

2020

NUMERO : 01

Revue Aurassienne du Laboratoire RAL



Louis Pasteur
1822-1895



Volume I. Numéro 01. 2020

Revue du Laboratoire Central
de Biologie Médicale-CLCC-Batna

Trimestrielle

01/03/2020

- ✚ Mystérieux virus chinois: l'agent de la pneumonie de Wuhan Coronavirus "2019-nCov"
- ✚ Diagnostic au laboratoire des méningites purulentes communautaires
- ✚ Un cas rare de bactériémie à *Sphingomonas paucimobilis* chez un patient immunodéprimé
- ✚ La phagothérapie : la renaissance d'un vieux traitement face à l'antibiorésistance?
- ✚ Mononucléose infectieuse à *Epstein-Barr virus* (EBV)
- ✚ Louis Pasteur (2^{ème} partie)
- ✚ Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. de la région de Batna Algérie
- ✚ Suivi thérapeutique pharmacologique du Méthotrexate au décours de son administration à haute-dose : les principes

REDACTION

Rédactrice en chef
Docteur M.K KHEBRI
Rédactrice en chef adjointe
Docteur N.ACHACHI

COMITE DE REDACTION

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

<i>Editorial</i>	1
<i>Mystérieux virus chinois : l'agent de la pneumonie de Wuhan</i>	2
Coronavirus disease 2019 (COVID-19) ex Coronavirus "2019-nCov" SARS-CoV-2	
Cas rare de bactériémie à <i>Sphingomonas paucimobilis</i> chez un patient immunodéprimé	19
Diagnostic au laboratoire des méningites purulentes communautaires	23
La phagothérapie : la renaissance d'un vieux traitement face à l'antibiorésistance ?	34
Mononucléose infectieuse à <i>Epstein-Barr virus</i> (EBV)	39
Technique de diagnostic rapide des bactéries productrices de carbapénèmes : le Carba NP test	43
Transplantation de la matière fécale : un vrai traitement !	47
Syndrome Hémorragique : comment procéder dans un laboratoire d'hémiobiologie ? Partie 2 « Coagulation »	51
Erreurs de détermination de la NFS par les automates d'hématologie cellulaire. (Revue de littérature). Partie2 : Erreurs de numération des globules rouges et les constantes hématimétriques	56
Suivi thérapeutique pharmacologique du Méthotrexate au décours de son administration à haute-dose : les principes	58
Contrôle qualité d'un antibiotique appartenant à la classe des Bêta-lactamines	63
AMiCA	67
Les Troisièmes Rencontres Aurassiennes de Microbiologie Clinique (JAMIC III)	68
Louis Pasteur (Partie2)	69
Citation et proverbe du numéro	72
Beau poème de Félix Leclerc sur la vieillesse	73
Mots croisés	74
Cas cliniques	75
Solution mots croisés	77
Corrigé cas cliniques	78
Instructions aux auteurs	80

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



Editorial : la pérennité d'une revue

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

La crainte de toute revue est la disparition, c'est pour cela la pérennité doit être de règle. après avoir réussi le numéro 00 avec succès, et particulièrement après avoir reçu l'**ISSN** de la revue par le CERIST, qui veut bien dire, l'**International Standard Serial Number** ou **Numéro international normalisé des publications en série** qui est un numéro international qui permet d'identifier de manière unique une publication en série. Nous voilà de nouveau au cœur de notre revue scientifique RAL ou j'invite toute la communauté scientifique à se rapprocher de nous. La RAL c'est votre journal trimestriel qui rapporte généralement des mises au point, des revues de la littérature ou des observations vécus sous forme de cas cliniques et dans un but pédagogique, scientifique et une traçabilité.

Notre revue vivra par vos écrits.

N'hésitez pas à contacter.



Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC Batna

Mystérieux virus chinois: l'agent de la pneumonie de Wuhan **Coronavirus disease 2019 (COVID-19) ex Coronavirus "2019-nCoV"** **SARS-CoV-2**

Microbiologie clinique
Mise au point

Résumé : Les coronavirus forment une vaste famille de virus qui peuvent être pathogènes chez l'homme et chez l'animal. On sait que, chez l'être humain, plusieurs coronavirus peuvent entraîner des infections respiratoires dont les manifestations vont du simple rhume à des maladies plus graves comme le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) et le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Le dernier coronavirus qui a été découvert est responsable de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19). La COVID-19 est la maladie infectieuse causée par le dernier coronavirus qui a été découvert. Ce nouveau virus et cette maladie étaient inconnus avant l'apparition de la flambée à Wuhan (Chine) en décembre 2019.

Mots clés : Coronavirus-COVID-19-Wuhan –Chine.

INTRODUCTION

Les coronavirus (CoV) forment une grande famille de virus à ARN parmi lesquels on retrouve des virus infectant les animaux et l'homme. Les premiers CoV humains (HCoV-229E et HCoV-OC43) ont été décrits dans les années 1960 chez des patients présentant un tableau de pneumopathie virale classique, ce qui limita l'intérêt que leur porta la communauté scientifique. Cependant, l'implication d'un nouveau CoV (syndrome respiratoire aigu sévère [SRAS]-CoV) dans une épidémie mondiale de syndrome de détresse respiratoire aigu sévère avec des capacités élevées de propagation au sein de la population a entraîné un vif regain d'intérêt pour ces virus en 2003. Au cours des années suivantes, deux autres CoV ont été identifiés : HCoV-NL63 en 2004 et HCoV-HKU1 en 2005. Les CoV humains (hors SRAS-CoV) sont ubiquitaires et circulent de façon épidémique avec une recrudescence hivernale..L'émergence du SRAS-CoV a permis de mettre en évidence les capacités de ces virus à franchir les barrières d'espèces et à s'adapter à leur nouvel environnement. Pour cela, ils disposent d'une grande plasticité de leur génome grâce à des mutations ponctuelles générées lors de la réplication, des délétions ou des recombinaisons. Le diagnostic de ces infections repose essentiellement sur la biologie moléculaire : le développement de la technologie multiplex permet d'intégrer ces virus dans le panel de détection de différents tests aux côtés des autres virus respiratoires. L'épidémie de SRAS-CoV a pu être rapidement maîtrisée par la mise en place de mesures sanitaires strictes et étendues au niveau mondial, qui restent à ce jour le meilleur moyen de prévention vis-à-vis de ces virus devant l'absence de vaccin et de traitement efficace [1]

Histoire : le constat

Le 31 décembre 2019, 27 cas de pneumonie d'étiologie inconnue, dont 7 cas graves, ont été rapportés par les autorités sanitaires chinoises ; tous ces cas ayant comme lien commun le marché de Wuhan en Chine du Sud (un marché de poissons et d'animaux vivants vendant différentes espèces animales). Les cas ont montré des symptômes respiratoires tels que fièvre, dyspnée et il a été rapporté des aspects radiologiques compatibles avec des lésions d'infiltration pulmonaire bilatérales.

Les autorités sanitaires ont fermé le marché dès le 1er janvier 2020 et instauré l'isolement des cas suspects et les mesures d'hygiène adéquates. Suspectant un agent viral responsable de ces pneumonies, les analyses pour identifier l'agent pathogène ont rapidement démarré. Aucune transmission interhumaine n'a été observée à ce jour et il n'a pas été décrit de cas chez les personnels de santé. Sans attendre l'identification de l'agent pathogène, les régions voisines et les pays voisins (Hong Kong, Taïwan, la Thaïlande, la Malaisie, le Vietnam, les Philippines et Singapour) ont mis en œuvre des contrôles thermiques pour tous les voyageurs arrivant de la zone concernée dans les différents aéroports et gares.

Le 5 janvier 2020, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié un article sur cette flambée épidémique résumant les informations disponibles au 3 janvier 2020 (<https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/>).

Le 6 janvier 2020, le Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aux États-Unis ont publié des informations concernant ces cas et émis des recommandations pour les voyageurs et les cliniciens notamment concernant les patients admis pour des soins hospitaliers et les précautions de contact et d'isolement associées aux précautions standards

(<https://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/watch/pneumonia-china> et https://emergency.cdc.gov/han/HAN00424.asp?deliveryName=USCDC_511-DM16877)

Les premières analyses effectuées par les chercheurs du CDC chinois montrent qu'il s'agirait d'un nouveau coronavirus appartenant au genre *Betacoronavirus*, genre où l'on trouve également le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV, *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*) et le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV, *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*). L'aspect des particules virales en microscopie électronique est typique d'un coronavirus et la séquence génomique complète a été obtenue. A suivre ...

Une nouvelle forme de syndrome respiratoire, analogue au SRAS, est apparue à [Wuhan \(province du Hubei, Chine\)](#) début décembre 2019. La pneumonie de Wuhan est due à un [nouveau coronavirus](#), dont six génomes ont été communiqués à la communauté scientifique internationale^[10]. En janvier 2020, le virus a été nommé 2019-nCoV.

Chronologie de l'épidémie du COVID-19?

- Le 31 décembre 2019, le bureau régional de l'OMS Chine a identifié dans la ville de Wuhan une cause inconnue de pneumonie. Au 3 janvier 2020, 44 personnes ont été identifiées avec cette même pathologie.
- Le 11-12 janvier, l'OMS a appris que le point commun de cette épidémie est l'exposition aux produits de la mer sur un marché à Wuhan
- Ce 12 janvier, la Chine a séquencé le génome de ce virus. La Chine a installé des contrôles de température à l'aéroport et dans les stations de train.
- Le lendemain, la Thaïlande a identifié le 1^{er} cas hors Chine.
- Le 15 janvier, le Japon a également identifié un malade atteint de ce nouveau coronavirus et le 20 janvier 2020 en Corée du Sud.
- Au 20 janvier, 282 cas confirmés ont été recensés. Sur les 278 cas chinois, 12 sont dans des conditions critiques et 6 sont décédés.
- Le 21 janvier, la Corée du Sud est passée de l'Alerte nationale Bleu (niveau 1) à Jaune (2/4)
- Au 23 janvier, 25% des malades chinois sont classifiés comme critique dont 4% sont décédés.
- 2 cas ont été exportés aux États-Unis ([US CDC](#)). Actuellement l'origine suspectée n'est plus le marché de Wuhan puisque moins de 15% des nouveaux cas ont visité

ce marché. L'Australie annonce son 1^{er} cas également.

- 5 cas viennent d'être confirmés en France :

<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>

Quelle est son origine?

D'où vient le nouveau coronavirus responsable de l'épidémie, partie de la ville chinoise de Wuhan et qui se propage à grande vitesse? Baptisé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) « **2019-nCoV** » puis « **Coronavirus disease 2019 (COVID-19)** », ce virus d'origine animale, jusqu'alors inconnu, a muté comme le font tous les virus et a acquis la capacité d'être transmissible entre humains.

L'histoire a commencé à la fin du mois de Décembre 2019 en Chine, sur un marché aux animaux à Wuhan. Il y avait tout un tas de bestioles, y compris des serpents et des chauves-souris. Ce type de marché aux animaux a déjà été criminalisé en 2003 dans l'épidémie de SRAS qui avait commencé dans la région du Guangdong et le premier cas avait été contaminé sur un marché alimentaire en contact avec un animal vendu pour la consommation. Les virus sont généralement caractérisés par un tropisme hôte. Ils peuvent circuler d'une espèce appelée réservoir à une autre, de sorte que le virus de la rage est transmis des chauves-souris aux humains via les canines. Pour l'épidémie de SRAS, le coronavirus de chauve-souris a été transmis à l'homme par la civette. Donc, pour résumer, vous avez des coronavirus hébergés par certains hôtes d'une espèce qui deviendront les espèces réservoirs, qui transmettent le virus à l'intérieur et, accidentellement, les coronavirus quittent leur réservoir pour contaminer une nouvelle espèce.

Les *alpha betacoronavirus* semblent avoir comme origine les chauve-souris, sauf certains *betacoronavirus* qui pourraient avoir émergé à partir de rongeurs [2] tandis que les *delta-* et *gammacoronavirus* auraient pour origine les oiseaux [3].

L'étude des nombreuses séquences génomiques à présent disponibles du 2019-nCoV permet de retracer avec une probabilité de plus en plus grande sa généalogie qui le rapproche de son cousin responsable du SRAS (SRAS-CoV) et le fait descendre d'un ancêtre commun, un coronavirus de chauve-souris. Parallèlement, l'étude de sa structure tridimensionnelle permet d'évaluer sa capacité à se fixer sur des cellules humaines pour les infecter.

Les séquences génétiques des coronavirus des malades sont très proches. La séquence génétique de ce nouveau coronavirus est très proche phylogénétiquement des **séquences virales de coronavirus de chauves-souris**: bat-SL-CoVZXC21, bat-SL-CoVZC4 et bat-SL-CoVZC45. La séquence identifiée mesure 29,8 kilobases avec

une teneur en GC de 38% (coefficient de Chargaff très utilisé en taxonomie).

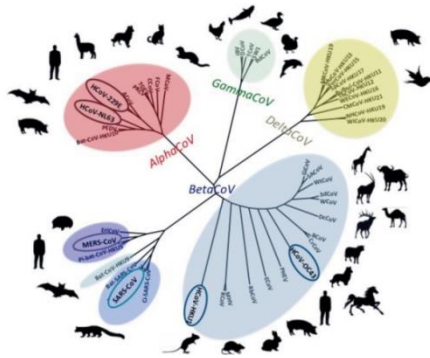


Figure 2: Origine des coronavirus

Comment il s'est adapté à son hôte

Il faut savoir que le virus est adapté à son hôte et reconnaît des récepteurs très spécifiques qui lui permettent d'infecter les cellules de son hôte. Prenez un virus de chauve-souris et mettez-le en contact avec une cellule humaine, il y a très peu de risque d'infection. Mais il peut arriver que le virus mute génétiquement et que ses protéines de surface commencent à reconnaître les protéines de surface des cellules humaines. Ces modifications génétiques aléatoires, associées aux contacts entre espèces peuvent favoriser l'apparition de nouvelles variantes virales de tropisme différent et permettre ainsi le franchissement d'une barrière d'une espèce à l'autre.

En 2003, des virus proches du SARS-CoV ont été identifiés chez les chauves-souris, cependant ils n'étaient pas capables d'utiliser l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) humaine comme récepteur. Les SARS-related coronavirus ont été identifiés chez au moins 11 espèces de chauves-souris en Asie, en Afrique et en Europe [4-5-6]. Il a été suggéré que la civette palmée (*Paguma larvata*) puisse être un hôte intermédiaire dans lequel le virus se soit adapté pour finalement infecter les humains.

Pour le 2019-nCoV, il est probablement hébergé à l'état sauvage chez les chauves-souris. Le génome a subi une mutation aléatoire et certaines de ses mutations ont infecté l'homme. Mais il devait aussi être en contact avec les humains. Il peut y avoir eu un ou plusieurs animaux intermédiaires, comme dans le cas de l'épidémie de SRAS. En règle générale, le virus n'est pas adapté à son nouvel hôte, il peut l'infecter et le rendre malade, mais cela reste sporadique et il n'y a pas de transmission interhumaine. Pour ce faire, des modifications génétiques supplémentaires ont été nécessaires. Les premiers cas sur le marché chinois étaient probablement liés à une exposition à des animaux contaminés par le coronavirus de chauve-souris. Le

virus n'était pas adapté aux humains mais suffisamment efficace pour que les gens tombent malades. Et puis, pendant trois semaines, il y a eu des cas secondaires, avec une infection inter-humaine de parents de personnes infectées et c'est beaucoup plus inquiétant en termes d'épidémiologie.

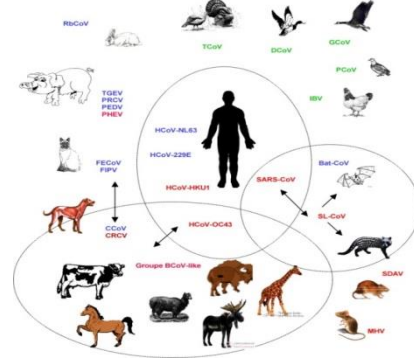


Figure 1: Origine et relation des coronavirus avec l'homme

Virologie

Les **coronavirus** (du latin *corona* et *virus*, littéralement « virus à couronne »), ou **CoV**, sont des virus à ARN monocaténaire de **polarité positif** (groupe IV de la classification de Baltimore) correspondant à la sous-famille **Orthocoronavirinae** de la taxonomie de l'ICTV.[7]

Nomenclature

L'ordre des *Niruvirales* inclus 3 familles virales : les *Coronaviridae* (*Coronavirus*), les *Arteriviridae* et, probablement bientôt, les *Ronoviridae*, une variété de virus ayant une forme de baguette (rod en anglais) infectant les invertébrés tel que les crevettes.[7]

Les *Coronaviridae* comprennent les genres *Coronavirus* et *Torovirus*.

Type	Virus
Domaine	Riboviria
Ordre	Nidovirales
Sous-ordre	Cordinivirineae
Famille	Coronaviridae
Sous-famille	Orthocoronavirinae
Genre	Alphacoronavirus Betacoronavirus Gammacoronavirus Deltacoronavirus

Les coronavirus alpha et bêta touchent l'Homme et les autres principalement les oiseaux. Chez l'homme, 4 coronavirus (229E, NL63, OC43 et HKU1) seraient responsables de 10 à 30 % des rhumes (CDC)

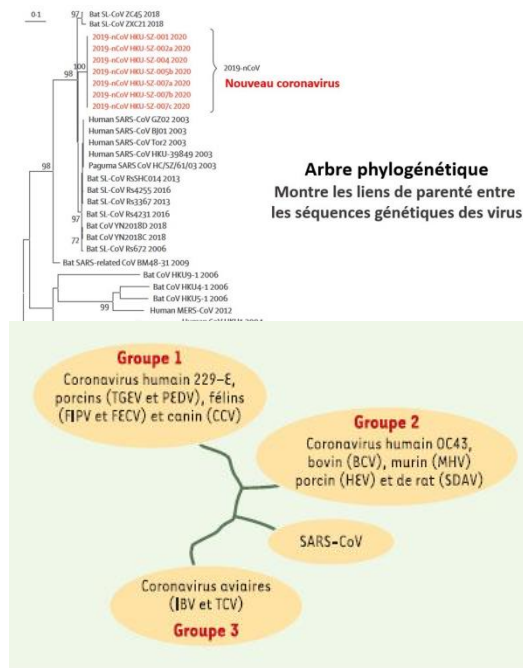


Figure 2 : Arbre phylogénétique simplifié des différents coronavirus connus. Les coronavirus sont subdivisés en trois groupes sur la base des propriétés antigéniques et des homologies de séquences. Le SARS-CoV n'appartient à aucun des groupes déjà identifiés (d'après [2, 3, 5]). TGEV, transmissible gastroenteritis virus ; PEDV, porcine epidemic diarrhea virus ; FIPV, feline infectious peritonitis virus ; FECV, feline enteric coronavirus ; CCV, canine coronavirus ; BCV, bovine coronavirus, MHV, murine hepatitis virus ; HEV, hemagglutinating encephalomyelitis virus ; SDAV, sialodacryoadenitis virus ; SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome coronavirus ; IBV, infectious bronchitis virus ; TCV, turkey coronavirus [8-9-10-11]

.Espèces du genre **Coronavirus** :

- Groupe 1 ou alpha :
 - coronavirus canin (en) – *Canine coronavirus (CCV)*
 - coronavirus félin — *Feline coronavirus (FCoV)* : coronavirus félin entérique – *Feline Enteric CoronaVirus (FECV)*, et coronavirus de la péritonite infectieuse féline — *Feline Infectious peritonitis Virus (FIPV)*
 - coronavirus humain 229E (en) – *Human coronavirus 229E (HCoV-229E)*
 - virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV)
 - virus de la gastroentérite transmissible du porc (en) – *Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)*
 - coronavirus humain NL63 (en) — *Human Coronavirus NL63 (NL or New Haven)*
 - virus respiratoires porcins (en)
- Groupe 2 ou beta :
 - coronavirus bovin (en) – *Bovine coronavirus (BCoV)*
 - coronavirus humain OC43 (en) – *Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)*
 - Virus de l'hépatite murine – *Murine hepatitis virus (MHV)*

- *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV)*
- *Rat coronavirus (RCV)*
- coronavirus du dindon (en) (*TCoV*)
- (*HCoV-HKU1 (en)*)
- virus de la silodacryonite du rat
- *Groupe 2b : Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)*
- Groupe 3 ou gamma :
 - virus de la bronchite infectieuse aviaire – *Infectious bronchitis virus (IBV)* coronavirus du dindon – *Turkey coronavirus (Bluecomb disease virus)*

Structure et morphologie de la particule virale

Les **coronavirus** sont des virus sphériques enveloppés, de 60 à 220 nm de diamètre, dont la **structure**, en partie encore hypothétique, comporterait une nucléocapside hélicoïdale à l'intérieur d'une capsid de **structure** icosaédrique, elle-même entourée d'une enveloppe membranaire [12-13]. Ils ont été nommés d'après leur aspect en couronne en microscopie électronique.



Figure 3 : Aspect d'un coronavirus en microscopie électronique. (photo, Pierre Lebon).

La capsid virale formée par la nucléoprotéine (N) et le génome est contenue dans l'enveloppe et est de symétrie hélicoïdale. A la surface des particules sont enchâssées trois protéines structurales, la protéine de membrane M, la protéine d'enveloppe E et la protéine S. La protéine S, également nommée *spike*, donne cet aspect de couronne en microscopie électronique et le nom de cette famille virale.

