...
469. ...
470. ...

471. ...
472. ...
473. ...
474. ...
475. ...

476. ...
477. ...
478. ...
479. ...
480. ...

481. ...
482. ...
483. ...
484. ...
485. ...

486. ...
487. ...
488. ...
489. ...
490. ...

491. ...
492. ...
493. ...
494. ...
495. ...

496. ...
497. ...
498. ...
499. ...
500. ...

501. ...
502. ...
503. ...
504. ...
505. ...

506. ...
507. ...
508. ...
509. ...
510. ...

511. ...
512. ...
513. ...
514. ...
515. ...

516. ...
517. ...
518. ...
519. ...
520. ...

521. ...
522. ...
523. ...
524. ...
525. ...

526. ...
527. ...
528. ...
529. ...
530. ...

531. ...
532. ...
533. ...
534. ...
535. ...

536. ...
537. ...
538. ...
539. ...
540. ...

541. ...
542. ...
543. ...
544. ...
545. ...

546. ...
547. ...
548. ...
549. ...
550. ...

551. ...
552. ...
553. ...
554. ...
555. ...

556. ...
557. ...
558. ...
559. ...
560. ...

561. ...
562. ...
563. ...
564. ...
565. ...

566. ...
567. ...
568. ...
569. ...
570. ...

571. ...
572. ...
573. ...
574. ...
575. ...

576. ...
577. ...
578. ...
579. ...
580. ...

581. ...
582. ...
583. ...
584. ...
585. ...

586. ...
587. ...
588. ...
589. ...
590. ...

591. ...
592. ...
593. ...
594. ...
595. ...

596. ...
597. ...
598. ...
599. ...
600. ...

601. ...
602. ...
603. ...
604. ...
605. ...

606. ...
607. ...
608. ...
609. ...
610. ...

611. ...
612. ...
613. ...
614. ...
615. ...

616. ...
617. ...
618. ...
619. ...
620. ...

621. ...
622. ...
623. ...
624. ...
625. ...

626. ...
627. ...
628. ...
629. ...
630. ...

631. ...
632. ...
633. ...
634. ...
635. ...

636. ...
637. ...
638. ...
639. ...
640. ...

641. ...
642. ...
643. ...
644. ...
645. ...

646. ...
647. ...
648. ...
649. ...
650. ...

651. ...
652. ...
653. ...
654. ...
655. ...

656. ...
657. ...
658. ...
659. ...
660. ...

661. ...
662. ...
663. ...
664. ...
665. ...

666. ...
667. ...
668. ...
669. ...
670. ...

671. ...
672. ...
673. ...
674. ...
675. ...

676. ...
677. ...
678. ...
679. ...
680. ...

681. ...
682. ...
683. ...
684. ...
685. ...

686. ...
687. ...
688. ...
689. ...
690. ...

691. ...
692. ...
693. ...
694. ...
695. ...

696. ...
697. ...
698. ...
699. ...
700. ...

701. ...
702. ...
703. ...
704. ...
705. ...

706. ...
707. ...
708. ...
709. ...
710. ...

711. ...
712. ...
713. ...
714. ...
715. ...

716. ...
717. ...
718. ...
719. ...
720. ...

721. ...
722. ...
723. ...
724. ...
725. ...

726. ...
727. ...
728. ...
729. ...
730. ...

731. ...
732. ...
733. ...
734. ...
735. ...

736. ...
737. ...
738. ...
739. ...
740. ...

741. ...
742. ...
743. ...
744. ...
745. ...

746. ...
747. ...
748. ...
749. ...
750. ...

751. ...
752. ...
753. ...
754. ...
755. ...

756. ...
757. ...
758. ...
759. ...
760. ...

761. ...
762. ...
763. ...
764. ...
765. ...

766. ...
767. ...
768. ...
769. ...
770. ...

771. ...
772. ...
773. ...
774. ...
775. ...

776. ...
777. ...
778. ...
779. ...
780. ...

781. ...
782. ...
783. ...
784. ...
785. ...

786. ...
787. ...
788. ...
789. ...
790. ...

791. ...
792. ...
793. ...
794. ...
795. ...

796. ...
797. ...
798. ...
799. ...
800. ...

801. ...
802. ...
803. ...
804. ...
805. ...

806. ...
807. ...
808. ...
809. ...
810. ...

811. ...
812. ...
813. ...
814. ...
815. ...

816. ...
817. ...
818. ...
819. ...
820. ...

821. ...
822. ...
823. ...
824. ...
825. ...

826. ...
827. ...
828. ...
829. ...
830. ...