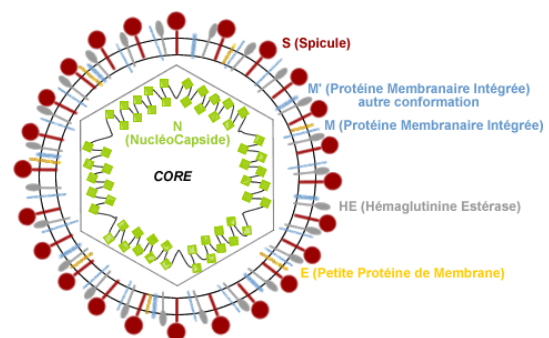


Figure 4: Structure générale d'un coronavirus

LE GENOME COMMUN

Coronavirus connus

Leur génome est constitué d'un ARN linéaire simple brin, non segmenté, de polarité positive (qui peut donc être directement traduit en protéine),

d'environ 30kb, qui le classe parmi les plus grands génomes de virus à ARN connus [4] et qui code pour 7 à 10 protéines. Certaines de ces protéines sont bien caractérisées comme la réplicase et les protéines structurales N (nucléocapside), S (spike), E (enveloppe, aussi appelée sM) et M et M' (membrane), ainsi que la protéine de surface HE (haemagglutinin esterase) qui n'est présente que chez certains coronavirus [13].

ORGANISATION DU GENOME

Le génome est constitué d'un unique brin linéaire d'ARN de polarité positive. L'ARN génomique est l'un des génomes viral à ARN les plus grands avec une taille comprise entre 27,6 et 31,5 kb. L'ARN des *Coronavirus* un cap en 5'Terminal suivi d'une séquence Leader de 65 à 98 nucléotides et d'une région non-traduite de 200 à 400 nucléotides (cf figure 7a et 7b). En 3'terminal du génome se trouve une séquence non-traduite de 200 à 500 nucléotides suivie d'une queue Poly(A). Les fonctions de l'ARN du virion sont de faire les ARNm et de participer à l'infection. L'ARN du virion contient entre 7 à 10 gènes fonctionnels, dont 4 ou 5 codent pour les protéines structurales. Les gènes sont arrangés dans un ordre précis 5'-Polymérase-(HE)-S-E-M-N-3[14], avec un nombre variable d'autres gènes qui sont apparemment non-structuraux (ns) et souvent non-essentiels, du moins en culture cellulaire. Environ 2/3 de l'ARN viral est occupé par le gène de la polymérase. Au chevauchement (overlap) entre les ORF (Open Reading Frame ou Cadre de Lecture Ouvert) des régions 1a et 1b, il y a une séquence "slippery" (glissante) spécifique de 7 nucléotides et une structure en pseudo-nœud (signal d'un décalage de lecture ribosomale), qui sont nécessaires pour la traduction de l'ORF 1b. Le tiers restant du génome comprend les gènes codant pour les protéines structurales et les autres protéines non-structurales [15]. L'organisation des gènes des protéines non-structurales, qui sont intercalées entre les gènes des protéines structurales, varie de manière significative selon les différents *Coronavirus*. Une structure en pseudo-nœud est également prédite en 3'-Terminal de l'ARN des coronavirus.

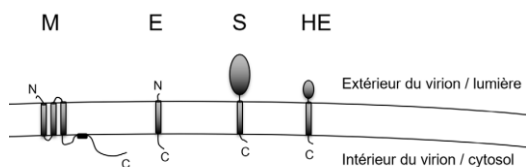


Figure 5 : Topologie des protéines structurales présentes de l'enveloppe des coronavirus. Toutes les protéines sont sous forme de monomère, mais les protéines S et HE forment respectivement des homotrimères et homodimères. L'extrémité N-terminale est signalée par « N » tandis que l'extrémité C-terminale est signalée par un « C ».[16]

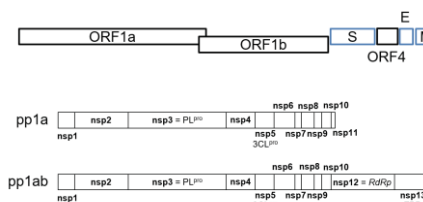


Figure 6 : Organisation du génome de HCoV-229E. En noir sont représentées les protéines non structurales et en bleu les protéines structurales. En dessous du génome sont représentées les polyprotéines pp1a et pp1ab obtenues par décalage du cadre de lecture. Les protéases nsp3 (PLpro) et nsp5 (3CLpro) vont permettre le clivage des polyprotéines. Les 16 protéines non structurales (nsp) obtenues sont indiquées ainsi que les domaines importants de la réplicase. PLpro, papain-like proteinase (nsp3); 3CLpro, 3C-like proteinase (nsp5); RdRp, ARN polymérase ARN dépendante (nsp12); ZBD, zinc-binding domain (nsp13); HEL1, superfamily 1 helicase (nsp13); ExoN, exoribonucléase (nsp14); N7-MT, N7-methyl-transférase (nsp14); endoU, uridylylate-specific endoribonucléase (nsp15); 2'-O-MT, 2'-O-methyl transférase (nsp16).[17]

Protéines virales structurales

La protéine E (80 à 109 acides aminés), avec la protéine M, joue un rôle essentiel dans l'assemblage des particules de coronavirus.

Hémagglutinine estérase HE inconstante : Domaine de fixation de récepteur pour l'acide 9-O-neuraminique-acétylé, hémagglutination, activité de destruction du récepteur (neuraminatase-O-acétylestérase)

- Sérotype HCoV OC43, HCoV NL63 : HE +
- Sérotype HCoV 229E, CoV HKU1 : HE –

La protéine N (377 à 455 acides aminés) est une nucléoprotéine qui s'associe à l'ARN pour former la nucléocapside.

La glycoprotéine de spicule S, comme la protéine E, est une protéine de l'enveloppe. Glycoprotéine de grande taille (de 1100 à 1450 acides aminés), elle forme des extensions (spicules) à la surface de la particule virale et est responsable de l'attachement à la cellule hôte et de la fusion membranaire lors de l'infection, ainsi que de l'induction d'anticorps neutralisants.

La protéine M (225 et 260) est la protéine majoritaire de la capsid, mais elle est également insérée dans l'enveloppe où elle interagit avec la protéine S, et présente au niveau de la nucléocapside où elle interagit avec la protéine N. Rôle dans l'assemblage des virions.

La protéine M' serait une protéine M modifiée.

Le gène de la réplicase code pour une protéine présumptive de 740 à 800 kDa qui présente des homologies de séquence avec diverses protéines (protéases, ARN polymérase dépendante de l'ARN, facteur de croissance et protéine à doigt de zinc) qui sont produites par coupure protéolytique du produit de traduction primaire.[18-19]

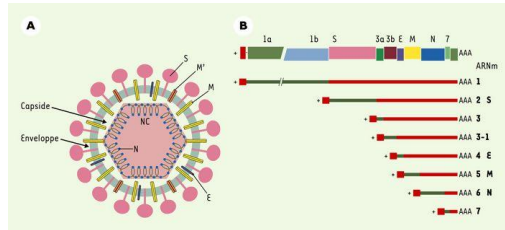


Figure 7a : A. Représentation schématique d'une particule virale. L'enveloppe est formée des protéines S (*spike*), M et M' (membranaires) et E (enveloppe). La nucléocapside (NC), formée par l'ARN génomique associé à la protéine N, est contenue dans la capsid, elle-même entourée de l'enveloppe. B. Structure schématique de l'ARN génomique et des ARN subgénomiques d'un coronavirus prototype. L'ARN génomique (brin +) code pour les protéines d'enveloppe et de nucléocapside ainsi que pour la réplicase, transcrite à partir de l'ORF (*open reading frame*) 1a puis de l'ORF 1b par changement de phase de lecture. La polyprotéine produite par l'ORF 1a/1b est ensuite protéolysée en diverses protéines qui forment le complexe réplcatif. Les protéines structurales S, M, N et E sont traduites à partir de la première phase de lecture (en vert) des ARNm initiés en aval dans la séquence génomique du coronavirus. À l'extrémité 5' des ARN, une séquence 5'-leader est présente, identique à l'extrémité 5' de l'ARN génomique (boîte rouge). AAA = polyadénylation (d'après [7])

Protéines non structurales

Les protéines non structurales des coronavirus sont situées dans les deux premiers tiers du génome, composés de deux ORFs (ORF1a et ORF1b) chevauchantes. Ces deux ORFs sont traduites en deux polyprotéines, pp1a et pp1ab, qui sont elles-mêmes clivées par deux protéases virales permettant la libération des 16 protéines non structurales (nsps).

La protéine **nsp1** a un rôle dans la protection contre le système immunitaire en neutralisant la réponse immunitaire dépendante à l'interféron.

La protéine **nsp2** est mal connue.

La protéine **nsp3** contient des domaines protéases homologues à la papaine (*papain-like protease* PLpro). Cette protéase permet la libération des nsp1, nsp2 et nsp3 par clivage de la polyprotéine. Elle aurait également un rôle majeur lors de la synthèse de l'ARN des coronavirus et est importante lors de l'ancrage dans le réseau membranaire, tout comme les protéines **nsp6** et **nsp4**.

La deuxième protéase virale **nsp5** est une protéase de type sérine qui appartient à la famille de la chymotrypsine (*3C-like proteinase* 3CLpro ou *Main protease* Mpro). Elle permet la libération des nsps 4 à 16 [17].

La protéine **nsp12** est l'enzyme-clé lors de la réplication est la protéine qui est l'ARNpolymérase ARN-dépendante (*RdRp*).

La protéine **nsp8** a également une activité ARN polymérase ARN-dépendante, en association avec **nsp7**.

La protéine **Nsp9** peut se lier à de l'ARN et de l'ADN et pourrait protéger l'ARN naissant au cours de la synthèse.

La protéine **nsp10** fait parti du complexe de méthylation des ARNm et stabiliserait l'activité de **nsp16**[20].

La protéine **nsp13**, qui a une activité ARN hélicase, est nécessaire pour le déroulement de substrats d'ARN ou d'ADN à partir de leur extrémité 5'. Elle possède une activité ARN 5'-triphosphatase probablement utile à la formation de la coiffe. Deux activités importantes pour la coiffe, l'activité N7-méthyltransférase (N7-MT) et l'activité 2'-O-méthyltransférase (2'-O-MT) sont fournies par les **nsps 14 et 16** respectivement. La méthylation de coiffes sert de protection contre la dégradation par les nucléases de l'hôte.

La protéine **nsp15** est une endoribonucléase retrouvée chez tous les Nidovirus mais son rôle lors de la réplication virale est mal connu.

La protéine **nsp14**, qui a une activité d'exoribonucléase (ExoN) en plus de son activité N7-méthyltransférase, assure la fidélité de la réplication.

Elle joue un rôle critique dans les mécanismes assurant la stabilité génétique du génome viral, ce qui permet probablement aux coronavirus d'assurer la réplication de leur génome exceptionnellement long [21].

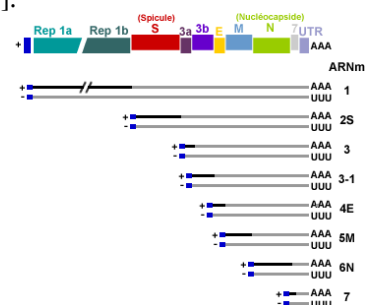


Figure 7b : Représentation du génome du TGEV et motif d'expression des ARNm

Les ORF sont représentées par des boîtes. Les protéines codées par les ORF sont indiquées. Les séquences 5'Leader sont représentées par une petite boîte bleue en 5' de chaque gène. La queue Poly(A) est indiquée par des AAA. Un ARN négatif complémentaire de chaque ARNm a été détecté. S est la protéine de Spicule, M, la protéine membranaire, N, la nucléocapside. 3a, 3b et 7 sont des protéines non-structurales.

Génome du COVID-19

L'ARN du nouveau coronavirus est très proche des coronavirus liés au SARS retrouvé dans les chauves-souris *Rhinolophus sinicus*, identique à 89% pour les nucléotides du virus bat-SL-CoVZC45. Le 1^{er} coronavirus SRAS avait été identifié dans cette espèce à HongKong en 2005.

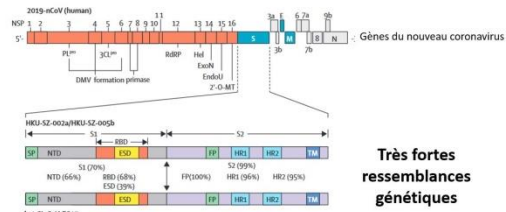
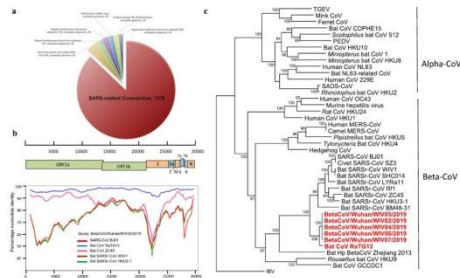


Figure 8 : Génome du COVID-19

La sous-unité 1 du virus est à 68% identique en séquence nucléotidique des coronavirus du SRAS. Une seconde étude pré-publiée ([Zeng-Li Shi 2020](#)) confirme que le génome du COVID-19 (virus échantillonné à partir de 7 patients infectés) ressemble à 96,2% au génome du coronavirus de chauve-souris BatCoV RaTG13.



Peng Zhou et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. PrePrint. bioRxiv. Posted January 23, 2020.

Figure 9: En rouge, les séquences du nouveau coronavirus. Bat= chauve-souris ([Zeng-Li Shi 2020](#))

Cycle de réplication

1. Grâce à leur protéine S, les coronavirus se lient aux molécules cellulaires de surface telles que les métalloprotéinases. Les virus dotés en plus de la protéine HE (hémagglutinine-estérase) dans leur enveloppe peuvent aussi se lier à l'acide N-acétylneuraminique qui sert de corécepteur (lui-même initiateur de l'entrée d'un pathogène dans une cellule hôte). [22]

Ces chercheurs ont également mené une étude in vitro avec des cellules Hela exprimant ou n'exprimant pas le récepteur ACE2. Celui-ci était impliqué dans l'entrée du coronavirus du SRAS [23]

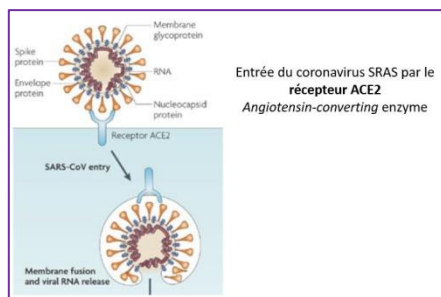


Figure 10: Récepteur cellulaire ACE2

2. Jusqu'à présent, il n'est pas clair si les virus entrent dans la **cellule hôte** par la fusion des membranes virales et cellulaires ou par l'**internalisation**[24].

3. Puisque les coronavirus sont munis d'un seul **génome ARN** à brin positif, ils sont capables de produire leurs protéines et de nouveaux génomes sur place dans le cytoplasme. D'abord les virus assemblent leur **ARN polymérase** qui ne reconnaît et produit que l'ARN viral. Cet enzyme assemble le

brin négatif, se servant du brin positif comme modèle [17].

4. Par la suite, ce brin négatif sert lui-même de modèle pour transcrire de petits **ARN sous-génomiques** qui sont utilisés pour fabriquer toutes les autres protéines. Par ailleurs, ce brin négatif joue un rôle dans la réplication de nouveaux génomes ARN à brin positif [17]

5. La **protéine Naide** à lier l'ARN génomique alors que la protéine M s'intègre à la membrane du **réticulum endoplasmique** à l'instar des protéines HE et S. Après liaison, les nucléocapsides (la coque) assemblées dotés d'ARN hélicoïdale bourgeonnent à l'intérieur du réticulum endoplasmique et seront recouvertes de sa membrane [21].

6. Cette progéniture virale est enfin portée par des **vésicules golgiennes** vers la membrane cellulaire pour être enfin [21].

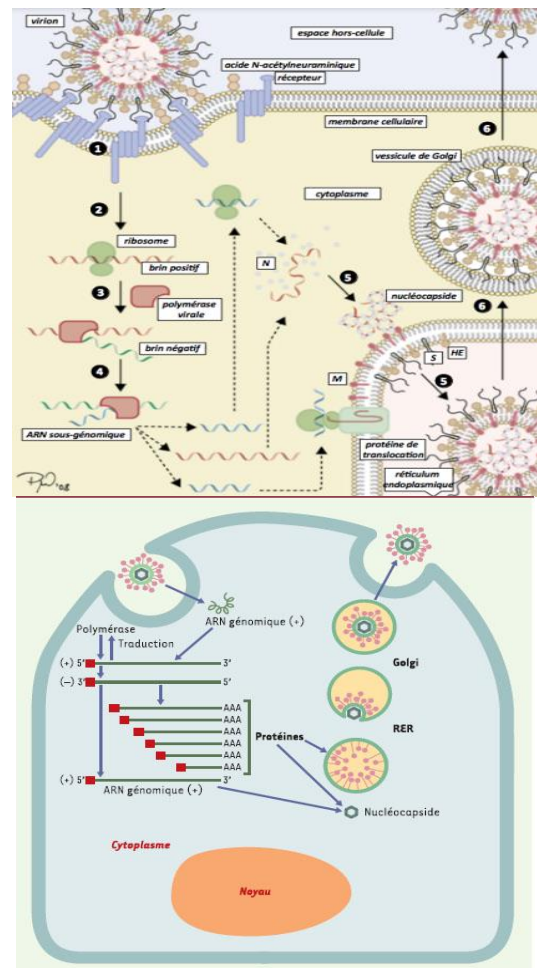


Figure 11: Cycle infectieux des coronavirus

L'ensemble du processus de réplication virale a lieu dans le cytoplasme. Après interaction des protéines S avec des récepteurs cellulaires et fusion membranaire, l'ARN génomique viral introduit dans le cytoplasme donne naissance, par traduction, à la réplicase qui porte l'activité polymérase. La polymérase permet la production d'ARN génomique et d'ARNm

codant pour les différentes protéines structurales du coronavirus. L'ARN génomique s'associe la protéine N pour former la nucléocapside. Les particules virales sont assemblées et excrétées de la cellule via le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et dans l'appareil de Golgi. La séquence 5'-leader à l'extrémité 5' des ARN est représentée en rouge. AAA: polyadénylation.[11]

PROPRIETES BIOLOGIQUES

Les Coronavirus (appelé ainsi car présentant une forme de couronne ou corona) infectent les oiseaux et beaucoup de mammifères, y compris les humains. La trachée respiratoire, les organes gastro-intestinaux, ainsi que les tissus neurologiques sont les cibles les plus fréquentes des coronavirus, mais d'autres organes incluant le foie, le cœur, les reins et les yeux peuvent être également affectés [25]. Les cellules épithéliales sont les cibles principales des coronavirus [26]. Les cellules largement distribuées telles que les macrophages sont aussi souvent infectés par les coronavirus. Ces virus sont relativement restreints dans leur spectre d'hôte, infectant seulement leur hôte naturel, et des espèces animales relativement proche. Occasionnellement, l'infection par le coronavirus passe la barrière d'espèce. Les vecteurs biologiques sont inconnus. Les transmissions par respiration, fécal et oral sont courantes. Les infections de l'homme et des animaux par les coronavirus semblent être ubiquitaires

Viabilité, résistance physico-chimique :

Pas de donnée spécifique à COVID-19, néanmoins, les Coronavirus, sont classiquement sensibles à l'hypochlorite de sodium à 0,1 %, aux composés organochlorés à 0,1 %, aux iodophores à 10 %, à l'éthanol à 70 % et au glutaraldéhyde à 2 %. Résistants aux composés d'ammonium quaternaire à 0,04 % et aux dérivés phénoliques

Distribution géographique des coronavirus

Les coronavirus ont une distribution mondiale. HCoV-229E et HCoV-OC43 sont identifiés depuis les années 1960 et ont été isolés sur tous les continents. D'autres coronavirus humains ont été isolés (HCoV-NL63 et HKU1) dans de nombreux pays. Des cas d'infections par HKU1 en dehors de l'Asie ont été détectés à New Haven aux Etats-Unis chez des enfants, ainsi qu'en Australie, en France, et au Brésil, indiquant une circulation mondiale du virus. Fin 2004 aux Pays Bas un autre coronavirus est isolé HCoV-NL63, puis dans de nombreux pays [27].

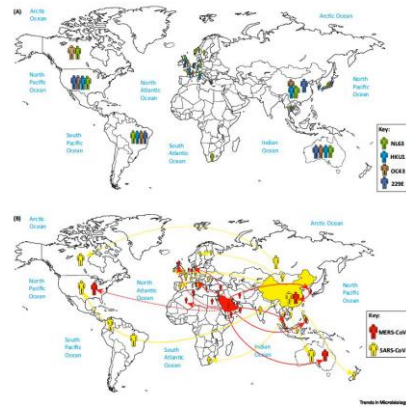


Figure 12 : Distribution mondiale des coronavirus humains
(A) Les couleurs vertes, bleues, brunes et violettes représentent la distribution globale des coronavirus humains NL63, HKU1, OC43 et 229E respectivement. (B) Les couleurs rouges et jaunes représentent la distribution globale du MERS-CoV et du SARS-CoV respectivement (schéma issu de Suet al, 2016)[27]

SRAS-CoV : Découverte du virus en février 2003 (décès d'un Américain à Hong-Kong) ; le virus est rétrospectivement impliqué dans une épidémie de pneumonies survenant dans la province de Guangdong, Chine, depuis novembre 2002. De novembre 2002 à juillet 2003, 8096 cas probables de SRAS ont été rapportés à l'OMS, 774 décès. Le taux de mortalité était de 9.6%. L'épidémie s'est répandue dans d'autres pays en Asie, en Amérique du Nord et en Europe (37 pays/régions au total) pendant 9 mois. En juillet 2003, l'OMS a déclaré comme interrompue la chaîne de transmission interhumaine du SRAS. Deux cas sporadiques sont survenus en août et décembre 2003 (2 laboratoires de Singapour et Taiwan ayant manipulé le SARS-CoV), et plusieurs épisodes de SRAS ont été notifiés justifiant le maintien de la vigilance par la possibilité de résurgence (données InVS) : A partir d'un réservoir animal ou d'une autre source latente encore inconnue (4 cas isolés signalés dans la province de Guangdong entre décembre 2003 et janvier 2004, pas de transmission inter humaine). A partir de laboratoires (En avril 2004 poussée épidémique à Pékin et province d'Anhui, Chine : 9 cas signalés, contamination interhumaine secondaire puis tertiaire à partir d'un laboratoire). Les pays autour de la péninsule arabique sont reconnus comme endémiques pour le MERS-CoV et l'Arabie Saoudite est le pays qui a signalé le plus de cas. Depuis sa découverte en 2012, 27 pays ont déclaré des cas d'infection par le MERS-CoV dont l'origine est souvent liée à un voyage dans la péninsule arabique. Le MERS-CoV a fait 858 morts sur 2494 cas déclarés (34.4%).

Transmission interhumaine

Si l'épidémie est vraisemblablement liée à la fréquentation d'un marché de fruits de mer, le mode de transmission du virus et les facteurs de risque associés sont encore inconnus. La transmission

interhumaine est cependant aujourd'hui avérée sans qu'on puisse en établir les modalités

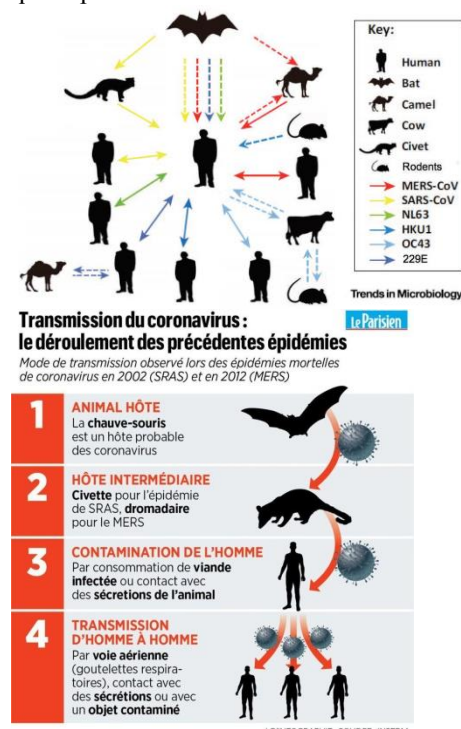


Figure13 : Transmission intra- et inter-espèces des coronavirus humains. Les flèches rouges, jaunes, vertes, bleues, marrons et violettes représentent la transmission du MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, et HCoV-229E respectivement, entre les chauves-souris, les dromadaires, les vaches, les humains et les civettes palmées (voir légende). Les flèches pleines représentent les transmissions confirmées entre deux espèces et les flèches en pointillé représentent les transmissions suspectées (Figure adaptée de Su et al, 2016[27])

Les coronavirus se transmettent principalement par aérosols de liquides biologiques et par contamination des surfaces. Ils infectent les voies aériennes humaines en entrant dans les cellules de l'épithélium respiratoire par le pôle apical. Les nouveaux virions sont également excrétés à partir du pôle apical, facilitant la dissémination du virus par la toux et les éternuements [28].

Situation épidémiologique internationale actuelle.

Au 26/02/20, à 15h, la situation épidémiologique internationale fait état de :

- 81 027 cas confirmés de COVID-19, dont 78 095 cas en Chine (PRC) (96,4%) et 2 932 cas hors Chine (PRC) (3,6%)
- 2 716 décès en Chine (PRC), 2 en France, 2 à Hong-Kong, 1 au Japon, 1 aux Philippines, 15 en Iran, 4 sur le bateau de croisière "Diamond Princess", 1 à Taïwan, 11 en Corée du Sud, 11 en Italie
- Au total, 5 continents touchés :
- Asie hors chine continentale : 1 769 cas
- Europe : 383 cas
- Amérique : 65 cas
- Océanie : 22 cas

- Afrique : 2 cas
- Autres : 691 cas sur un bateau de croisière au large du Japon
- Parmi les 39 pays hors Chine ayant signalé des cas, 5 nouveaux pays sont touchés : Autriche (2 cas), Algérie (1 cas), Brésil (1 cas), Croatie (1 cas), Suisse (1 cas).

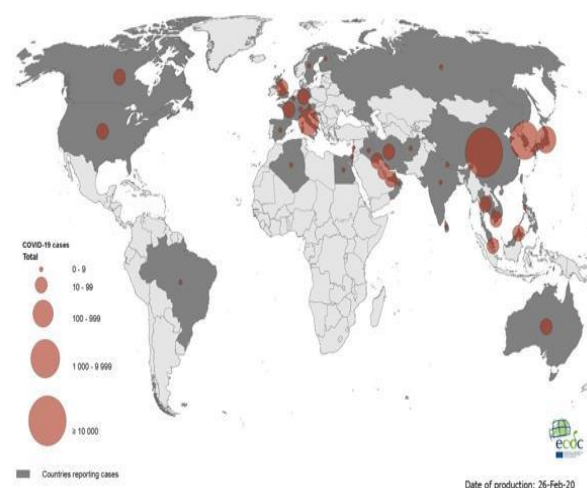


Figure 14 : Répartition mondiale des cas confirmés de COVID-19, 26 février 2020, 14h30
Source : ECDC

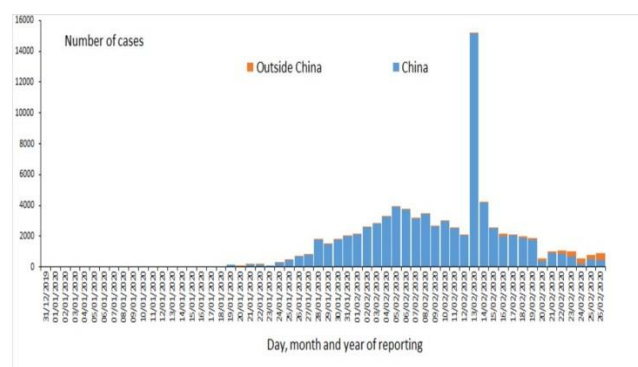


Figure 15 : Nombre quotidien des nouveaux cas confirmés de COVID-19, en Chine et hors Chine, 26 février 2020, 14h30
Source : ECDC - NB : depuis le 13/02/20, la Chine a changé sa définition de cas en incluant les cas cliniques sans confirmation laboratoire

Figure 16 : Nombre quotidien des nouveaux cas confirmés de COVID-19, par continent (dont Asie hors Chine), 26 février 2020, 14h30

Source : ECDC - * Other : bateau de croisière « Diamond Princess »

Italie

À ce jour (26 février 2020), le nombre de cas en Italie est de 374 cas confirmés dont 12 décès, rapportés dans 10 régions. Parmi les 374 cas, 96% des cas sont concentrés dans 3 régions : 69% des cas se situent en Lombardie (n=258), 19% en Vénétie (n=71), 8% en Emilie-Romagne (n=30), et les autres cas dans les régions suivantes : Piémont (3), Latium (3), la Sicile (3), la Toscane (2), Ligurie (2), Trentin Haut-Adige (1) et Marches (1).

Des symptômes typiques des infections respiratoires virales : la maladie porte désormais le nom de SARS-CoV-2

Les symptômes décrits lors d'infection par COVID-19 évoquent principalement une infection respiratoire aiguë (fièvre, toux), mais des difficultés respiratoires et des anomalies pulmonaires détectables radiologiquement sont également décrites, ainsi que des formes plus sévères.

Dans une étude portant sur 41 patients chinois adultes, des chercheurs ont rapporté de la fièvre (chez 98 % des patients), de la toux (76 %), de la fatigue (44 %), des maux de tête (8 %) et, rarement, de la diarrhée (3 %). La durée médiane entre les premiers symptômes et les difficultés respiratoires était de 8 jours (5-13 jours) [29]. Comme pour la grippe, les patients avec des maladies chroniques préexistantes telles que l'hypertension artérielle, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies hépatiques, les maladies respiratoires semblent plus susceptibles de développer des formes sévères, de même que les personnes âgées.

Les signes cliniques sont généralement calqués sur le tableau clinique des autres coronavirus humains (HCoV, Mers-Cov, SRAS-CoV...)

Période d'incubation

Le **temps d'incubation**, durée entre l'exposition au virus et à la manifestation des premiers symptômes, est évalué **entre 2-et 13 jours** [27-30-31].

Symptômes et évolution

Les manifestations du coronavirus font leur apparition moins de 24 heures après l'infection. Le plus généralement, il entraîne des **maladies respiratoires légères à modérées** comme le rhume avec des symptômes tels que :

- mal de tête,
- toux,
- gorge irritée,
- fièvre,
- un sentiment général de malaise.

Plus gravement, il peut provoquer des maladies respiratoires des voies inférieures comme la **pneumonie** ou la **bronchite**, particulièrement chez les personnes atteintes d'une maladie cardio-pulmonaire, chez celles dont le système immunitaire est affaibli, chez les nourrissons et les

personnes âgées [30-32-33]

Diagnostic

Dans la plupart des cas, le diagnostic de l'infection à coronavirus n'est pas nécessaire, la maladie étant bénigne et se résolvant par elle-même. Toutefois, le diagnostic de la pneumonie virale nécessite une confirmation en laboratoire à cause des ressemblances entre les symptômes cliniques des différents virus à tropisme respiratoire, comme le virus de la grippe [31]. De plus, le diagnostic des infections à MERS-CoV, SARS-CoV et 2019-nCoV est essentiel pour la gestion clinique et le contrôle épidémiologique des infections.

Le diagnostic d'infection au COVID-19 est posé sur :

Des critères épidémiologiques : notion de séjour en zone de circulation du virus depuis moins de 14 jours, ou de contact direct avec une personne infectée.

Des critères cliniques : signes d'infection respiratoire basse (fièvre, toux, dyspnée).

Critère biologique : test diagnostique spécifique au COVID-19 réalisé au laboratoire national de référence

Diagnostic direct

• Nature des prélèvements :

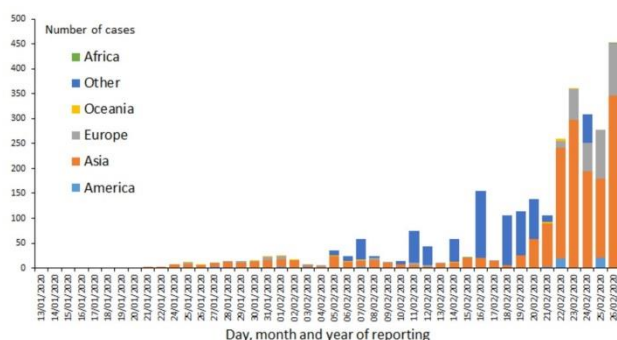
Les prélèvements biologiques appropriés pour les tests incluent des aspirations rhinopharyngées, des écouvillonnages nasaux et trachéaux, des prélèvements d'expectorations et des prélèvements de lavages broncho-alvéolaires. Dans le cas du SARS-CoV, il est également possible d'effectuer des prélèvements de selles [34].

• Immuno-détection et microscopie :

- IF (Immuno Fluorescence). Ac monoclonal spécifique permettant de reconnaître les principaux groupes antigéniques.
- Microscopie électronique : diagnostic délicat car grand polymorphisme des coronavirus [34].

• Biologie moléculaire :

- RT PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), méthode sensible et spécifique, permettant de détecter l'infection (ARN) dans les 10 jours après le début de la fièvre. Technique la plus appropriée. Il existe un kit commercialisé basé sur la technologie temps réel : kit PCR HPA Coronavirus TM Real Art™ (Abbott Diagnostics).
- La PCR doit être positive sur au moins 2 échantillons cliniques différents (aspiration nasopharyngée et écouvillonnage nasal et trachéal et aussi selles) ou sur le même type d'échantillon clinique récolté à deux moments différents [35].
- puis le séquençage d'un fragment d'ADN spécifique des cellules infectées a confirmé l'appartenance du virus isolé au groupe des coronavirus



- L'ARN de ce virus est présent dans les différents types de prélèvements analysés (sécrétions respiratoires, urine, selles et biopsies) pour la plupart des patients étudiés. On observe également la présence d'anticorps contre ce nouveau virus chez les patients infectés. La disponibilité de la séquence complète du virus va permettre d'affiner les analyses par RT-PCR qui sont pour l'instant les seuls outils diagnostiques fiables et rapides, dans l'attente du développement éventuel d'anticorps sensibles et spécifiques. [36-37-38]

Traitement

Il n'existe aucun traitement spécifique pour les maladies provoquées par les coronavirus humains. Les traitements sont symptomatiques : prendre des médicaments contre la douleur et la fièvre, se reposer, ne pas sortir.

Vaccin

Il n'existe actuellement aucun vaccin disponible pour se protéger contre l'infection par un coronavirus humain. Toutefois, les scientifiques de l'Institut Pasteur multiplient les initiatives pour trouver un vaccin contre le coronavirus. Ils sont parvenus à **isoler et mettre en culture des souches du nouveau virus** COVID-19 et espèrent mettre au point un vaccin d'ici un an et demi, indiquent les chercheurs du Centre National de Référence des Virus respiratoires dans un communiqué du 30 janvier 2020. *"Désormais, les chercheurs de l'Institut Pasteur disposent du virus à l'origine de cette infection. Cet isolement viral ouvre la voie à de nouvelles approches diagnostique, thérapeutique et prophylactique."* [39-40].

Prévention

Pour réduire son risque d'infection par un coronavirus, il est conseillé de :

- se **laver les mains régulièrement** avec de l'eau et du savon pendant au moins 20 secondes (sans oublier les solutions hydro-alcooliques très pratiques quand on ne peut pas se laver les mains),
- éviter de se toucher les yeux, le nez ou la bouche quand les mains ne sont pas lavées,
- éviter les contacts avec des personnes malades.
- porter un **masque** [39-40].

Dernières nouvelles

COVID-19 est proche du SARS-CoV

Le travail de séquençage génomique a été réalisé à partir de virus isolés chez cinq patients différents à un stade précoce de la maladie. Par comparaison

entière du génome, il apparaît que COVID-19 et une souche virale de chauves-souris sont identiques à 96 %.

Autre fait nouveau, COVID-19 serait aussi un proche cousin du SARS-CoV, dont le réservoir est la chauve-souris. Ces deux virus partagent 79,5 % de leur génome, mais aussi la même protéine, ACE2, qui leur sert de porte d'entrée dans les cellules de la muqueuse respiratoire.

Faut-il pour autant abandonner l'hypothèse des serpents ? Si le réservoir naturel de COVID-19 semble plutôt être les chauves-souris, les serpents décrits précédemment pourraient être

l'hôte intermédiaire entre les chauves-souris et l'Homme. Dans le cas du SARS-CoV, les humains ont été infectés lors d'un contact rapproché avec des civettes palmistes à masque (*Paguma larvata*), elles aussi vendues et consommées dans les marchés chinois. Bien sûr, cela n'est qu'une hypothèse.

De leur côté, les scientifiques continuent leurs investigations pour mieux comprendre cette souche jusqu'alors inédite. Une équipe de recherche de l'université de médecine de Pékin a publié, le 22 janvier, une étude dans *Journal of Medical Virology*. Ces chercheurs pensent avoir identifié l'origine de cette épidémie qui inquiète le monde entier : les serpents

COVID-19, issu d'une recombinaison, viendrait des serpents

Les coronavirus sont plutôt communs chez les mammifères et les oiseaux, notamment chez des espèces proches des humains comme les cochons, les chats, les rats ou encore les volailles. Pour remonter la piste de l'origine du virus, les scientifiques chinois ont comparé plus de 200 génomes de coronavirus infectant les animaux avec celui de COVID-19. En comparant les séquences génétiques qui sont spécifiques à l'hôte du virus par bio-informatique, il apparaît que les serpents seraient le réservoir le plus probable parmi toutes les espèces étudiées.

De plus, le génome du coronavirus de Wuhan est né de la recombinaison de deux coronavirus : l'un connu pour infecter les chauves-souris et l'autre aux origines inconnues. Certaines de ces protéines diffèrent donc de celles de ses « parents ». C'est le cas d'une glycoprotéine de surface qui autorise l'entrée du virus dans d'autres cellules. Cette modification aurait permis à COVID-19 de franchir la barrière des espèces pour infecter les humains.

Le Bongare rayé (*Bungarus multicinctus*) est l'une des deux espèces vendues sur le marché de Wuhan, là où l'épidémie de COVID-19 a débuté.

Références

1. **Vabret A., J. Dina, E. Brison, J. Brouard, F. Freymuth** Pathologie Biologie Volume 57, n° 2 pages 149-160 Coronavirus humains (HCoV)
2. **Lau, S.K.P., and Chan, J.F.W.** (2015). Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals. *Virol. J.* 12, 209.
3. **Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lau, C.C.Y., Tsang, A.K.L., Lau, J.H.N., Bai, R., Teng, J.L.L., Tsang, C.C.C., Wang, M., et al.** (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995–4008.
4. **Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Wong, B.H.L., Wong, S.S.Y., Leung, S.-Y., Chan, K.-H., and Yuen, K.-Y.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14040–14045.
5. **Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, S.-Z., Zhang, H., et al.** (2005). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science* 310, 676–679.
6. **Pfefferle, S., Oppong, S., Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Müller, M.A., Annan, A., Vallo, P., Adu-Sarkodie, Y., et al.** (2009). Distant Relatives of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Close Relatives of Human Coronavirus 229E in Bats, Ghana. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1377–1384.
7. **Enjuanes, L., Spaan, W., Snijder, E. & Cavanagh, D.** (2000b). Nidovirales. In *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*, pp. 827-834. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, D. J. McGeoch, J. Mani1off, M. A. Mayo, C. R. Pringle & R. B. Wickner. New York: Academic Press.
8. **Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al.** Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003; 300: 1394-9.
9. **Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al.** The genome sequence of the SRAS associated coronavirus. *Science* 2003; 300: 1399-404.
10. **Enjuanes L, Sola I, Almazan F, et al.** Coronavirus derived expression systems. *J Biotechnol* 2001; 88: 183-204.
11. **Tratner I.** SRAS: Le virus MEDECINE/SCIENCES 2003 ; 19 : 885-91
12. **Vabret A, Brouard J, Petitjean J, Eugene-Ruellan G, Freymuth F.** Infections à coronavirus humains. Importance et diagnostic. *Presse Med* 1998 ; 27: 1813-7.
13. **Risco C, Anton IM, Enjuanes L, Carrascosa JL.** The transmissible gastro-enteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol* 1996;70: 4773-7.
14. **Zhang, R., Wang, K., Lv, W., Yu, W., Xie, S., Xu, K., Schwarz, W., Xiong, S., and Sun, B.** (2014). The ORF4a protein of human coronavirus 229E functions as a viroporin that regulates viral production. *Viral Membr. Proteins - Channels Cell. Netw.* 1838, 1088–1095
15. **Ponnusamy, R., Mesters, J.R., Ziebuhr, J., Moll, R., and Hilgenfeld, R.** (2006). Non structural proteins 8 and 9 of human coronavirus 229E. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581, 49–54.
16. **Masters, P.S.** (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292.
17. **Fehr, A.R., and Perlman, S.** (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1282, 1–23.
18. **Almazan, F., Gonzalez, J. M., Pénzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J. & Enjuanes, L.** (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5516-5521
19. **Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Almazan, F., Calvo, E. & Enjuanes, L.** (2002).

- Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by the insertion of an intron. *J. Viral*. In press
20. **Denison, M.R., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Eckerle, L.D., and Baric, R.S.** (2011). Coronavirus: An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol.* 8, 270–279.
21. **Neuman, B.W., Chamberlain, P., Bowden, F., and Joseph, J.** (2014). Atlas of coronavirus replicase structure. *Nidoviruses* 194, 49–66.
22. **Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., and Whittaker, G.R.** (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011–1033.
23. **Earnest, J.T., Hantak, M.P., Li, K., McCray, P.B., Perlman, S., and Gallagher, T.** (2017). The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *PLoS Pathog.* 13, e1006546.
24. **Bosch, B.J., Smits, S.L., and Haagmans, B.L.** (2014). Membrane ectopeptidases targeted by human coronaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 0, 55–60.
25. **Escors, D., Ortego, J., Laude, H. & Enjuanes, L.** (2001b). Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J. Viral.* 75, 12228–12240.
26. **Alonso, S., Izeta, A., Sola, L & Enjuanes, L.** (2002a). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Viral.* 76, 1293–1308
27. **Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., and Gao, G.F.** (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502.
28. **Jonsdottir, H.R., and Dijkman, R.** (2016). Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virol. J.* 13, 24.
29. **Chaolin Huang, Yeming Wang et al.,** [2020]. Xingwang Li*, Lili Ren*, Jianping Zhao*, Yi Hu*, Li Zhang, Guohui Fan, Jiuyang Xu, Xiaoying Gu, Zhenshun Cheng, Ting Yu, Jiaan Xia, Yuan Wei, Wenjuan Wu, Xuelei Xie, Wen Yin, Hui Li, Min Liu, Yan Xiao, Hong Gao, Li Guo, Jungang Xie, Guangfa Wang, Rongmeng Jiang, Zhancheng Gao, Qi Jin, Jianwei Wang†, Bin Cao Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China Chaolin Huang*, Yeming Wang*, [www.thelancet.com](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5) Published online January 24, 2020 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
30. **Bradburne, A.F., Bynoe, M.L., and Tyrrell, D.A.** (1967). Effects of a “new” human respiratory virus in volunteers. *Br. Med. J.* 3, 767–769.
31. **Falsey, A.R., and Walsh, E.E.** (2006). Viral Pneumonia in Older Adults. *Clin. Infect. Dis.* 42, 518–524.
32. **van der Hoek, L., Pyrc, K., and Berkhout, B.** (2006). Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 760–773.
33. **Sahar Abdul-Rasool, B.C.F.** (2010). Understanding Human Coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* 4, 76–84.
34. **Pozzetto, B., and Groupe Révir** (2007). Révir - Référentiel en virologie médicale (Alinéa Plus).
35. **Chan, J.F.W., Sridhar, S., Yip, C.C.Y., Lau, S.K.P., and Woo, P.C.Y.** (2017). The role of laboratory diagnostics in emerging viral infections: the example of the Middle East respiratory syndrome epidemic. *J. Microbiol.* 55, 172–182.
36. **Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al.** Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003; 348: 1995–2005.
37. **Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al.** A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953–66. [
38. **Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al.** Coronavirus as a possible cause of severe

acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361: 1319–25

39. Les coronavirus, Anses, 25 juillet 2018.

40. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases

Sources internet:

1. <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>
2. Chaolin Huang et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 24 Janvier 2020. <https://www.thelancet.com/pb-assets/Lancet/pdfs/S0140673620301835.pdf>
3. Michael Letko and Vincent Munster. Functional assessment of cell entry and receptor usage for lineage B beta-coronaviruses, including 2019-nCoV <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.22.915660v1.full.pdf+html>
4. Zheng-Li Shi, Peng Zhou et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.22.914952v1.full.pdf+html>
5. WHO. Situation report. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
6. MRC Centre for global infection disease analysis. News/Wuhan Coronavirus <https://www.imperial.ac.uk/mrc-global-infectious-disease-analysis/news-wuhan-coronavirus/>
7. Preliminary assessment of the International Spreading Risk associated with the 2019 novel Coronavirus (2019-nCoV) outbreak in Wuhan City. January 21, 2020 https://www.mobs-lab.org/uploads/6/7/8/7/6787877/wuhan_novel_coronavirus_jan21.pdf
8. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/coronavirus-wuhan>
9. <https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus-china>
10. (<https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/>)
11. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/watch/pneumonia-china>
12. https://emergency.cdc.gov/han/HAN00424.asp?deliveryName=USCDC_511-DM16877

Nouveau Coronavirus (Maladie: COVID-19, Virus: SARS-CoV-2)

DEFINITION DE CAS

Définition de cas d'un cas possible de COVID-19

La Belgique définit les patients suivants comme suspects pour COVID-19 :

Toute personne avec :

- des symptômes cliniques d'une infection respiratoire supérieure ou inférieure (avec un début soudain d'au moins un des symptômes suivants : fièvre, toux, difficultés respiratoires)

ET

- un historique de voyage dans les 14 jours avant le début des symptômes dans un pays/région avec une transmission soutenue* : Chine, Corée du Sud, Iran et 11 Communes en Italië (Codogno; Casapusterlengo; Castiglione van Adda; Maleo; Fombio; Bertonico; Castelgerundo; Somaglia; San Fiorano; Terranova dei Passerini; Vo Euganeo)
- OU un contact physique avec un **cas confirmé** par un test de laboratoire, de COVID-19 dans les 14 jours avant le début des symptômes de votre patient.

OU

Toute personne avec :

- des symptômes cliniques d'une infection respiratoire aiguë sévère et/ou un signe clinique ou radiologique d'atteinte pulmonaire qui exige une hospitalisation

ET

- un historique de voyage dans les 14 jours avant le début des symptômes dans un pays/région avec une transmission limitée* : liste ci-dessus plus autres communes de Lombardie, Vénétie et Emilia Romagna en Italie, Singapour, Japon.

**Cette liste est susceptible d'évoluer à tout moment en fonction des informations disponibles*

SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE GLOBALE

Le 31 décembre 2019, les autorités sanitaires de Wuhan (Chine) ont signalé des cas groupés de pneumonies de cause inconnue. La grande majorité des cas avaient visité le marché alimentaire de Huanan (avec des poissons, des fruits de mer et des animaux vivants). Ce marché a été fermé le 1er janvier 2020. L'investigation a montré que le premier groupe de personnes infectées concernait 41 patients qui ont développé des symptômes entre le 8 décembre 2019 et le 2 janvier 2020.

Le 07/01/2020, un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) a été identifié comme étant la cause.

Repérer et prendre en charge un patient suspect COVID-19

INFORMATION pour les SAMU et autres soignants de 1^{ère} ligne (18 février 2020)

Depuis le 12 décembre 2019 des cas de pneumonies liées à un nouveau coronavirus, différent du SRAS et du MERS, ont été rapportés. A ce jour, il y a eu plusieurs dizaines de milliers de cas, essentiellement en Chine, mais également d'autres pays, dont la France. Dans ce contexte, il est essentiel que dès le 1^{er} contact d'un patient suspect avec le système de soins, soit organisé par les 1^{ers} soignants (dont SAU), le recours

rapide à l'expertise clinique et épidémiologique, en appelant le Centre 15 ou directement l'infectiologue* référent (ES habilité COVID-19), après application stricte des mesures de protection, tout en recherchant les diagnostics alternatifs les plus probables (cf. MARS 22 et 30 janv, et 5 fév 2020 - collaborations SFMU, SRLF, SMV, SPILF, CNR, SF2H, SpF).

*Si justifié, l'infectiologue référent est le pédiatre infectiologue.

Dépister - Patient suspect = Tableau clinique (<14 jours après exposition) ET Exposition compatible

► Dépister = Protéger

Tableau clinique : fièvre $\geq 38^\circ$ et/ou signes cliniques d'infection respiratoire aiguë ou autres signes atypiques, dont diarrhée (rare) a fortiori si signes de gravité.

Exposition :

- séjour en Chine, voire au moindre doute en retour d'une [autre zone](#) avec probable transmission du virus,
- ou contact étroit ou co-exposition avec une personne cas confirmé ou cas possible,
- ou travail/séjour dans un hôpital avec cas confirmés.

► **Sans négliger le diagnostic alternatif** : pour éviter tout préjudice pour le patient et débiter un éventuel traitement

anti-infectieux probabiliste, oseltamivir, et/ou antibiotique (co-infections possibles).

Autres causes d'infection respiratoire et/ou fièvre au retour d'Asie :

- grippe, ou autre virose respiratoire (adénovirus, VRS et coronavirus) ;
- pneumonie bactérienne (légionnelle, mycoplasme, Chlamydia, voire pneumocoque) ;
- autres infections : arboviroses (dengue, encéphalite japonaise), Hantavirus, salmonellose, paludisme.

Protéger - TOUX + FIEVRE = MASQUE ; mesures à mettre en place dès suspicion

► **Patient** : friction des mains avec des solutions hydro-alcooliques (SHA) puis port de **masque chirurgical**, isolement en chambre individuelle pré-identifiée.

► **Soignant** : précautions standard et complémentaires « air » et « contact » (= renforcées REB) => SHA, **masque de type FFP2**, surblouse à usage unique, gants non stériles à usage unique, limités aux situations de contact ou de risque de contact avec du sang, des liquides biologiques, dont selles, une muqueuse ou la peau lésée, **lunettes de protection**, charlotte.

► **Pré-identification des personnes contact** : avec ARS ; médecine du travail et EOH pour professionnels et patients de l'ES.

Prendre en charge

► **Recherche de signes de gravité** : notamment signes de détresse respiratoire et d'éventuelles comorbidités.

► **Traitement symptomatique**, si urgence vitale. Pas de traitement spécifique validé (recherche clinique en cours).

Recours à l'expertise : infectiologue référent (ES habilité COVID-19) avec appui SAMU-Centre 15

► **Analyse clinico-épidémiologique** pour estimer la probabilité diagnostique et classer le patient suspect en cas possible si approprié en se référant à la [définition de cas SpF](#) (susceptible d'évolution).

► **Imagerie pulmonaire** : radiographie, scanner, autre.

► **Prélèvements microbiologiques** : naso-pharyngés, pour élimination autres virus respiratoires plus probables et si possible, respiratoires profonds. Envoi pour PCR SARS-CoV-2 au laboratoire équipé de l'ES habilité [et au CNR](#).

Alerter l'ARS et Orienter

► **Si cas possible validé**, décision d'orientation avec l'infectiologue référent de l'ES => ES pré-identifié par l'ARS et prévenu, transport sous la responsabilité du SAMU-Centre 15.

► **Si patient restant suspect**, prise en charge possible quelques heures dans l'ES de premier contact, mesures de précautions ci-dessus maintenues jusqu'à classement ; traitement adapté d'un éventuel diagnostic alternatif ou associé.

QUESTIONS-CLES pour les SOIGNANTS de 1^{ère} LIGNE

COVID-19 (18 février 2020)

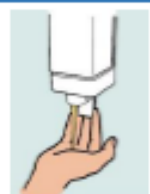
► Contenu susceptible d'évoluer pour s'adapter à la situation épidémiologique



1 – Quel est le motif de la consultation ?

2 – Le patient a-t-il de la fièvre et/ou des signes respiratoires ?

⇒ Température prise et $\geq 38^{\circ}\text{C}$?



Fièvre + toux = MASQUE
pour le patient

+ **précautions renforcées REB** pour le soignant =>

3 – Le patient a-t-il un tableau clinique compatible avec COVID-19 ? Une pathologie sous-jacente à l'origine de formes plus graves ?

⇒ Atteinte des voies respiratoires basses, pouvant aller jusqu'à l'insuffisance respiratoire aigüe

⇒ Immunodépression / maladies chroniques



(ESR Bordeaux)



4 – Le patient revient-il de la zone de circulation du virus depuis moins de 14 jours ?

⇒ Si oui, dates du séjour ?

ut du formulaire

Cas rare de bactériémie à *Sphingomonas paucimobilis* chez un patient immunodéprimé

Microbiologie clinique
Article original

Kassah-Laouar Ahmed⁽¹⁾-Chabane N⁽¹⁾ - Benharra A⁽¹⁾M.Saidi

⁽¹⁾Laboratoire Central de Biologie Médicale-Unité de Microbiologie Hygiène Hospitalière-Centre de Lutte Contre le Cancer-Batna-ALGERIE

Correspondant Auteur : Professeur Ahmed KASSAH-LAOUAR Laboratoire Central de Biologie Médicale-Unité de Microbiologie Hygiène Hospitalière-Centre de Lutte Contre le Cancer-Faculté de Médecine-Université Batna 2-05000-Batna-ALGERIE

Email : prkassah@yahoo.fr

Résumé : *Sphingomonas paucimobilis* est un bacille à Gram négatif, non fermentaire, à croissance très lente. Agent pathogène occasionnel d'infections nosocomiales, isolé de l'environnement naturel et hospitalier. *S. paucimobilis* cause des infections graves chez le sujet immunodéprimé. Nous rapportons l'observation d'un jeune enfant de 03 ans, présentant un néphroblastome sur leucémie aigüe ayant développé une bactériémie à *S. paucimobilis*.

Mots clés : *S. paucimobilis*, néphroblastome, leucémie, bactériémie,

Introduction :

Sphingomonas est un bacille à Gram négatif, oxydase positive, aérobique, non sporulant et non fermentant. Connu initialement sous le nom de CDC Group IIk, biotype 1, puis en 1977 il a pris le nom de *Pseudomonas paucimobilis* (*S. paucimobilis*)[1]. Ce n'est qu'en 1990, que le genre *Sphingomonas* a été créé [2]. Il partage les propriétés biochimiques, la teneur en acides gras et l'homologie de son ADN avec les espèces du genre *Flavobacterium* [3]. Première description d'infection à *Sphingomonas* a été rapportée en 1979 chez un marin ayant présenté un ulcère de jambe [4]. Puis de nombreux cas d'infections à *Sphingomonas* ont été rapportés dans la littérature. Autrefois *S. paucimobilis* était considéré comme la seule espèce du genre d'intérêt médical. Récemment deux autres espèces ayant une importance clinique ont été décrites, *Sphingomonas mucosissima* et *Sphingomonas adhesiva*. [5-6]

Microbiologie

Sphingomonas est un bacille à Gram négatif, oxydase positive, aérobique, non sporulant et non fermentant. Ce sont des bacilles mobiles par un court flagelle polaire. Après 48 heures d'incubation, les colonies sont pigmentées en jaune saumon ou orange sur gélose nutritif (**Figure 1**),



Figure 1 : Culture de *Sphingomonas paucimobilis* montrant des colonies jaunâtres sur milieu gélose nutritif, gélose au sang frais et gélose au chocolat [3]. Ce microorganisme ne cultive pas gélose Mc Conkey ou milieux sélectifs pour entérobactéries. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C [7]. Une caractéristique principale, la membrane externe ne renferme pas de lipopolysaccharides (LPS), mais au contraire possède deux différents types de sphingolipides (d'où son nom) qui sont des inducteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF), d'interleukine (IL) 6 et d'IL-1 à partir des cellules mononucléées [8-9]. L'identification biochimique à l'aide de kits standards commercialisés (Vitek et API 20NE bioMérieux) est souvent difficile, d'autant plus il n'existe pas d'amorces spécifiques pour *S. paucimobilis* [10]

Epidémiologie

L'habitat de *S. paucimobilis* est l'environnement naturel, l'eau, le sol et d'autres sources [3]. A l'hôpital, on peut l'isoler à partir des équipements hospitaliers tels que les nébuliseurs ou de stations d'eau [11]. C'est une bactérie qui prolifère dans de nombreuses solutions stériles (eau distillée, liquide d'hémodialyse, solutions médicamenteuses stériles). La contamination conduit chez une personne immunodéprimée à une bactériémie, à une méningite, un abcès ou à une péritonite. Il paraît que la contamination du produit se produit au stade de la fabrication. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette situation, mais l'une des plus importantes pourrait être la capacité de *S. paucimobilis* de passer à travers les filtres de 0,2 µm utilisés pour la stérilisation finale de plusieurs médicaments, telles que les solutions stériles du médicament [12].

Cas clinique

Un patient âgé de 03 ans, pesant 13 kg, issu d'un mariage non consanguin, le 2^{ème} d'une fratrie de 03 enfants est admis au service d'oncologie pédiatrique du Centre de Lutte Contre le Cancer (CLCC) de Batna-Algérie, le 25-11-2018 pour une fièvre, une asthénie profonde, des douleurs abdominales et un bilan biologique perturbé, à la formule de numération sanguine (FNS), on note une hyperleucocytose (GB : 15400), une anémie (hémoglobine : 6.5 g/dl) et des plaquettes à 29700, une accélération de la vitesse de sédimentation (VS) 60mm à la 1^{ère} heure, une Protéine C Réactive élevée (CRP) à 25,5 mg/l, LDH 920,70 U/l, taux de réticulocytes 1.8% la sérologie pour les hépatites B et C et HIV 1+2 est négative, l'échographie abdominale objective une masse rénale gauche volumineuse évoquant un néphroblastome. À l'admission, la température corporelle était de 39°,4C. L'examen de l'abdomen retrouve à la palpation une masse volumineuse gauche occupant l'hypochondre et le flanc gauche (**Figure 2**), on note aussi une hématurie macroscopique.



Figure 2 : Cliché thoraco-abdominale montrant une distension abdominale

La tomodensitométrie (TDM) faite le 27-11-2018 objective la présence d'une volumineuse masse rénale avec métastase loco-régionale et à distance. Le scanner thoracique fait le 01-12-18 dans le cadre d'un bilan d'extension montre la présence de multiples nodules d'allure secondaire au niveau des 02 champs pulmonaires, un épanchement pleural gauche et épaississement des parois bronchiques, le bilan biochimique montre une glycémie à 1.59 g/l, une urée sanguine : 0.23 g/l, une créatinine sanguine 3g/l, LDH : 2327 U/l. Devant un tel tableau, le malade est mis sous traitement chimiothérapique triple, actinomycine + vincristine + doxo et un traitement anti-infectieux associant cefotaxime et ceftazidime. Deux hémocultures ont été réalisées à trois jours d'intervalle dont une revient positive à staphylocoque à coagulase négative, ce qui a nécessité l'addition de la vancomycine. Une 3^{ème} hémoculture faite le 11-12 2018, revient positive. L'agent pathogène était identifié comme

Sphingomonas paucimobilis, à l'aide de la galerie API NE (**Figure 3**) et du logiciel VITEK 2 système (bioMérieux), avec une probabilité de 95%.



Figure 3 : Caractères biochimiques de *S.*

paucimobilis sur galerie API NE (bioMérieux)

L'antibiogramme a montré une sensibilité à la pipéracilline (CMI<4mg/ml), l'association pipéracilline/tazobactam (CMI< 4mg/ml), à la ceftazidime (CMI:8mg/ml), au cefepime (CMI< 1mg/ml), à l'imipénème (CMI:0.5mg/ml), à l'amikacine (CMI :4mg/ml), à l'association triméthoprime + sulfamethaxazole (CMI<20 mg/ml), une résistance à la pefloxacinine (CMI :8mg/ml), à la colistine (CMI >16 mg/ml), à l'aztréonam (CMI >1mg/ml),

Après deux semaines de traitement anti-infectieux sans réponse, les céphalosporines de 3^{ème} génération sont remplacées par le co-trimoxazole avec le maintien toujours de la vancomycine. Une échographie abdominale de contrôle faite le 20-12-2018, montre la persistance de la masse rénale gauche de 100x60 mm évocatrice d'un néphroblastome, arrêt de la vancomycine, patient mis sous imipénème et flagyl avec maintien du co-trimoxazole, malade est apyrétique, bon état général, régression des douleurs abdominales.

Le 25-12-2018, le patient fait de nouveau un pic fébrile 39°,4C, une FNS faite en urgence, montre un malade aplasique, des globules blancs à 1400 et des plaquettes à 72000. Maintien du traitement antibiotique avec adjonction d'un traitement anti-mitotique.

Le 31-12-2018, une FNS de contrôle montre, GB : 38.6.10⁹/l, GR:3.9.10¹²/g/l, Hb: 9.9 g/l, plaquettes: 215 10⁹/l.

DISCUSSION

S. paucimobilis autrefois appelé *Pseudomonas paucimobilis* a été isolé pour la première fois par Holmes et al. en 1977 [1]. Renommé en 1990 par Yabuuchi et al. Sous le nom de *S. paucimobilis* [2]. *S. paucimobilis* est un bacille à Gram négatif, pigmenté jaune, ne fermentant pas le glucose, aérobic strict, oxydase positive [3]. Le genre compte actuellement 3 espèces et plus de 30 sous-espèces [5,6]. Son habitat le sol, l'eau potable et les plantes. Il a été isolé à partir d'une grande variété d'échantillons cliniques, sang, urine, expectorations et liquide céphalo-rachidien [13].

En milieu hospitalier, comme dans la présente étude, *S. paucimobilis* pourrait provenir de dispositifs mécaniques tels que les cathéters à demeure, solutés intraveineux stériles ou d'un environnement hospitalier contaminé comme l'eau

de robinet, eau distillée, nébuliseurs, et les dispositifs d'hémodialyse [14,15]. En comparaison avec *Pseudomonas* spp., *S. paucimobilis* est un agent pathogène opportuniste causant rarement une infection chez l'homme en raison de sa faible virulence liée à la composition de sa structure pariétale. Il possède un seul et unique sphingoglycolipide, absence totale du constituant principal de la paroi, déterminant de l'activité endotoxique et de la virulence, le lipopolysaccharide (LPS). Ce qui pourrait expliquer sa faible virulence de [16,17]. La majorité des infections à *S. paucimobilis* sont associées à diverses comorbidités et immunodéficiences. Des infections graves à *P. paucimobilis* ont été rapportées dans la littérature chez des patients ayant des maladies sous-jacentes, telles qu'une insuffisance rénale chronique, une tumeur maligne, une maladie pulmonaire obstructive chronique, un alcoolisme dépendant, une cirrhose du foie, [16,18]. Aucun facteur prédisposant à l'infection n'a été trouvé [16,19]. Comme il n'est pas toujours possible de déterminer la source de l'infection [16]. De plus en plus d'infections ont été rapportées chez des patients immunocompétents [20-21]. Dans une étude qui a porté sur 16 patients ayant une infection à *S. paucimobilis*, l'âge moyen était de 48.5 ans, 57% avait une néoplasie, 40% avaient des antécédents d'immunodépression et 11.9% ayant un diabète comme maladie sous-jacente [16]. Dans la même étude l'origine de bactériémie nosocomiale était retrouvée 69%. Les souches isolées étaient généralement sensibles à l'association bêta-lactamines/inhibiteurs de bêta-lactamases, carbapénèmes et fluoroquinolones [16]. *S. paucimobilis* est généralement sensible aux carbapénèmes, aux aminosides, au triméthoprim sulfaméthoxazole et à la pipéracilline / tazobactam et aux résistants aux pénicillines et aux céphalosporines de première génération. Sa résistance aux pénicillines et aux céphalosporines de première génération est due à la production de bêta-lactamase codée chromosomiquement [22]. Dans la présente étude, le patient était admis pour un néphroblastome, la bactériémie s'est déclarée dans le service. Aucune source de contamination n'a été détectée.