831. ...
832. ...
833. ...
834. ...
835. ...

836. ...
837. ...
838. ...
839. ...
840. ...

841. ...
842. ...
843. ...
844. ...
845. ...

846. ...
847. ...
848. ...
849. ...
850. ...

851. ...
852. ...
853. ...
854. ...
855. ...

856. ...
857. ...
858. ...
859. ...
860. ...

861. ...
862. ...
863. ...
864. ...
865. ...

866. ...
867. ...
868. ...
869. ...
870. ...

871. ...
872. ...
873. ...
874. ...
875. ...

876. ...
877. ...
878. ...
879. ...
880. ...

881. ...
882. ...
883. ...
884. ...
885. ...

886. ...
887. ...
888. ...
889. ...
890. ...

891. ...
892. ...
893. ...
894. ...
895. ...

896. ...
897. ...
898. ...
899. ...
900. ...

901. ...
902. ...
903. ...
904. ...
905. ...

906. ...
907. ...
908. ...
909. ...
910. ...

911. ...
912. ...
913. ...
914. ...
915. ...

916. ...
917. ...
918. ...
919. ...
920. ...

921. ...
922. ...
923. ...
924. ...
925. ...

926. ...
927. ...
928. ...
929. ...
930. ...

931. ...
932. ...
933. ...
934. ...
935. ...

936. ...
937. ...
938. ...
939. ...
940. ...

941. ...
942. ...
943. ...
944. ...
945. ...

946. ...
947. ...
948. ...
949. ...
950. ...

951. ...
952. ...
953. ...
954. ...
955. ...

956. ...
957. ...
958. ...
959. ...
960. ...

961. ...
962. ...
963. ...
964. ...
965. ...

966. ...
967. ...
968. ...
969. ...
970. ...

971. ...
972. ...
973. ...
974. ...
975. ...

976. ...
977. ...
978. ...
979. ...
980. ...

981. ...
982. ...
983. ...
984. ...
985. ...

986. ...
987. ...
988. ...
989. ...
990. ...

991. ...
992. ...
993. ...
994. ...
995. ...

996. ...
997. ...
998. ...
999. ...
1000. ...

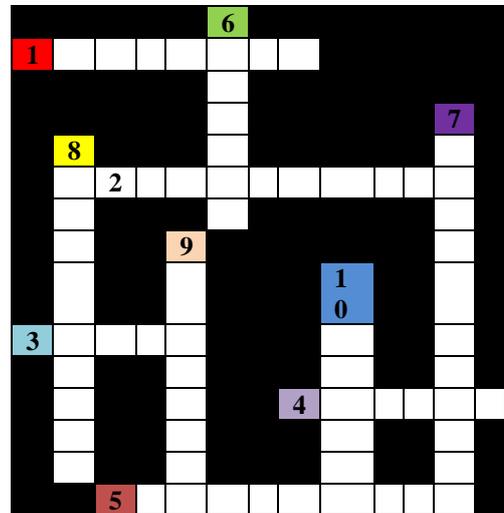
Mots croisés

Grille N°1

1. Se dit d'une tumeur, d'une maladie qui peut causer la mort.
2. Synonyme de grippe.
3. État caractérisé par une perte de conscience, de sensibilité et de mobilité, avec conservation plus ou moins complète des fonctions végétatives (respiration, circulation).
4. Inflammation de l'oreille.
5. Maladie contagieuse, d'origine virale, généralement bénigne, se manifestant par l'éruption de boutons. 90 % des cas surviennent chez les enfants de moins de 10 ans.
6. Opération chirurgicale qui consiste à transférer sur un individu une partie du corps (tissu, organe) prélevée sur lui-même ou sur un autre individu.
7. Inflammation du pancréas.
8. Inflammation des voies aériennes entre la trachée et les poumons, qui se manifeste

par une toux accompagnée d'expectorations.

9. Paludisme.
10. Anomalie de l'œil qui se traduit par une vision floue des objets éloignés



Par professeur A.KASSAH-LAOUAR

Quiz : Biologie Moléculaire**1****Combien la molécule d'ADN comporte-t-elle de brins ?**

- Un seul brin
- Deux brins
- Trois brins

2**Dans quelle partie de la cellule la molécule d'ADN est-elle située ?**

- Le noyau
- Le cytoplasme
- La membrane plasmique

3**Quelle étape est marquée par la transformation de l'ADN en ARN pré-messager ?**

- La traduction
- La transcription
- La maturation

4**Quel brin de l'ADN est conservé au cours de cette étape ?**

- Le brin transcrit
- Le brin non transcrit
- Un autre brin

5**Comment se forme ensuite l'ARN pré-messager ?**

- Il se forme de façon complémentaire par rapport au brin transcrit de l'ADN.
- Il se forme de façon complémentaire par rapport au brin non transcrit de l'ADN.
- Il se forme de façon identique par rapport au brin transcrit de l'ADN.