Conclusion :

S. paucimobilis est un germe de l'environnement naturel, isolé parfois en milieu hospitalier, bactéries rarement nosocomiale. Il peut être à l'origine d'infections graves particulièrement chez les patients atteints d'immunodépression. Vu quelquefois la multirésistance aux antibiotiques, le traitement devrait être conduit en fonction des données de l'antibiogramme

Références:

1-. Krziwon C, Zahringer U, Kawahara K, Weidemann B, Kusumoto S, Rietschel ET, Flad

HD, Ulmer AJ. Glycosphingolipids from *Sphingomonas paucimobilis* induce monokine production in human mononuclear cells. Infect Immun 1995 ;63:2899-2905

2- Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T, Yamamoto H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. Microbiol Immunol. 1990 ;34:99-119.

3- Reina J, Bassa A, Llompart I, Portela D, Borrell N. Infections with *Pseudomonas paucimobilis*: report of four cases and review. Rev Infect Dis 1991 ;13:1072-1076.

4- Peel MM, Davis JM, Armstrong WL, Wilson JR, Holmes B. *Pseudomonas paucimobilis* from a leg ulcer on a Japanese seaman. J Clin Microbiol. 1979 ;9:561-564.

5- Ryan MP, Adley CC. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. J Hosp Infect. 2010;75(3):153-7.

6- Angelakis E, Roux V, Raoult D. *Sphingomonas mucosissima* Bacteremia in Patient with Sickle Cell Disease. Emerg Infect Dis. 2009;15(1):133-4.

7- Morrison AJ, Jr., Shulman JA. Community-acquired bloodstream infection caused by *Pseudomonas paucimobilis*: case report and review of the literature. J Clin Microbiol. 1986 ;24:853-855.

8- Kawahara K, Matsuura M, Danbara H. Chemical structure and biological activity of lipooligosaccharide isolated from *Sphingomonas paucimobilis*, a Gram-negative bacterium lacking usual lipopolysaccharide. Jpn J Med Sci Biol. 1990;43(6):250.

9- Krziwon C, Zahringer U, Kawahara K, Weidemann B, Kusumoto S, Rietschel ET, Flad HD, Ulmer AJ. Glycosphingolipids from *Sphingomonas paucimobilis* induce monokine production in human mononuclear cells. Infect Immun 1995 ;63:2899-2905.

10-. Yim M-S, Yau YC, Matlow A, So JS, Zou J, Flemming CA, Schraft H, Leung KT. A novel selective growth medium-PCR assay to isolate and detect *Sphingomonas* in environmental samples. J Microbiol Methods. 2010;82:19-27.

- 11- Casadevall A, Freundlich LF, Pirofski L. Septic shock caused by *Pseudomonas paucimobilis*. Clin Infect Dis. 1992 ;14:784.
- 12- Maragakis LL, Chaiwarith R, Srinivasan A, Torriani FJ, Avdic E, Lee A, et al. *Sphingomonas paucimobilis* bloodstream infections associated with contaminated intravenous fentanyl. Emerg Infect Dis.. 2009;15(1):12-8.
- 13- Pratama N. Lugito H., Wangsih C., and Kurniawan A. A Lethal Case of *Sphingomonas paucimobilis* Bacteremia in an Immunocompromised Patient Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Infectious Diseases Volume 2016, Article ID 3294639, 4 pages
- 14- Holmes B., R. Owen J., Evans A., Malnick H., and Wilcox W.R., "Pseudomonas paucimobilis, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources," *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 27, no. 2, pp. 133–146, 1977.
- 15- Toh H.S, Tay H.T, Kuar W.K, Weng T.C, Tang H.J, and Tan C.-K, "Risk factors associated with *Sphingomonas paucimobilis* infection," *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 44, no. 4, pp. 289–295, 2011.
- 16- Lin J.-N., Lai C.-H., Chen Y.-H. et al., "Sphingomonas paucimobilis bacteremia in humans: 16 case reports and a literature review," *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 43, no. 1, pp. 35–42, 2010
- 17- Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, et al. Nosocomial infections caused by *Sphingomonas paucimobilis*: clinical features and microbiological characteristic. Clin Infect Dis 1998; 26: 676-81.
- 18-Perola O, Nousiainen T, Suomalainen S, et al. Recurrent *Sphingomonas paucimobilis*-bacteraemia associated with a multi-bacterial water-borne epidemic among neutropenic patients. J Hosp Infect 2002; 50: 196-201.
- 19- Balkwill DL, Frederikson JK, Romine MF : *Sphingomonas* and related genera in Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrand R (eds) : The Prokaryotes : An Electronic Revolving Resource for the Microbiological Community, 3rd ed. New York : Springer Verlag, 2006, pp605-629.
- 20- R. Pascale, Russo E., Esposito I., Leone S., and Esposito S., "Sphingomonas paucimobilis osteomyelitis in an immunocompetent patient: a rare case report and literature review," *New Microbiologica*, vol. 36, no. 4, pp. 423–426, 2013.
- 21- Souto A., Guinda M., Mera A., and Pardo F., "Artritis séptica por *Sphingomonas paucimobilis* en un paciente inmunocompetente," *Reumatología Clínica*, vol. 8, no. 6, pp. 378–379, 2012.
- 22- Corkill J.E, Hart,A.G .McLennan C.A., and Aspinall S., "Characterization of a β -lactamase produced by *Pseudomonas paucimobilis*," *Journal of General Microbiology*, vol. 137, no. 6, pp. 1425–1429, 1991.

Conflits d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Diagnostic au laboratoire des méningites purulentes communautaires

Microbiologie clinique
MISE AU POINT



Par Docteur Chabane Nabila, Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-Batna
Mail : dr.chabamicrobio@gmail.com

Résumé : Les méningites purulentes constituent un problème de santé publique à l'échelle mondiale et notamment dans les pays en voie de développement. C'est une urgence diagnostique et thérapeutique car grevée d'une mortalité élevée et de séquelles neurosensorielles en dépit d'une prise en charge adéquate. *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* sont les principaux germes responsables de méningites communautaires, ils sont isolés à partir du LCR ou hémoculture. La gravité de telles infections conduit à rappeler, outre les critères diagnostiques, les stratégies curatives antibiotiques complétées par les mesures préventives de chimioprophylaxie et de vaccination.

Mots clés : méningites purulentes, méningocoque, urgence diagnostique, LCR, chimioprophylaxie et vaccination.

Introduction :

Les méningites purulentes sont d'origine bactérienne et sont responsables de la majorité des décès ou des séquelles neurologiques. Elles sont dues à l'envahissement du liquide céphalo rachidien (LCR) par une bactérie qui s'y développe.

Selon l'OMS, l'incidence mondiale des méningites purulentes communautaires est d'environ 1 million par an dont 2/3 des cas touchent les enfants de moins de 5 ans. L'incidence est plus forte dans les pays en voie de développement ($\geq 10/100\ 000$) avec une forte mortalité. Dans les pays industrialisés, l'incidence varie de 0,7 à 3 /100 000.

Les méningites bactériennes de l'enfant sont dans tous les cas, une urgence thérapeutique impliquant la suspicion clinique précoce d'un diagnostic qui doit être confirmé par l'examen du LCR. Si le diagnostic de méningite est initialement envisagé sur des arguments cliniques, l'élément décisif pour affirmer une méningite repose sur l'examen du LCR. Il s'agit toujours d'un examen d'urgence à traiter le plus rapidement possible. Selon l'Institut National de Veille Sanitaire, l'incidence en France en 2006 était de 2,23/100 000 habitants.

Alors que nous disposons d'antibiotiques efficaces pour traiter ces infections, le taux de mortalité reste élevé. En fait, le pronostic de ces méningites dépend de la précocité du traitement des malades.

Physiopathologie

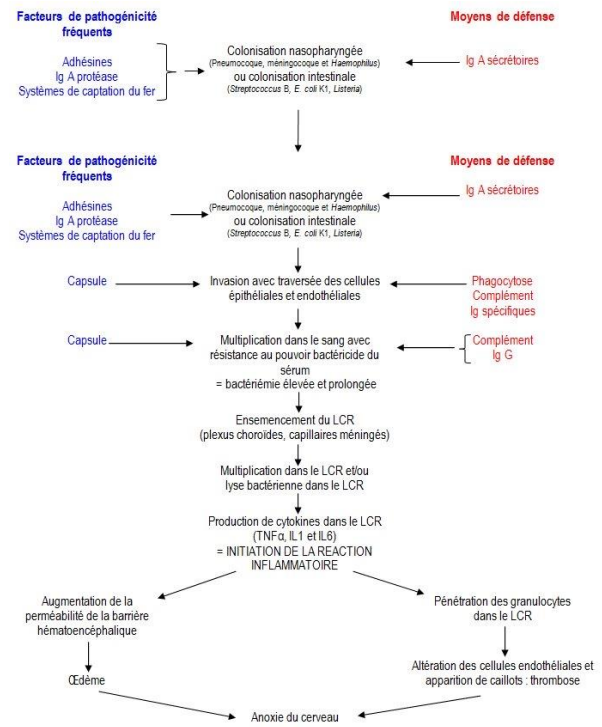


Tableau clinique :

Chez l'adulte et l'enfant de plus de 1 an, les signes cliniques sont souvent caractéristiques : maux de tête, photophobie, vomissements, fièvre à 39-40°C, le médecin décèle une raideur de la nuque.

Chez le nourrisson, le diagnostic clinique est le plus souvent difficile. Les vomissements sont toujours observés (mais un nourrisson vomit souvent et pour beaucoup d'autres causes), il est difficile au médecin d'apprécier la raideur de la nuque. Le signe le plus évocateur est la convulsion fébrile.

Chez le nouveau-né, les signes cliniques ne sont pas du tout spécifique.

Une méningo-encéphalite se traduit par des signes de dysfonctionnement du système nerveux central associant :

- des troubles de conscience allant de simples troubles de vigilance au coma profond ;
- des crises convulsives ;
- des signes de focalisation : mono ou hémiparésie, paralysie des nerfs crâniens, mouvements anormaux ;
- des troubles du comportement et du langage ;
- des troubles neurovégétatifs : irrégularité du pouls, de la PA, de la température.

Dans tous les cas l'analyse du LCR est nécessaire pour confirmer ou infirmer le diagnostic de méningite et méningo-encéphalite ainsi que pour donner les indications utiles au traitement

Etiologies :

Méningites communautaires :

Age	Espèces
Adultes et enfants de plus de 05 ans	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
Nourrisson (>3mois) et enfants (<5ans)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib)
Nouveau né	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> K1 <i>Listeria monocytogenes</i>

Diagnostic au laboratoire :

L'analyse du LCR est une urgence

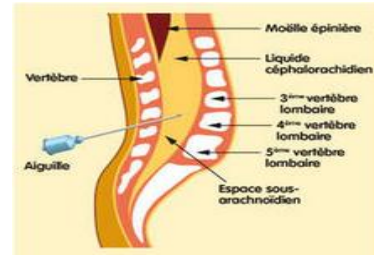
La méningite reste toujours une maladie d'actualité. Le caractère foudroyant de cette maladie fait que le taux de mortalité ne diminue pas. Pourtant la presque totalité des germes responsables de méningites purulentes sont très sensibles aux « nouveaux antibiotiques ».

Pour réduire ce taux de mortalité, il faut accélérer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des méningites.

C'est pourquoi, l'examen d'un LCR au laboratoire est un examen urgent.

Prélèvement et transport du LCR

Le LCR est prélevé, idéalement avant toute antibiothérapie, par ponction lombaire, après une aseptie rigoureuse de la peau, entre les vertèbres lombaires L3-L4 ou L4-L5 ou L5-S1.



Exceptionnellement, chez le nouveau-né, le prélèvement peut se faire par ponction tranfontanellaire ou par ponction ventriculaire directe

On le recueille dans un minimum de 3 tubes stériles numérotés 1, 2 et 3.

Le volume total doit être compris entre 2 à 5 mL. Prévoir 1 à 2 mL supplémentaire en cas de recherche complémentaire comme celle des mycobactéries.

- le tube 1 pour l'analyse biochimique ;
- le tube 2 pour l'analyse cytologique ;
- enfin le tube 3 pour la mise en culture.

L'analyse biologique du liquide céphalo-rachidien comporte trois étapes :

- l'examen direct avec l'étude cytologique et la coloration de Gram pour la recherche des bactéries ;
- la mise en culture suivie le lendemain de l'identification et de l'antibiogramme du micro-organisme isolé ;
- l'examen biochimique : dosage des protéines, du glucose et des chlorures.

L'indication d'une PL est posée dans différents contextes :

- Syndrome méningé
- En cas d'infection materno-foetale, pour éliminer toute atteinte méningée secondaire
- Une PL de contrôle est parfois recommandée 36 à 48 heures après le début de l'antibiothérapie, pour vérifier l'efficacité du traitement antibiotique, un retard de stérilisation du LCR étant associée la survenue de séquelles neurologiques. C'est le cas notamment des méningites à pneumocoques de sensibilité diminuée aux β -lactamines, et des méningites néonatales.

Autres prélèvements :

-En cas de suspicion de méningite bactérienne, on doit pratiquer, en plus du prélèvement de LCR, systématiquement des hémocultures.

-Enfin, les prélèvements réalisés au niveau des lésions purpuriques avec culture et recherche génomique sont recommandés. De plus, un prélèvement de sérum peut être utile pour les recherches génomiques en parallèle de celles pratiquées sur LCR.

-De même, d'autres prélèvements peuvent être utiles : prélèvements périphériques voire maternels pour les nouveau nés ou au niveau de portes d'entrée éventuelles.

Examen macroscopique

Étant donné que le diagnostic de la méningite est urgent, cet examen macroscopique est souvent capital. En effet, l'observation d'un LCR trouble suffit pour diagnostiquer une méningite.

-La première étape de l'analyse consiste à noter l'aspect macroscopique du liquide.

Après homogénéisation par une légère agitation, on note le degré de limpidité du liquide et sa coloration.

Liquide clair

On les décrit en général comme « eau de roche ». Lorsque le LCR est clair, il existe 2 possibilités :

- soit il est normal
- soit c'est une méningite à liquide clair ; les agents étiologiques sont très variés :
 - *Listeria monocytogenes* ;
 - mycobactéries tuberculeuses (le plus souvent *Mycobacterium tuberculosis* = bacille de Koch ou BK) ;
 - virus ;
 - *Cryptococcus neoformans* ;
 - *Treponema pallidum* (méningite syphilitique) ;
 - *Leptospira interrogans* ;
- la maladie de Lyme : elle survient quelques semaines ou quelques mois après une piqûre infestante de tiques (inoculant *Borrelia burgdorferi*).

Le LCR lors d'une méningite bactérienne décapitée par un traitement antibiotique peut aussi être clair.

Notons enfin que le LCR est clair lors de méningites non infectieuses comme les méningites néoplasiques et les méningites médicamenteuses.

- **Un liquide trouble** ou franchement purulent (eau de riz) correspond à une réaction leucocytaire marquée. Un liquide trouble est toujours pathologique et signe, dans la plupart des cas, une méningite d'étiologie bactérienne et d'évolution aiguë. Son observation par le celui qui pratique la ponction est donc très importante car elle implique l'instauration immédiate d'un traitement antibiotique probabiliste sans attendre les résultats de l'antibiogramme. Dans le cas de méningites communautaires, un traitement anti-inflammatoire avec des corticoïdes l'accompagne afin de réduire les risques de mortalité et la fréquence des séquelles auditives et neuromotrices.
- **Un Liquide jaune citrin = xanthochromiques**
La coloration jaune du liquide céphalo-rachidien s'explique par la transformation de l'hémoglobine en pigments hématogènes au cours d'une hémorragie méningée.
- En cas de **piqûre d'un vaisseau** au cours de la ponction, on note une coloration rouge du liquide,

plus marquée dans le premier tube que dans le dernier, avec souvent formation d'un petit caillot.

Liquide hémorragique

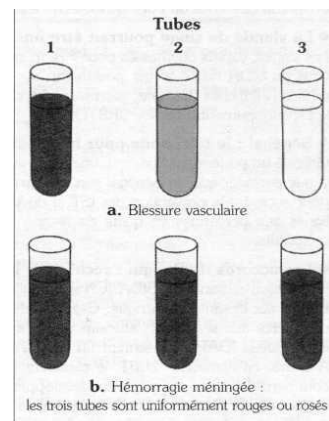
Deux causes sont possibles :

- une hémorragie méningée accompagnant ou pas une méningite bactérienne ;
- ou bien une rupture d'un vaisseau au cours du prélèvement.

Pour distinguer ces deux possibilités, on peut :

- prélever le LCR dans 3 tubes différents. Seul le premier tube (voire le second) est sanglant dans le cas de la rupture d'un vaisseau au cours du prélèvement
- ou alors centrifuger le LCR : le surnageant est xanthochromique dans le cas d'une hémorragie méningée.

Enfin la cytologie et l'analyse biochimique du LCR permettent de distinguer une hémorragie méningée compliquant une méningite bactérienne, d'une hémorragie méningée sans méningite.



Paramètres biochimiques utiles au diagnostic

Le diagnostic positif d'une méningite repose sur la numération des leucocytes et sur la protéinorachie qui sont anormalement élevées. La glycorachie peut être basse ou normale. La glycorachie doit toujours être déterminée simultanément à la glycémie, une glycorachie normale étant égale aux deux tiers de la glycémie. Une hypoglycorachie est généralement associée à une méningite bactérienne.

Des analyses biochimiques du LCR et du sérum sont utiles pour orienter le diagnostic.

Examen biochimique du LCR

- glycorachie (dosage du glucose) ;
- protéinorachie (dosage des protéines) ;
- dosage du lactate ;
- dosage de l'interféron alpha.

Examen biochimique du sérum

- glycémie
- dosage de la procalcitonine ;
- dosage de la CRP

Rapport glycorachie/glycémie

La glycorachie doit toujours être exprimée en fonction de la glycémie. Une glycorachie normale est égale à 65% de la glycémie.

Une hypoglycorachie oriente vers une méningite bactérienne.

L'hypoglycorachie s'explique par la réduction du transfert du glucose à travers la barrière hémato-méningée, et la consommation de glucose par la réaction inflammatoire.

Remarque : Ainsi, dans le cas de LCR clair, la glycorachie aide à distinguer les étiologies tuberculeuses et virales (elle est inférieure à 40% de la glycémie pour les méningites tuberculeuses et est supérieure à 50% de la glycémie lors de méningite virale). Ce critère à lui seul ne suffit pas car certaines méningites virales s'accompagnent d'une hypoglycorachie.

Elle permet aussi de suivre l'évolution d'une méningite : la glycorachie est le premier paramètre à se normaliser. Une persistance de l'hypoglycorachie est de mauvais pronostic.

Protéinorachie

Les valeurs normales de la protéinorachie se situent entre 0,10 et 0,45 g/L (la protéinorachie du nouveau-né et du nourrisson de moins de 2 mois est cependant plus élevée). Une protéinorachie très élevée oriente vers une méningite bactérienne. Elle varie de 1 à 5 g/L lors de méningites purulentes.

La protéinorachie peut aussi être légèrement augmentée lors de méningite virale, sans dépasser 1,5 g/L.

L'hyperprotéinorachie peut persister 2 à 3 semaines après le début du traitement.

Dosage du lactate dans le LCR

Le lactate est le témoin d'un métabolisme anaérobie. Pendant, un temps abandonné, une étude récente lui redonne de l'intérêt.

On constate en effet que lors de méningite bactérienne la concentration en lactate dans le LCR est toujours supérieure à 3,2 mmol/L.

Dosage de l'interféron alpha dans le LCR

L'interféron alpha, cytokine de l'immunité innée produite seulement en présence de virus, est utilisé comme marqueur précoce des méningo-encéphalites virales.

Dosage de la procalcitonine et de la CRP dans le sérum

La **procalcitonine** est une protéine inflammatoire sécrétée par la thyroïde et dont la concentration sérique augmente très rapidement à la suite d'une agression bactérienne. Ce marqueur permet de distinguer rapidement les méningites virales des méningites bactériennes.

Au-delà d'un seuil de 0,5 ng/mL, la méningite est considérée bactérienne avec une sensibilité de 99% et une spécificité de 83%.

La **CRP** (protéine C réactive) est une protéine de l'inflammation sécrétée par le foie. Elle a été la

première utilisée pour différencier les méningites bactériennes des méningites virales mais ce marqueur biologique est, à la fois, moins sensible et moins spécifique que la procalcitonine sérique. Valeur normale < 0,5 mg/L

Orientation cytologique et biochimique du diagnostic

En fonction des résultats des examens macroscopique, cytologique et biochimique du LCR, on distingue classiquement cinq grandes catégories : LCR normal, LCR purulent, LCR lymphocytaire, LCR « panaché » et LCR hémorragique sans méningite.

¹Panaché = granulocytes et lymphocytes en proportions proches.

² Les méningites à entérovirus se traduisent par un LCR clair avec une majorité de granulocytes.

³ Autres étiologies de LCR lymphocytaire :

- *Cryptococcus neoformans* avec glycorachie normale ou abaissée.
- Brucellose, Maladie de Lyme, Leptospirose, Syphilis avec glycorachie normale

LCR NORMAL

Leucocytes: <3-5/mm³
Protéinorachie: <0.10-0.45 g/l
Glycorachie : >50% de la glycémie

-

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

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

LCR en faveur Méningite Bactérienne

Leucocytes : >1000 /mm³
Formule : prédominance de polynucléaires
Protéinorachie : très élevée
Glycorachie : <50 % de la glycémie

-Les valeurs normales de la protéinorachie peuvent être plus élevées en période néonatale jusqu'à 2 mois. Lors de méningites purulentes, la protéinorachie varie entre **1 et 5 g/l**, et peut persister 2 à 3 semaines après le début de la méningite. Au cours du traitement, la protéinorachie est plus longue à se normaliser que la glycorachie ou la réaction cellulaire.

Examen microscopique :

La **numération en cellule de Nageotte** ou de **Malassez** permet d'évaluer le nombre d'éléments nucléés et d'hématies par mm³. En dehors de la période néonatale, le LCR à une cellularité comprise entre 3 et 5 éléments/mm³. En fonction de l'âge et au-delà de 10 éléments/mm³, la formule

leucocytaire est établie après cyto centrifugation et **coloration au May-Grünwald-Giemsa**. Elle n'est interprétable qu'à partir de 10 éléments/mm³ à partir d'une concentration bactérienne de 10⁴ UFC/ml.

1. Numération des éléments

Après homogénéisation du liquide céphalorachidien, la numération des leucocytes et des hématies est effectuée en cellule de Nagotte ou de Malassez (*figure n° 1*).

La cellule de Malassez contient 1 mm³. Elle est divisée en dix bandes de 1/10 mm³. Chaque bande est divisée en dix rectangles de 1/100 de mm³ (quadrillés ou non).

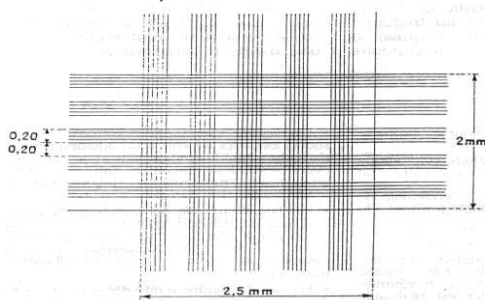


Figure n° 1. Cellule de Malassez
Longueur : 2,5 mm
Largeur : 2 mm
Hauteur : 0,2 mm
Volume : 1 mm³
Une bande : 0,1 mm³
Un rectangle : 0,01 mm³

- Recouvrir la cellule d'une lamelle (en la faisant adhérer avec un peu de salive déposée avec le doigt).
- S'assurer que la platine du microscope est horizontale et attendre quelques minutes pour permettre aux éléments de sédimenter.
- Compter les leucocytes et les hématies :

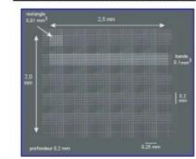
selon leur abondance, compter soit toute la cellule, soit plusieurs bandes, soit plusieurs rectangles. Faire la moyenne. Calculer et rendre les résultats par mm³. Pour faciliter l'examen, on peut ajouter une trace de colorant (solution de bleu de méthylène) à quelques gouttes du liquide céphalorachidien.

En cas de liquide hémorragique, il peut être difficile de différencier les hématies et les éléments. Compter alors l'ensemble, puis dans un petit tube ajouter à 9 gouttes de liquide céphalorachidien, 1 goutte d'acide acétique au 1/10^e. Attendre quelques minutes que les hématies soient lysées, puis compter à nouveau l'ensemble des éléments visibles. Ajouter 10% à cette valeur pour tenir compte de la goutte d'acide acétique. La quantité de leucocytes sera obtenue par soustraction des deux valeurs des dénombrements.

Un liquide normal contient moins de cinq éléments par mm³.

Un syndrome méningé avec un liquide clair, voire normal, ne permet pas d'exclure une méningite bactérienne. Si la suspicion clinique reste forte, une seconde ponction lombaire doit être effectuée dans un délai de douze à vingt-quatre heures.

PRINCIPE DE COMPTAGE



La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont :
Longueur = 0,25 mm
Largeur = 0,20 mm
Profondeur = 0,20 mm
Le volume total de la cellule est de 1 mm³ (2,5 x 2 x 0,20)



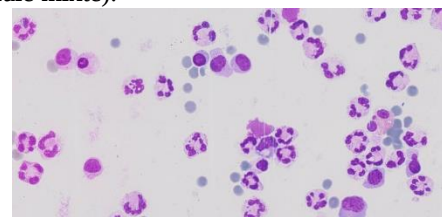
2. Examen qualitatif des éléments :

Il doit être fait dès que le nombre de cellules dépasse dix par mm³. Centrifuger le liquide céphalorachidien à 5 000 tours/mn pendant cinq à dix minutes dans un tube conique stérile.

Décantier le surnageant (dans un récipient contenant de l'eau de Javel). Maintenir le tube incliné à 45°, la partie effilée dirigée vers le haut. Introduire une effilure de pipette Pasteur au contact du culot : celui-ci monte spontanément par capillarité. Le répartir sur deux lames à raison d'une goutte par lame (*figure n° 2*). Étaler de façon à ne pas disperser les éléments. Dans le cas d'un culot important, étaler en couche mince, dans le cas contraire, concentrer l'échantillon sur une petite surface. Laisser sécher. Colorer la première lame avec du bleu de méthylène (*tableau n°2*), ou du colorant de May Grünwald Giemsa. Etablir une formule en pourcentages respectifs des polynucléaires, des lymphocytes et des monocytes (compter au moins 100 éléments).

Les liquides clairs contiennent en général une majorité de lymphocytes, alors que les liquides troubles sont le plus souvent à prédominance de polynucléaires. On trouve :

Dans le cas des liquides troubles, on observe une forte majorité de granulocytes (80 à 100%) sauf dans les méningites à *Listeria* pour lesquelles les 3 types de cytologies sont observées (prédominance de granulocytes, prédominance de lymphocytes, formule mixte).



Dans le cas des méningites à liquides clairs, une prédominance de lymphocytes oriente vers une méningite tuberculeuse et une méningite virale.

Remarque : une formule présentant plus de 10% granulocytes éosinophiles dans le LCR s'observe lors d'helminthiases (*Angiostrongylus cantonensis*, *Gnathostoma spinigerum*,...), de leucémies ou à la suite de traitements médicamenteux.

Il faut noter que dans les premières heures d'une méningite purulente, on peut observer une prédominance lymphocytaire ou une formule mixte

et à l'inverse, au début des méningites virales, une majorité de polynucléaires. L'analyse du LCR normal et en cas de méningite purulente est représenté dans le tableau ci-dessous :

	LCR normal	LCR purulent	LCR lymphocytaire	LCR « panaché » ¹	LCR hémorragique et méningite
Aspect	clair, eau de roche	trouble	clair trouble	clair trouble	trouble rosé ou sanglé
Leucocytes/mm ³	< 5 (10 à 30 chez le nouveau-né)	> 200	100 à 500	> 100	comme dans le sang ± environ 1 leucocyte pour 1 hémocyte
Formule leucocytaire	majorité de lymphocytes	majorité de granulocytes	majorité de lymphocytes	généralement panaché ²	identique à la formule sanguine
Protéiorachie	0,15 à 0,45 g/L	augmentée	augmentée	Normale ou peu augmentée	environ 0,01 g/L pour 1 hémocyte/mm ³
Glycorachie/glycémie	2/3 de la glycémie	bas	bas	normal	normal ou bas
Interféron alpha (LCR)	normal	?		augmenté	normal
Procalcitonine sérique		augmentée			augmentée
Orientations	pas de signe d'infection	Méningite bactérienne purulente	méningite tuberculeuse ³	méningite virale ⁴	méningite à <i>Listeria</i> méningite débilitante pandémie traumatique (éclatement sur 3 l ou hémorragie méning)

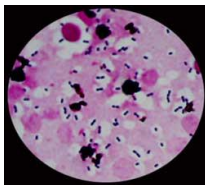
3. Examen bactériologique :

Coloration de Gram

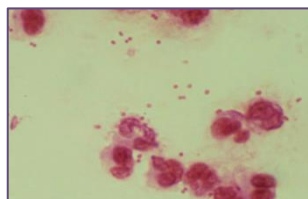
La deuxième lame est utilisée pour la coloration de Gram. Les bactéries sont généralement peu nombreuses, leur forme et la façon dont elles sont groupées, leur situation à l'intérieur ou à l'extérieur des polynucléaires et leur affinité pour les colorants permettent avec l'habitude de faire une identification présomptive. Même si cela n'est pas le cas, il est important de pouvoir répondre :

- s'il y a présence ou absence de bactéries visibles,
- s'il s'agit de cocci à Gram positif, de cocci à Gram négatif, de bacilles à Gram négatif, de bacilles à Gram positif.

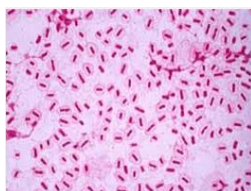
Il existe également des méningites à levures non capsulées (*Candida*), ou capsulées (*Cryptococcus neoformans*). Ces dernières sont recherchées dans le culot de centrifugation avec de l'encre de Chine : leur taille varie de 5 à 30 micro grammes. La présence de la capsule se traduit par un halo clair autour de la levure, limité à la périphérie par l'encre de Chine.



Streptococcus pneumoniae (cocci Gram + en flamme de bougie)



Neisseria meningitidis (cocci Gram - en grains de café)



Haemophilus influenzae (Bacille à Gram négatif, capsulé, très polymorphe, en courtes chainettes)

Mise en culture

Milieux ensemencés systématiquement, quel que soit l'aspect du LCR et sa concentration en leucocytes

On ensemence des milieux permettant la croissance des bactéries exigeantes responsables de méningites purulentes.

- Le milieu polyvalent ensemencé est la gélose chocolat enrichie. On l'incube à 35°C sous une atmosphère de 5 à 10% de CO₂.
- Une gélose au sang permettra de repérer plus facilement *Streptococcus pneumoniae*. On l'incube à 35°C sous une atmosphère de 5 à 10% de CO₂.
- Un bouillon type cœur-cerveille permet de cultiver les bactéries en diluant les éventuels antibiotiques présents dans le LCR (l'idéal étant cependant un flacon d'hémoculture avec des produits adsorbants les antibiotiques), incubé à 35°C.

Si le volume de LCR est suffisant, on peut ensemencer une gélose BCP pour faciliter l'orientation de l'identification du germe.

On prendra de soin de préchauffer les milieux à 37°C. En effet certains germes comme le méningocoque sont très sensibles au refroidissement.

La technique d'ensemencement peut tenir compte de la présence ou pas de germes à l'examen microscopique :

- isolement classique après avoir déposé 1 goutte si l'examen microscopique est positif.
- ensemencement par étalement avec un ensemenceur-râteau de 5 à 10 gouttes de liquide non centrifugé en cas d'examen microscopique négatif. L'étalement se fait à la pipette râteau.

Ensuite placer les milieux immédiatement à l'étuve. On observe les milieux après 18h et 48h d'incubation à 35°C et on les laisse à l'étuve au moins 5 jours si absence de culture (au moins 15 jours si suspicion de *Brucella*).

Milieux ensemencés selon les circonstances

- la gélose Sabouraud incubée pendant 1 mois à 35°C si le sujet est immunodéprimé ;
- des milieux pour mycobactéries si le LCR présente une prédominance de lymphocytes (on ensemence ce milieu avec le culot de centrifugation) ;
- un milieu pour bactéries anaérobies strictes (gélose Schaedler + vit K3 + sang de mouton) incubée à 37°C en anaérobiose dans le cas de méningites nosocomiales ;
- le bouillon EMJH pour la recherche des leptospires, incubé à 30° durant 2 mois.

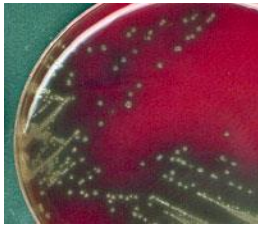
Compte-tenu de l'urgence de l'analyse, on

peut reprocher à la culture sa lenteur mais elle reste une méthode très sensible et permet de réaliser l'antibiogramme de l'agent pathogène.

Elle peut être négative dans le cas de l'administration préalable, souvent justifiée, d'un traitement antibiotique à large spectre. On parle de méningite décapitée.

Aspects en culture :

Pneumocoque : transparentes, ombiliquées, lisses pour les pneumocoques virulents capsulés, avec verdissement du milieu sur GSF (Hémolyse α)

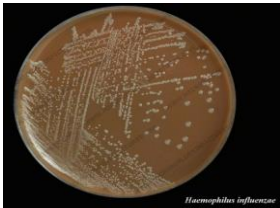


Méningocoque : colonies lisses, brillantes de 1-1,5



mm, parfois muqueuses, à bords réguliers, grisâtre sur

Haemophilus influenzae : colonies lisses, légèrement convexes de 1-1,5 mm, à bords réguliers souvent, incolores à chamois, ou brillantes et irisées sur GSC



Identification biochimique et antigéniques des bactéries responsables de méningites purulentes

1-Neisseria méningitidis :

Principaux caractères biochimiques sont :

Oxydase +, acidification du glucose, maltose, lactose, lévulose, saccharose, ONPG +, GGT +.

b- L'identification antigénique à plusieurs intérêts diagnostique, épidémiologique, prophylactique. Il existe plusieurs sérogroupes qui sont définis par les différences d'immuno spécificité des polysides de la capsule bactérienne on a décrit 12 sérogroupes (A,C,B,X ; Y ; Z,29^E ; W135 ; H,I,K,L), les plus fréquents en Algérie sont les **sérogroupe A et C**

Les sérogroupes peuvent être mis en évidence par une simple agglutination sur lame en verre.



2-streptococcus pneumoniae :-Les colonies du pneumocoque sont lysées par la bile car cette dernière active les autolysines de la bactérie ; en plus de la catalase qui est négative

-Test à l'optochine sensible avec un diamètre Diamètre ≥ 15 mm



-agglutination avec les sérums polyvalents antipneumococcique

3-Haemophilus influenzae de type b(Hib) :

-Fermentation du glucose, saccharose, et xylose

- Exigence en facteur de croissance V (NAD) qui est révélée par le test de **sattelitisme** en facteur X (hémine), Uréase (+),



- Les tests biochimiques d'identification d'espèce du Hib peuvent être pratiqués en galerie miniaturisée API NH qui donne un résultat en deux heures



Exigence en facteurs V et X

-Identification antigénique :

-la mise en évidence des antigènes capsulaires a mis en évidence 6 sérotypes a,b,c,d,e et f ; elle se fait par agglutination avec des particules de latex

sensibilisées par l'antisérum spécifique, le **sérotype b** est le plus fréquent.

4-*Listeria monocytogene* : catalase (+), oxydase (-), esculine (+), immobile à 37°, mobile à 22-25°.

Test de diagnostic rapide :

1-Détection d'antigènes bactériens par agglutination : Recherche des antigènes solubles

Les antigènes solubles ou exo-antigènes sont des antigènes bactériens de surface (capsule, couche externe de la paroi), de nature généralement osidique, qui se détachent de la bactérie et se trouvent libres dans les liquides biologiques. Leur mise en évidence par des méthodes immunologiques permet l'identification présomptive du germe.

Cette méthode présente de nombreux intérêts :

- gain de temps dans l'identification de l'agent causal ;
- identification présomptive de l'agent causal alors que les cultures sont restées négatives (par exemple si le sujet a été traité aux antibiotiques avant le prélèvement ou si les conditions de transport ou de culture n'ont pas été respectées) ;
- elle permet de rectifier une orientation diagnostique face à un examen microscopique montrant des bactéries présentant une morphologie et/ou une coloration déroutantes.

Quels que soient les résultats, la mise en culture dans les milieux précédemment cités est indispensable.

Cette recherche manque cependant de sensibilité, en effet elle est rarement positive en cas d'examen microscopique négatif.

Deux méthodes sont principalement pratiquées :

- l'agglutination de particules de latex sensibilisées ;
- la recherche d'antigènes solubles de *Streptococcus pneumoniae* par immunochromatographie.

a-Agglutination de particules de latex sensibilisées

On utilise des particules de latex sensibilisées avec les anticorps spécifiques des antigènes solubles susceptibles d'être rencontrés dans un LCR.

Ainsi il existe des latex permettant de repérer les antigènes solubles de :

- *Streptococcus pneumoniae* ;
- *Haemophilus influenzae* b ;
- *N. meningitidis* avec 4 latex différents : sérotype A, sérotype B / *E. coli* K1 (communauté antigénique), sérotype C et enfin sérotype Y/W₁₃₅ ;
- *Streptococcus agalactiae* (streptocoque B)

On chauffe préalablement le LCR à 80°-100°C pendant 5 min, puis centrifugé 10 min à 2000 t/min (la sensibilité est 5 fois plus grande si l'échantillon est d'abord traité aux ultrasons).

Ensuite on mélange, sur une lame de verre, une goutte de surnageant avec une goutte de chaque suspension de particules de latex. L'apparition, en moins de deux minutes, d'une agglutination dans l'un des réactifs permet de donner le résultat.

Un témoin positif permet de vérifier périodiquement l'activité des latex sensibilisés.

b- Recherche d'antigènes solubles de *Streptococcus pneumoniae* par immunochromatographie

Le test BinaxNOW® *S.pneumoniae* permettant de rechercher le polysaccharide C de la paroi du pneumocoque présente beaucoup d'intérêt pour le diagnostic rapide des méningites à *Streptococcus pneumoniae*.

Sa sensibilité est de 95% et sa spécificité de 100%. Cette méthode est plus sensible que l'agglutination de particules de latex sensibilisées



Ce test se pratique sur LCR est indiqué en cas de contexte fortement évocateur de méningite bactérienne à pneumocoque.

Test- bandelettes : le support de ce test est constitué de deux bandelettes duplex A et Y/W135- Cet Y a partir de quelques gouttes de LCR ce test permet de faire le diagnostic de 4 sérogroupes A,C ,Y ;W 135 dans un délai de 10 minutes .

Amplification génique

Il existe des tests ciblés sur un agent bactérien ou viral précis et d'autres qui détectent la présence de divers micro-organismes (PCR universelle). Les techniques d'amplification génique se justifient chez des patients présentant manifestement une méningite purulente et pour lesquels :

- les examens microscopiques sont négatifs ;
- les examens microscopiques sont positifs et les cultures négatives.

Des kits existent pour la recherche spécifique de certains germes comme le méningocoque et le pneumocoque.

Si les premiers résultats orientent vers une méningite virale, des techniques d'amplification génique sont utilisées d'emblée pour identifier le virus en cause. En première intention sont pratiquées :

a recherche de gènes spécifiques de certaines bactéries (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, etc.) peut être réalisée à l'aide de techniques d'amplification génique (PCR)

directement réalisées sur le LCR et sur sérum. Ces techniques spécifiques et rapides sont utiles lorsque l'examen direct est négatif ou en cas de méningite décapitée par les antibiotiques.

-Le diagnostic et typage de *N.meningitidis* se fait par détection du gène **crgA** suivie par celui du **Sia D** codant pour la biosynthèse des sérogroupes B,C,Y,W135 ; l'amplification du gène **myn B** impliqué dans la synthèse des polysides de la capsule du séro groupe A .

-Elle peut également être réalisée sur une biopsie d'un élément purpurique dans le cas d'un purpura fulminants.

Rôle du laboratoire dans le choix de l'antibiothérapie :

Les sujets souffrant de méningite doivent être traités d'extrême urgence avec des antibiotiques, leur pronostic vital est en jeu.

L'antibiotique choisi doit à la fois être capable de diffuser dans le LCR et présenter une activité bactéricide sur le germe en cause.

Compte tenu de l'urgence le traitement antibiotique est instauré avant que les résultats de l'antibiogramme soient rendus.

L'émergence de souches résistantes justifie l'emploi en première intention d'antibiotiques à large spectre, par exemple les céphalosporines de troisième génération (le céfotaxime ou la ceftriaxone).

Comme certaines souches de pneumocoque présentent une sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3^e génération (C3G), les experts recommandent d'administrer une association C3G-vancomycine en première intention devant toute méningite supposée à pneumocoque

Le rôle du laboratoire est d'orienter le plus vite possible l'identification de l'agent causal afin de s'assurer de l'efficacité présomptive du ou des antibiotiques administré en première intention (les *Listeria*, nous l'avons vu précédemment, sont naturellement résistantes aux C3G).

L'antibiogramme peut être réalisé directement avec le LCR lorsque l'examen direct est positif mais les CMI doivent être contrôlées par la suite avec un inoculum standardisé.