6**Quelle base ne peut-on pas trouver dans un ARN pré-messager ?**

- La thymine
- L'uracile
- La guanine

7**Laquelle de ces étapes est marquée par le passage de l'ARN pré-messager à l'ARN messager ?**

- La maturation
- La traduction
- La transcription

8**Au cours de cette étape, que deviennent les introns ?****Ils sont conservés.
Ils sont éliminés.**

Leur proportion est doublée.

9**Quelle étape est marquée par le passage de l'ARN messager à la protéine ?**

- La transcription
- La maturation
- La traduction

10**Combien de nucléotides comporte un codon ?**

- Deux nucléotides
- Trois nucléotides
- Quatre nucléotides

11**Lequel de ces codons ne peut pas exister ?**

- Le codon A-U-G
- Le codon A-T-G
- Le codon U-U-U

12**Comment se nomme le codon permettant de mettre fin à la synthèse de protéines ?**

- Le codon stop
- Le codon arrêt
- Le codon fin

Citations et proverbes du numéro

*Par A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-Batna*

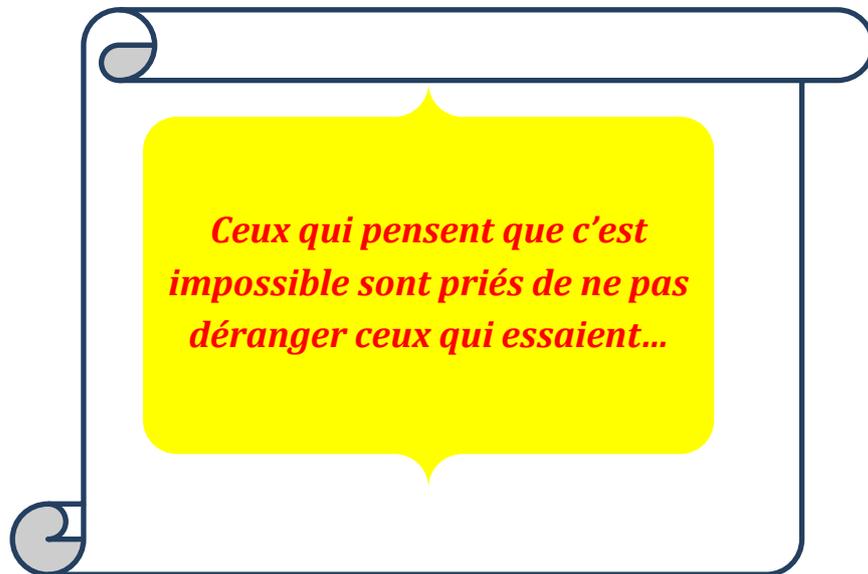
La santé est la chose essentielle après la moralité.

Thomas Jefferson (Lettre à Pierre Carr, le 10 août 1787)

Le bonheur ne s'acquiert pas, il ne réside pas dans les apparences, chacun d'entre nous le construit à chaque instant de sa vie avec son cœur.

Proverbe Africain

Après avoir terminé ce numéro, on dit :



Avis

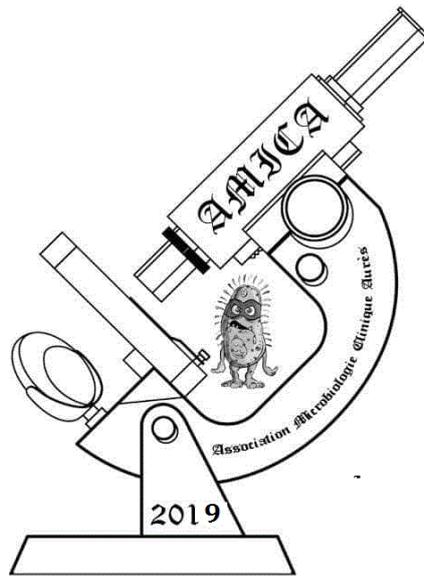
Bonjour chers amis et collègues.

Le président de l'association ainsi que tous les membres fondateurs ont le plaisir de vous annoncer la naissance de votre association scientifique, Association de Microbiologie Clinique des Aurès (AMICA).

A cet effet nous invitons tous nos amis biologistes de nous prêter contribution et main forte quant à la réussite dans sa mission.