L'antibiogramme permet de s'assurer de l'efficacité de l'antibiotique administré en première intention et éventuellement de choisir un antibiotique présentant un spectre plus étroit (par exemple C3G remplacé par amoxicilline).

Tests de détermination de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme et CMI) :

N.meningitidis, *S.pneumoniae*, *H.influenzae* isolés de LCR ou d'hémoculture doivent faire l'objet d'un antibiogramme et d'une détermination des CMI

1-*N.meningitidis* :

-L'antibiogramme est réalisé par ensemencement de la souche bactérienne sur milieu Mueller-Hinton additionnée de 5% du sang du mouton, puis on met les disques à tester qui sont pénicilline G, ampicilline, céfotaxime, spiramycine, chloramphénicol) puis incubation 24H à 37°, atmosphère enrichie en CO₂.

La lecture des diamètres se fait selon le CLSI 2017

-Détermination de CMI se fait soit par E-test ou par technique de dilution en milieu liquide

2-*S. pneumoniae* :

Réalisation d'un antibiogramme standard selon les recommandations du CA-SFM, si la souche est de sensibilité diminuée à la pénicilline G PSDP (22 % pénicilline et 4 % céfotaxime) la détermination de la CMI est obligatoire dans ce cas.

Concentrations critiques des bêta-lactamines de *S. pneumoniae* et *N. meningitidis* selon le CA-SFM, EUCAST

	Concentrations critiques en mg/l			
	<i>S. pneumoniae</i> (CA-SFM EUCAST 2018)		<i>N. meningitidis</i> (CA-SFM EUCAST 2018)	
	S	R	S	R
Pénicilline G	≤ 0,064	> 0,064	≤ 0,06	> 0,25
Amoxicilline	≤0,5	>0,5	≤0,125	>1
Céphalosporine 3e génération	≤0,5	>2	≤0,125	>0,125

3-*H.influenzae* :

Habituellement sensible aux antibiotiques, *Haemophilus influenzae* peut acquérir une résistance aux Bêta-lactamines qui sont le traitement de première intention des infections liées à cette bactérie.

-Deux mécanismes de résistance soit par production d'une Bêta-lactamase dans ce cas il résultera une résistance à l'ampicilline et l'amoxicilline qui peut être restaurée par l'association aux inhibiteurs ou bien par un deuxième mécanisme qui est la perte d'une porine membranaire ; la recherche de Bêta-lactamase s'effectue par le test de trèfle.

Autres examens biologiques

Pour poser le diagnostic de méningite, l'analyse du LCR est obligatoirement associée à une voire plusieurs hémocultures afin d'augmenter les chances d'obtenir en culture l'agent pathogène, notamment en cas de bactéries fragiles comme le méningocoque.

De surcroît, le dosage de la procalcitonine sérique permet de différencier les méningites virales et bactériennes (voir Paramètres biochimiques utiles au diagnostic)

Une numération et formule sanguine sont

également indiquées, une leucopénie est considérée comme un critère de gravité.

Biopsie cutanée :

-Si purpura => Biopsie de lésion cutanée => Culture ou PCR, *N.meningitidis* est isolé dans 60-80% des cas (Même après 24h d'antibiothérapie)
-Recherche de *S.pneumoniae* également possible

Conclusion :

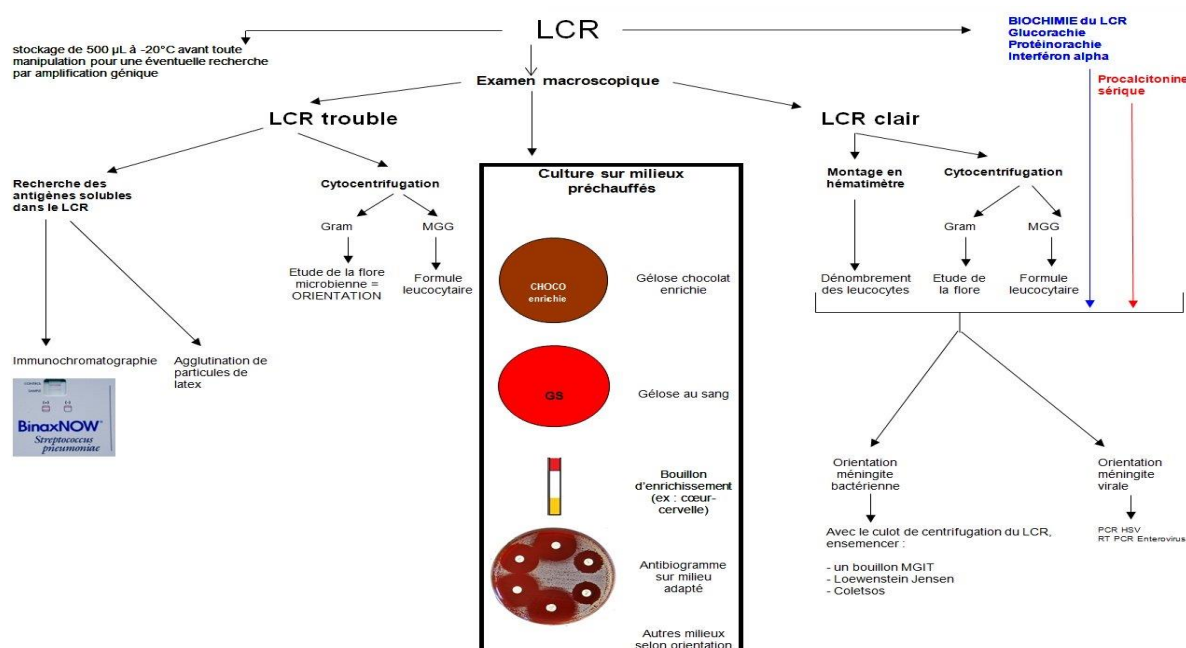
-Le diagnostic d'une méningite purulente intervient toujours dans un contexte d'urgence médicale, pour cela il doit être rapide et fiable. Les méthodes conventionnelles proposées pour le diagnostic doivent être complétées par d'autres tests qui constituent la base du traitement antibiotique : la détermination de la CMI, de la sensibilité à la pénicilline pour pneumocoque et méningocoque et la recherche de Béta-lactamase pour *H.influenzae*
-Désormais les techniques de biologie moléculaire par la PCR doivent également prendre une place importante car, en plus de leur rapidité d'exécution elles permettent de réduire le taux de méningites purulentes non confirmées.

Références :

1. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 4^e édition 2010 Société Française de Microbiologie
2. Freney J, Renaud F, Hansen W et Bollet C in Précis de bactériologie clinique Edition ESKA 2000
3. Denis F, Ploy M, Bingen C et Quentin R in Bactériologie médicale 2007 Elsevier Masson
4. Pilly E in Maladies Infectieuses et Tropicales– 2008 – 21^e édition – Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales
5. Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaires (à l'exclusion du nouveau-né) conférence de consensus 2008 Texte long – 19 novembre 2008
6. Société de pathologie infectieuse de langue française : http://www.infectiologie.com/site/medias/documents/consensus/Meningites_consensus-long.pdf
7. Nombre de cas de méningites à *Listeria* en France : http://www.invs.sante.fr/beh/2004/09/beh_09_2004.pdf
8. Charvet A, Garcin F, Albanèse J, Martin in « Méningites nosocomiales » – Service d'anesthésie et de réanimation, hôpital Nord, chemin des Bourrely, 13015 Marseille, France
9. Chakour A, Koeck B, Maslin J, Nicand E, Chadli M, Nizou b Y, Buisson B, in Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique : état des lieux, perspectives
10. Floret D. Méningite à pneumocoque et résistance bactérienne – Archives de pédiatrie 2002– Volume 9, numéro 11 – pages 1166-72
11. <http://www.em-consulte.com/article/13311>
12. Rapport d'activité 2009 du Centre National des Pneumocoques :
13. http://www.invs.sante.fr/surveillance/cnr/rapport_cnr_2009.pdf
14. Le Calendrier des vaccinations et les recommandations vaccinales 2011 selon l'avis du Haut Conseil de la santé publique
15. BEH du 22 mars 2011 / n° 10-11 : http://www.invs.sante.fr/beh/2011/10_11/beh_10_11_2011.pdf
16. La procalcitonine (PCT) : un outil diagnostique et de stratégie thérapeutique – Revue Française des Laboratoires N° 434 – juillet-août 2011.
17. Simon L. et al Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis — Clinical infectious diseases 2004;39(2):206-17.
18. Hausfater P. Procalcitonine ou CRP : quelle utilisation rationnelle en médecine d'urgence de deux biomarqueurs de l'inflammation et de l'infection ? – http://sofia.medicalistes.org/spip/IMG/pdf/Procalcitonine_ou_CRP-quelle_utilisation_rationnelle_en_medecine_d_urgence_de_deux_biomarqueurs_de_l_inflammation_et_de_l_infection.pdf
19. <http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/DIU-paris/Module%203/AUJARD-BINGEN-Meninigites-Nouveaune.pdf>

20. Gray SJ, et al Ultrasound-enhanced latex immuno-agglutination and PCR as complementary methods for non-culture-based confirmation of meningococcal disease – J Clin Microbiol 1999;37:1797–801
21. Levy C, La Rocque F, Cohen R in Actualisation de l'épidémiologie des méningites bactériennes de l'enfant en France Médecine et Maladies Infectieuses – Volume 39, Issues 7-8, July-August 2009, Pages 419-431 – Textes d'experts de la 17e Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse
22. Varon E. in Actualisation de l'épidémiologie des méningites bactériennes aiguës chez l'adulte en France– Médecine et Maladies Infectieuses – Volume 39, Issues 7-8, July-August 2009, Pages 432-44
23. Textes d'experts de la 17e Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse
24. Noël H, Chaib A, Poujol I, Thiolet J M, Coignard B in Signalement de méningites nosocomiales après acte invasif sur le rachis, France, 2001-2005 –Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France – BEH N° 12-13 du 3 avril 2007 http://www.invs.sante.fr/beh/2007/12_13/beh_12_13_2007.pdf
25. Bourillon A, Aujard Y, Bingen E in EMC pédiatrie et maladies infectieuses.
26. Mariani P, Kurkdjian S, Onacorsi B, Bingen E in Bactériologie médicales (techniques usuelles) 2016
27. Belouni R, Tali Maamar H, Rahal K In Techniques microbiologiques 2011 (Institut Pasteur Algérie) diagnostic bactériologiques des méningites purulentes Développement et Santé, n°117, juin 1995

Schéma récapitulatif de l'examen d'un LCR



La phagothérapie : la renaissance d'un vieux traitement face à l'antibiorésistance?

Par Docteur Y. LOMBARKIA
lomdoc@yahoo.com

Microbiologie clinique
 MISE AU POINT

Résumé : Découverts au début du XX^e siècle, les bactériophages ont rapidement été utilisés pour traiter des infections bactériennes, devenant ainsi les premiers antibactériens spécifiques à être employés en médecine. Cependant, l'arrivée des antibiotiques a brutalement réduit leur utilisation, les confinant au rayon (boîte à outils) du chercheur. L'émergence de bactéries multirésistantes et le risque de revenir à l'ère pré-antibiotique ont fait ressortir la phagothérapie de l'oubli injuste auquel elle avait été confinée.

Mots clés : bactériophages, infections bactériennes, antibiotiques, bactéries multirésistantes, phagothérapie.

Introduction :

La progression de l'antibiorésistance parmi les bactéries rencontrées en pathologie infectieuse et le manque criant de nouveaux antibiotiques susceptibles de la combattre rendent indispensable la recherche d'autres approches thérapeutiques. Parmi celles-ci, l'utilisation des bactériophages (virus de l'environnement infectant naturellement les bactéries) est une des solutions les plus prometteuses [1]. Découverts il y a 100 ans, les phages sont 10 fois plus nombreux que les bactéries. Les phages sont présents partout où il y a des bactéries et participent au vaste microsysteme naturel qui concourt à la coévolution dynamique compétitive des êtres vivants [2]. Les phages et leurs propriétés ont été très étudiés et, à la lumière des connaissances récentes, il apparaît de plus en plus envisageable, sous certaines conditions, de les réintroduire dans l'arsenal thérapeutique moderne. Cependant, l'étude des phages et leur emploi thérapeutique n'étaient pas suffisamment maîtrisés. La phagothérapie fut progressivement abandonnée par les pays occidentaux, qui avaient découvert les antibiotiques. Après une période faste et une utilisation immodérée des antibiotiques, nous assistons à une augmentation préoccupante du nombre d'échecs de l'antibiothérapie, liée pour une bonne part à l'extension des bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques [2]. Face à cette situation globale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et différents experts n'hésitent pas à parler de l'avènement prochain d'une ère post-antibiotique si aucune action n'est entreprise, accompagnée de prévisions qui, en 2050, placeraient le nombre de décès dus aux infections bactériennes à un niveau égal à celui imputable au cancer. La nécessité impérieuse de rechercher et de développer d'autres stratégies antibactériennes est fortement soulignée [1,3]. Parmi celles-ci, les bactériophages représentent l'une des plus prometteuses [4].

Historique :

L'idée d'utiliser les phages comme agents antibactériens n'est pas nouvelle. En 1917, Félix d'Hérelle (1873-1949), alors qu'il travaille à l'Institut Pasteur, décrit l'isolement et la spécificité de ces virus [5]. Il propose l'appellation « bactériophage » et est le premier à les utiliser comme traitement, notamment dans les dysenteries bacillaires provoquées par *Shigella*, donnant ainsi naissance à la phagothérapie. La phagothérapie a été utilisée pour la première fois en 1919, elle a connu un succès mondial pendant les décennies 1920 et 1930. Puis elle a été éclipsée progressivement par l'antibiothérapie à partir des années 1940. Aujourd'hui, elle est redécouverte comme une solution devant le constat alarmant qu'une ère post-antibiotique risque de compromettre l'acquis de nombreux progrès médicaux [2].

Les bactériophages : rôle et spécificité

Qu'est ce qu'un bactériophage ?

Les bactériophages (ou phages) sont des virus qui infectent naturellement et spécifiquement les bactéries. Ils sont de ce fait incapables d'infecter les cellules eucaryotes. D'une taille moyenne de 25 à 200 nm, constitués d'une capsidie protéique protégeant leur génome et le plus souvent d'une queue de longueur variable (par laquelle transite l'acide nucléique) et de fibres de queue assurant la reconnaissance de l'hôte (Figure 1), les phages ont un fonctionnement analogue à celui des autres virus [1].

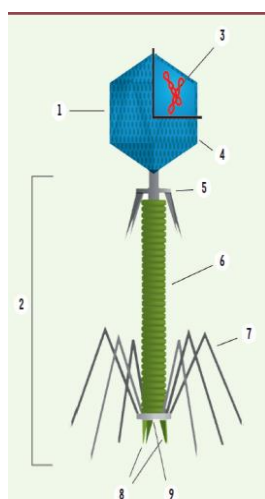


Figure 1. Structure du bactériophage T4. 1 : tête, 2 : queue, 3 : acide nucléique, 4 : capsid, 5 : collier, 6 : gaine, 7 : fibres de queue, 8 : épines, 9 : plaque basale (d'après Y. Tambe, © Wikimedia Commons). (1)

Biologie des bactériophages :

Selon leur cycle biologique, on distingue 2 types de bactériophages : les phages lytiques et les phages tempérés [6] (Figure 2).

les *phages lytiques*, détruisent la bactérie, ils détournent la machinerie bactérienne à leur profit pour se reproduire et se multiplier [6]. Après l'adsorption du phage sur la bactérie cible, l'acide nucléique viral (constitué d'ADN, plus rarement d'ARN) est transféré dans le cytoplasme bactérien et est alors transcrit, traduit et copié, puis introduit dans les capsides lors de l'assemblage des particules virales. En général, la lyse bactérienne est ensuite activement déclenchée par désorganisation de la paroi de la bactérie, permettant la libération des nouveaux virions. On estime que la durée d'un cycle infectieux varie de 9 à 45 minutes et permet de produire et de libérer de 30 à 300 phages par cellule lysée [1]. Ce sont précisément ces phages lytiques et eux seuls qui sont utilisés à des fins thérapeutiques (depuis D'Hérelle) pour lutter contre les infections bactériennes (phagothérapie)[6].

Lors du *cycle lysogénique* (on parle alors de phages tempérés), l'ADN viral est intégré au chromosome bactérien très rapidement après son introduction dans la cellule, ou réside sous forme plasmidique, ces deux situations conduisant à la répression des gènes phagiques gouvernant le cycle reproductif du virus. Il est alors dupliqué avec le reste du matériel génétique de la bactérie lorsque celle-ci se divise. Il prend le nom de prophage [1]. Les phages peuvent ainsi conférer de nouvelles propriétés à la bactérie. Ils peuvent rester quiescents pendant très longtemps. Ces phages tempérés ne sont pas utilisés en thérapeutique. Lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique on doit même s'assurer de l'absence de phage tempéré dans la préparation, car ils sont de potentiels vecteurs de gènes dangereux pour le malade. En revanche, les phages tempérés sont les auxiliaires précieux des laboratoires de biologie moléculaire, qui les utilisent comme outils pour implanter des gènes à l'intérieur de bactéries afin d'en modifier le génome et permettre (par exemple)

la fabrication de molécules par la bactérie, utilisée comme « usine » [1].

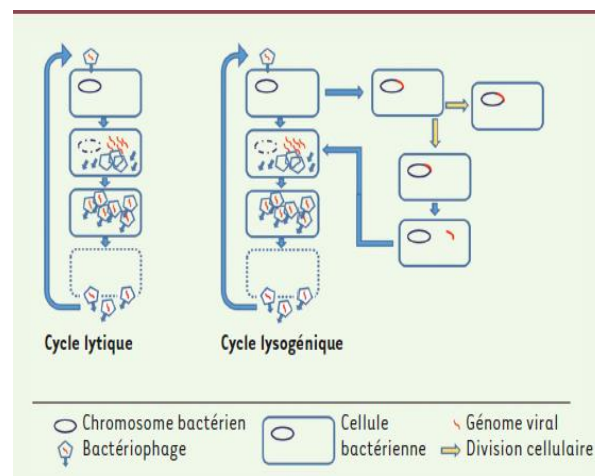


Figure 2. Cycles infectieux des phages virulents et tempérés [1].

Place des phages dans la nature : des virus régulateurs des communautés bactériennes

La diversité des phages est incommensurable : on estime qu'il existe environ 10^{30} phages avec 10^8 génomes différents sur la planète. Cette diversité constitue un réservoir quasi illimité d'agents antibactériens thérapeutiques dans lequel puiser. Présents dans tous les écosystèmes, ils le sont également sur notre peau et nos muqueuses, dans notre tube digestif et notre alimentation. Ils sont de puissants régulateurs naturels des populations bactériennes [1].

Les bactériophages sont les acteurs de nombreux écosystèmes et, bien que leur importance soit considérable, leur rôle est encore mal connu. On sait cependant que les phages lytiques sont directement responsables d'au moins 50% de la mortalité bactérienne journalière en l'absence d'autres prédateurs. Ils contribuent ainsi probablement au renouvellement des populations bactériennes et à leur régulation, ils contribueraient aussi à la mobilisation de substrats issus de la destruction des bactéries : ils ont donc aussi un rôle à jouer dans le cycle du carbone. Les phages tempérés, quant à eux, contribuent aux échanges de matériel génétique entre bactéries ; ils joueraient ainsi un rôle dans leur évolution. Les phages pouvant réaliser un cycle lysogénique ont un rôle important dans l'évolution bactérienne : l'intégration du virus au sein du chromosome bactérien et sa sortie sont propices à des échanges de matériel génétique entre ces deux organismes. Un phage peut, par erreur, emporter du matériel génétique bactérien lors de l'encapsidation et le transférer dans une autre bactérie par un processus nommé transduction généralisée [6].

Une spécificité d'hôte étroite :

On sait maintenant qu'il existe dans la nature un très grand nombre de phages, et que chacun d'eux est spécifique d'une espèce bactérienne ou même d'une souche particulière [7]. Par exemple, un phage ciblant *Staphylococcus aureus* ne sera pas en mesure d'infecter *E. coli*. Cette spécificité se décline également au sein de l'espèce : un phage infectant *E. coli* n'infectera en général qu'un nombre restreint de souches d'*E. coli* [1]. Cela signifie que le traitement d'une infection donnée requiert l'emploi d'un phage (ou d'un cocktail de phages) efficace sur la ou les bactéries présentes chez le malade [7]. Cette spécificité, conférant globalement un spectre d'action bien plus réduit que celui exercé par un antibiotique à spectre étroit, est à la fois un avantage et un inconvénient. Le

principal avantage, lié au mode d'action des phages et à leur spécificité étroite, est celui d'un impact négligeable sur le microbiote intestinal du patient et l'absence de pression de sélection susceptible d'augmenter la résistance aux antibiotiques. Le revers de la médaille est la faible probabilité, pour un phage unique de pouvoir circonscrire une infection « X » sans avoir vérifié au préalable la sensibilité de la bactérie causale. Cette faiblesse peut être compensée par l'association de plusieurs phages (cocktail de phages), permettant une addition des spectres et, *in fine*, un élargissement du nombre de souches de bactéries ciblées. En pratique clinique, l'avènement de méthodes diagnostiques de plus en plus rapides pourrait à terme aider au choix des phages à utiliser [1].