AMICA héberge tous les biologistes de la région sans distinction.

Adhérer à votre association AMICA





République Algérienne Démocratique
et Populaire
Centre de Lutte Contre le Cancer ex:CAC
Laboratoire Central de Biologie Médicale



Les 3èmes Rencontres Aurassiennes
De Microbiologie Clinique
JAMIC III

Infections liées aux soins et cancers

11&12 Mars 2020

Comité d'organisation :

Président du comité d'organisation :

Professeur A. Kassah-Laouar

Secrétaire général :

Dr M.Khebri



Date limite de soumission des abstracts: 25 février 2020

✉ khebrim@yahoo.fr / prkassah@yahoo.fr

☎ 0553531255

Corrigé cas clinique microbiologie clinique page 63 :**Cas clinique 1 :****Réponse:***Neisseria gonorrhoeae***Cas clinique 2:****Réponse:***Escherichia coli.***Cas clinique 3 :****Réponse:***Shigella.***Cas clinique 4 :****Réponse :**

Examen microscopique des selles entre lame et lamelle.

Cas clinique 5 :**Réponse :**a- - Pneumocoque, *Légionella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*.

b- Antigènes urinaires

Cas clinique 6 :**Réponse :**- Recherche d'antigènes urinaires de *legionella* et de pneumocoque.

Réponse du Quiz Biologie Moléculaire

✓ Bonne réponse

Combien la molécule d'ADN comporte-t-elle de brins ?

Un seul brin

Deux brins

Trois brins

« Elle est composée d'un brin non transcrit et d'un brin transcrit. »

2✓ Bonne réponse

Dans quelle partie de la cellule la molécule d'ADN est-elle située ?

Le noyau

Le cytoplasme

La membrane plasmique

« Elle est donc située au cœur de la cellule. »

3✓ Bonne réponse

Quelle étape est marquée par la transformation de l'ADN en ARN pré-messager ?

La traduction

La transcription

La maturation

« Cette étape nécessite l'apport d'une enzyme : l'ARN polymérase. »

4✓ Bonne réponse

Quel brin de l'ADN est conservé au cours de cette étape ?

Le brin transcrit

Le brin non transcrit

Un autre brin

« L'ADN est composé uniquement de deux brins. »

5✓ Bonne réponse

Comment se forme ensuite l'ARN pré-messager ?

Il se forme de façon complémentaire par rapport au brin transcrit de l'ADN.

Il se forme de façon complémentaire par rapport au brin non transcrit de l'ADN.

Il se forme de façon identique par rapport au brin transcrit de l'ADN.

« Pour mémoire, la cytosine est complémentaire avec la guanine et la thymine est complémentaire avec l'adénine. »

6 ✓ Bonne réponse

Quelle base ne peut-on pas trouver dans un ARN pré-messager ?

La thymine

L'uracile

La guanine

« Petite exception au cours de la transcription : la thymine s'oxyde en uracile.

Il est donc impossible de la trouver dans un ARN pré-messager. »

7✓ Bonne réponse

Laquelle de ces étapes est marquée par le passage de l'ARN pré-messager à l'ARN messager ?

La maturation

La traduction

La transcription

« Cette étape se caractérise par la fragmentation de l'ARN pré-messager en différents tronçons : les introns et les exons. »

8 ✓ Bonne réponse

Au cours de cette étape, que deviennent les introns ?

Ils sont conservés.

Ils sont éliminés.

Leur proportion est doublée.

« Seuls les exons sont conservés, les introns sont donc éliminés. »

9✓ Bonne réponse

Quelle étape est marquée par le passage de l'ARN messager à la protéine ?

La transcription

La maturation

La traduction

« Cette étape se passe dans le cytoplasme de la cellule. »

10✓ Bonne réponse

Combien de nucléotides comporte un codon ?

Deux nucléotides

Trois nucléotides

Quatre nucléotides

« Chaque codon est ensuite synthétisé en protéine grâce au code génétique. »

11✓ Bonne réponse

Lequel de ces codons ne peut pas exister ?

Le codon A-U-G

Le codon A-T-G

Le codon U-U-U

« Ce codon comporte une thymine. Or, ce nucléotide s'est transformé en uracile. Bien que peu fréquent, le codon U-U-U existe, c'est un assemblage de trois uraciles. »

12✓ Bonne réponse

Comment se nomme le codon permettant de mettre fin à la synthèse de protéines ?

Le codon stop

Le codon arrêt

Le codon fin

« Ce codon permet de réguler la production de protéines. »

RAIL



2019