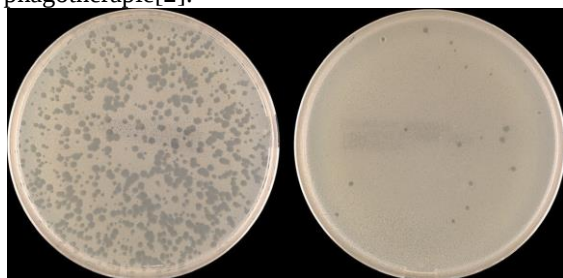
Avantages et inconvénients : phagothérapie versus antibiothérapie(2)

	Phagothérapie	Antibiothérapie
Mode d'action et pharmacologie	Les phages se multiplient et disparaissent avec les bactéries cibles Une seule dose est théoriquement suffisante Le cycle de reproduction est variable selon le phage La pharmacocinétique est mal connue Application limitée aux foyers accessibles et localisés (plaies)	Les antibiotiques sont métabolisés <i>in vivo</i> et ont une diffusion variable selon les tissus La pharmacocinétique des antibiotiques est bien connue → les modes d'administration (dose, rythme, durée) sont codifiés
Spécificité	Un phage ne s'attaque qu'à l'espèce bactérienne pathogène ciblée → respect des flores commensales	Un antibiotique à large spectre est actif sur plusieurs espèces bactériennes → impact sur les flores commensales (diarrhée, mycoses)
Effets indésirables	Rares effets indésirables (fièvre, céphalées à l'introduction du traitement) avec une suspension de phages purifiée	Nombreux effets indésirables (digestifs, allergiques, neurologiques, rénaux, cardiaques, tendineux, etc.)
Impact environnemental	Peu de risque si les phages sont naturels Risque potentiel avec les phages modifiés génétiquement	Risque d'autant plus important que le spectre des antibiotiques est large et leur emploi massif (utilisation dans les élevages)
Limites	La bactérie pathogène doit être connue, isolée et testée Absence de centre spécialisé	Contre-indications connues (toxicité) Résistances aux antibiotiques

Résistance	La résistance bactérienne aux phages peut apparaître en cours de traitement → intérêt d'utiliser plusieurs phages ("cocktail") Les phages restent actifs sur les bactéries résistantes aux antibiotiques et ne les sélectionnent pas	Les résistances des bactéries aux antibiotiques sont en augmentation pour toutes les espèces et pour toutes les classes d'antibiotiques partout dans le monde Les résistances sont souvent multiples et croisées, même entre différentes classes d'antibiotiques
Production et coût	Phages naturels peu coûteux et rapidement utilisables → intérêt pour les pays à faibles ressources Phages génétiquement modifiés → coût important, brevet possible, délai, disponibilités ?	Mise sur le marché d'un nouvel antibiotique longue et coûteuse → investissement important Désintérêt actuel de l'industrie pharmaceutique
Efficacité	Efficacité prouvée dans de nombreuses études expérimentales animales Études expérimentales humaines rarement publiées et limitées	Efficacité reconnue si les indications sont bien posées Études expérimentales et cliniques nombreuses conduisant à l'autorisation de mise sur le marché
Indications	Indications mal définies, en l'absence de standardisation pour l'utilisation thérapeutique des phages	Prescription des antibiotiques standardisée, normes et indications établies (référentiels)
Réglementation	En tant que biomédicaments, les phages sont absents des textes de santé publique (France et Union européenne)	Règlements bien adaptés à toutes les étapes de la fabrication comme à l'utilisation des antibiotiques

Quelles infections est-il possible de traiter ?

Si l'on se réfère à la littérature, toute infection bactérienne, quelle que soit sa localisation, pourrait bénéficier de la phagothérapie. Une infection localisée (préalablement traitée, éventuellement chirurgicalement) est le cas le plus habituel. C'est ainsi que d'excellents résultats ont été rapportés pour les abcès, ostéites, otites, etc. Pratiquement, la plupart des bactéries pathogènes pour lesquelles on dispose de phage(s) ont conduit à des tentatives de phagothérapie[2].



Applications émergentes :

Un des grands espoirs de la phagothérapie repose sur la capacité de ces virus à atteindre sélectivement certaines souches bactériennes présentes au sein d'une communauté de composition diversifiée telle que le microbiote digestif. En exploitant cette capacité exclusive, l'objectif est de pouvoir cibler certaines bactéries jugées indésirables et notamment de réduire le niveau de colonisation de certaines

entérobactéries multirésistantes portées par les patients dans leur tube digestif. Ces souches, non pathogènes lorsqu'elles sont de simples colonisatrices silencieuses, se disséminent néanmoins d'un patient à l'autre (au cours de séjours dans les établissements de soins notamment). Elles constituent des sources de germes potentiellement pathogènes alors responsables non seulement d'infections nosocomiales mais également d'infections communautaires posant de graves problèmes d'antibiothérapie [1].

De même, la modulation du microbiote digestif est un levier thérapeutique potentiel chez les patients souffrants de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) où le rôle pathogène de certaines souches d'*E. coli* (les AIEC ou *Escherichiacoli* adhérent-invasifs) a été pointé du doigt[1].

Les bactériophages sont d'ores et déjà utilisés dans l'industrie alimentaire : la FDA a autorisé depuis plusieurs années la mise sur le marché d'une préparation commerciale (listex®) destinée à éradiquer l'espèce *Listeria* dans les fabrications issues de l'industrie laitière, il a aussi été imaginé un usage agro-alimentaire à plus grande échelle et notamment en aquaculture pour réduire l'usage intensif des antibiotiques [6].

On peut aussi envisager l'utilisation du *bactériophage* à des fins diagnostiques. En effet, en testant différentes souches de bactériophages connus sur une bactérie inconnue, on peut identifier non seulement l'espèce bactérienne, mais aussi la souche et disposer d'un moyen thérapeutique efficace (le bactériophage). Dans la mesure où le bactériophage est très rapidement bactéricide, on peut imaginer qu'une telle méthode permettrait d'identifier la bactérie beaucoup plus rapidement qu'avec les méthodes conventionnelles [6].

En attente d'essais cliniques menés selon les critères actuels/

La nécessité de mettre en place des essais cliniques de qualité est aussi criante, mais elle se heurte au fait que les bactériophages ont une activité très ciblée qui en font un traitement personnalisé : cela rend donc difficile la tentative de généralisation réclamée par les tutelles. Un autre problème est que les bactériophages ne sont ni des médicaments, ni des organes, ni des vaccins, ni des dispositifs

médicaux. Ils sont habituellement considérés comme des préparations magistrales, ce qui rend difficile leur emploi dans un cadre réglementaire[8].

Conclusion :

Face à la progression de l'antibiorésistance, il s'agit à ce jour de l'arme thérapeutique la plus prometteuse de par le polymorphisme et le mode d'action de ses agents antibactériens.

Par rapport aux antibiotiques, la phagothérapie demandera un changement complet des habitudes de prescriptions médicales avec notamment une collaboration étroite avec les laboratoires de microbiologie et souvent une individualisation poussée des traitements.

Lever une armée de phages performants et qualifiés semble à portée de mains et l'évaluation en clinique de la phagothérapie est actuellement engagée. Cet élan doit maintenant être soutenu et renforcé pour proposer aux patients qui sont en impasse thérapeutique une solution pertinente et maîtrisée.

Bibliographie :

- 1- Dufour N, Debarieux L. La phagothérapie une arme crédible face à l'antibiorésistance. m/s n°4, vol 33, avril 2017.
- 2- Dublanchet A., O.Patey O. La phagothérapie Phage therapy. La lettre de l'infectiologue. Tome XXX- n° 4-Juillet-août 2015.
- 3- Carlet J, Le Coz P. *Rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques* 2015. Paris : Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes,
- 4- Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, Azeredo J. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends Microbiol* 2015 ; 23 : 185-91.
- 5- D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad Sci Paris* 1917 ; 165 : 373-75.
- 6- F. Ravat, ^{1,*}P. Jault, ² et J. Gabard³. Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Journal of the Euro Mediterranean Council for Burns and Fire Disasters-MBC* 31 Mars 2015;28(1):13-20.
- 7- Bertrand Jordan. Cent ans après, le retour de la phagothérapie? *médecine/sciences* 2019 ; 35 : 806-9.
- 8- Thelliez P. La phagothérapie : la renaissance d'un vieux traitement ? 2 Janvier 2020.



Mononucléose infectieuse à Epstein-Barr virus (EBV)

Microbiologie clinique
Mise au point

BENSEGHIR-Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-Batna
lamrita@gmail.com

Résumé : La mononucléose infectieuse (MNI) est un syndrome clinique aigu caractérisé par une fièvre, pharyngite et lymphadénopathie cervicale bilatérale. Dans 85–90% des cas, la MI est provoquée par une primo-infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Il y a typiquement dans le sang une lymphocytose absolue et relative (>4000 lymphocytes/ml, resp. >50% des leucocytes), avec lymphocytes atypiques reflétant une réponse immunitaire antivirale excessive. C'est elle qui est la grande responsable de la symptomatologie clinique. Le diagnostic différentiel de la MNI, en plus de l'infection aiguë à EBV, comprend notamment d'autres infections aiguës à VIH, cytomégalovirus, toxoplasmes, virus de l'herpès humain 6 et 7 et l'angine à streptocoques. Avec une clinique, une épidémiologie et une formule sanguine typiques, un monotest positif suffit à confirmer le diagnostic. Avec une présentation atypique ou un monotest négatif, l'étiologie doit être précisée par examens sérologiques spécifiques de l'EBV. Le traitement de la MNI à EBV est symptomatique. Les corticostéroïdes ne doivent être envisagés que pour ses complications ou ses évolutions gravissimes, et les antiviraux qu'en cas d'immunosuppression très marquée.

Mots clés : MNI-EBV-lymphocytose.

Introduction :

L'expression mononucléose infectieuse (MNI) désigne un syndrome caractérisé par la triade clinique fièvre, pharyngite et lymphadénopathie cervicale bilatérale, de même que par une lymphocytose et des lymphocytes atypiques sur le frottis sanguin. Dans 85–90% des cas, la MNI est provoquée par une infection aiguë par le virus d'Epstein-Barr (EBV) [1], et correspond à la fièvre ganglionnaire de Pfeiffer typique. Dans 10–15% des cas, la cause en est une infection aiguë à cytomégalovirus (CMV), à virus de l'immuno-déficience humaine (VIH), et nettement plus rarement à *Toxoplasma gondii* ou aux virus de l'herpès humain (HHV) 6 et 7 [1].

Agent causal :

L'EBV, ou herpesvirus humain de type 4 (HHV-4), appartient à la famille des Herpesviridae. Il présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles communes à tous les herpesvirus.

Le virus est composé d'une capside icosédrique entourée d'une enveloppe dérivée des membranes cellulaires dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales. Cette structure externe rend le virus fragile dans le milieu extérieur.

Gènes et protéines du virus Epstein Barr :

Son génome, une molécule d'acide désoxy-ribonucléique (ADN) code d'une part pour des protéines associées à la latence virale et d'autre part pour les protéines responsables de la production des nouveaux virions et du cycle lytique.

1. Protéines de la latence

L'EBV établit une infection latente dans les lymphocytes B qu'il infecte, par l'expression d'un nombre restreint de gènes viraux. Ces protéines virales associées à la latence comprennent :

- six protéines nucléaires (EBNA),
- trois protéines membranaires (LMP) ;
- deux gènes (Epstein-Barr encoded small RNA, ou EBER), mais non traduits en protéines.

Le gène EBNA-2, puis les gènes EBNA-3 et les EBER montrent un polymorphisme qui permet de classer les isolats en deux types viraux : EBV-1 et EBV-2

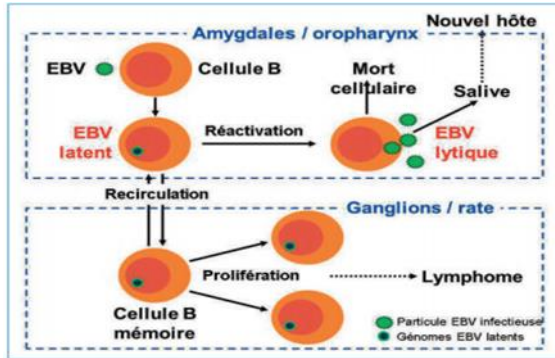
2. Protéines du cycle productif lytique

La fabrication d'une particule virale nécessite la synthèse de protéines dites tardives (protéines de structure), précédée obligatoirement par celle de protéines dites précoces et de protéines très précoces (ou « précoces immédiates »).

Epidémiologie de l'infection à EBV :

Dans le monde entier, >95% des gens sont infectés par l'EBV une fois dans leur existence. Comme tous les autres virus herpétiques humains, l'EBV ne peut être éliminé de l'organisme après une primo-infection et persiste à vie [1]. La séroprévalence de l'EBV est fonction de l'âge, du statut socioéconomique, de l'ethnie et du sexe. Dans les pays non industrialisés, >95% des petits enfants sont déjà infectés par l'EBV. Dans les pays industrialisés par contre, la primo-infection est nettement plus tardive depuis ces 50 dernières années [1]. On note deux pics de séroconversion pour l'EBV. Le premier pic survient dans l'enfance entre 2 et 4 ans, ne donne pratiquement jamais une MNI, essentiellement dans les pays en développement [3]. La primo-infection est alors le plus souvent asymptomatique. Le second pic survient à l'adolescence entre 15 et 25 ans dans les pays développés. La séroconversion est alors symptomatique dans 50 % des cas environ [4] : c'est la MNI. À l'âge adulte, plus de 90 % de la population est immunisée. La séroprévalence de l'EBV est si élevée après 30 ans qu'en valeur

absolue, moins d'infections aiguës à EBV peuvent provoquer une MNI. Mais il peut y avoir des réactivations et réinfections pendant toute la vie, dont l'évolution clinique est généralement muette [1]. La pénétration de l'EBV dans les cellules B entraîne une prolifération polyclonale des lymphocytes B, responsable de la prolifération des lymphocytes cytotoxiques. Le virus reste ensuite à l'état latent dans les lymphocytes B du sang circulant [5].



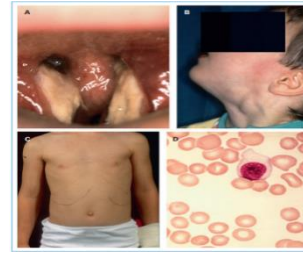
Infection à EBV latente et lytique des cellules B.[1]

Transmission :

La transmission se fait essentiellement par la salive et nécessite un contact étroit [2]. Chez les petits enfants, la transmission se fait par gouttelettes de la part des parents, frères et sœurs ou camarades de jeu, et chez les adolescents et jeunes adultes typiquement par les baisers « maladie du baiser » [1]. La transmission sexuelle de l'EBV a récemment été évoquée. Il existe exceptionnellement une transmission par transfusion ou par transplantation d'organe [2].

Clinique :

L'incubation est de quatre à six semaines. Le tableau associe dans 50 % des cas une fièvre élevée et prolongée, une asthénie intense, un syndrome pharyngé et des adénopathies [5]. L'angine à fausses membranes est typique, mais elle peut être aussi érythémateuse ou érythémato-pultacée, avec œdème de la luette et purpura du voile. Les adénopathies sont fermes et douloureuses, initialement cervicales ou occipitales, puis généralisées. Une hépatomégalie et une splénomégalie peuvent être retrouvées. Un exanthème maculo-papuleux du tronc et de la racine des membres est présent dans 90 % des cas après prise d'amoxicilline. D'autres manifestations plus rares ont été décrites : oculaires (conjonctivite, œdème palpébral), neurologiques (méningite, encéphalite, polyradiculonévrite, myélite), cardiaques (myocardite, péricardite), rénales (glomérulonéphrite), pulmonaires (pneumopathie interstitielle)[6,7].



Découvertes typiques d'une mononucléose infectieuse à EBV [1].

- A. Amygdalite
- B. Lymphadénopathie cervicale
- C. Hépato-splénomégalie
- D. Lymphocytes atypiques sur le frottis sanguin.

Diagnostic au laboratoire:

On retrouve un syndrome mononucléosique dans 80 % des cas, souvent associé à une neutropénie et une thrombopénie modérées. Des complications hématologiques sont possibles : anémie hémolytique, agranulocytose ou syndrome d'activation macrophagique [8,9]. L'atteinte hépatique est fréquente, avec une cytolysé ou, plus rarement, une cholestase. La recherche d'anticorps hétérophiles par le MNI-test (réaction d'agglutination sur lame d'hématies animales par les immunoglobulines M [IgM] hétérophiles du sérum du malade) permet un diagnostic positif rapide mais de sensibilité et de spécificité imparfaite, surtout chez l'enfant. Le diagnostic positif de primo-infection EBV doit être complété par la sérologie spécifique EBV (parfois réalisée d'emblée).

Le diagnostic virologique repose sur la mise en évidence des antigènes ou du génome et/ou sur la détection d'anticorps spécifiques circulants, la culture n'est qu'exceptionnellement utilisée.

Diagnostic spécifique indirect :

Réponse immunitaire humorale :

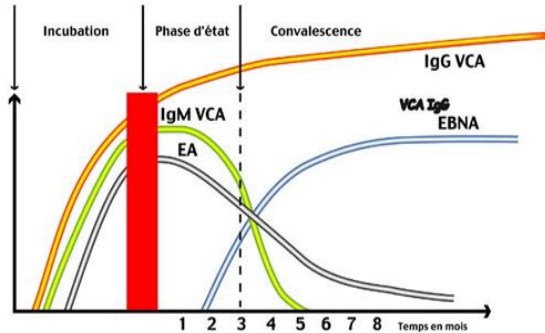
Lors de l'infection primaire, la réplication de l'EBV dans les cellules épithéliales et dans les lymphocytes B va entraîner une réponse immunitaire humorale, dirigée d'abord contre les antigènes du cycle lytique.

Dans un second temps, le virus entre dans une phase de latence associée à l'expression des protéines EBNA et LMP et à l'apparition d'une réponse immunitaire humorale dirigée contre les protéines de latence.

On voit donc apparaître successivement des anticorps contre les protéines d'enveloppe (anti-MA Gp 85 et Gp 220/350), contre les protéines de capside (anti-VCA), contre les protéines précoces ou très précoces (anti-Zébra, anti-EA) puis des anticorps dirigés contre les protéines de la phase de latence (anti-EBNA). Les anticorps anti-EA et anti-Zébra vont diminuer, voire disparaître, alors que les anticorps anti-VCA et anti-EBNA vont persister. Il faut signaler également la production d'immunoglobulines A (IgA) spécifiques de l'EBV

favorisant la pénétration du virus dans les cellules épithéliales.

La présence d'anticorps IgM dirigés contre les antigènes viraux du cycle lytique signe en général la primo-infection à EBV. Mais comme ces IgM réapparaissent parfois lors des réactivations, il est utile de rechercher les anticorps IgG de type EBNA-1 qui doivent être absents au cours de la primo-infection aiguë.



En pratique :

Au moment de la primo-infection, les anticorps dirigés contre les protéines VCA sont détectés (IgM ou IgG) alors que les anticorps anti-EBNA n'apparaissent que plus tardivement. Un profil dissocié des anticorps (Ac), Ac anti-VCA +, Ac anti-EBNA-, est en faveur d'une primo-infection qui sera confirmée par la positivité des IgM VCA. Un profil non dissocié (Ac anti-VCA +, Ac anti-EBNA +) signe une infection ancienne.

Diagnostic direct :

Culture cellulaire

L'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV est relativement facile. Elle nécessite toutefois de disposer de lymphocytes B vierges de toute infection à EBV. On utilise en général les lymphocytes B provenant de sang de cordon ombilical ou provenant de sujets EBV-séronégatifs. L'obtention de lignées nécessite quelques semaines à quelques mois, ce qui exclut cette approche des techniques de diagnostic virologique direct.

Immunohistochimie

Les techniques de détection des antigènes de latence ou du cycle lytique le plus souvent utilisées sont les techniques immunoenzymatiques. On peut ainsi préciser, en fonction des antigènes exprimés dans les tissus pathologiques, si la latence est de type I, II, ou III, et rechercher l'expression des protéines du cycle lytique. Ces méthodes ont permis de classer les différentes proliférations cellulaires en fonction de l'état de latence de l'EBV. Cela pourrait avoir un intérêt important tant au niveau du diagnostic virologique qu'au niveau de la conduite thérapeutique.

Biologie moléculaire

Hybridation in situ

Pendant la phase de latence du virus, deux ARN viraux non codants EBER1 et EBER2 sont transcrits. Ces deux transcrits sont abondamment exprimés et leur localisation est nucléolaire. En

raison de cette étonnante abondance, une technique d'hybridation in situ non radioactive sensible est suffisante pour les détecter.

Polymerase chain reaction (PCR)

Les techniques de PCR sont une alternative à l'isolement viral sur culture cellulaire. Il faut distinguer les techniques de détection qualitatives des techniques de détection quantitatives. Chaque fois qu'un prélèvement se situe dans un compartiment dans lequel le virus est en phase de latence, il faut obligatoirement faire appel à des techniques de PCR quantitatives. C'est le cas pour la détermination de la charge virale au niveau des lymphocytes circulants. Dans ce compartiment, la détermination de la charge virale EBV est utile pour diagnostiquer et/ou prévoir une pathologie associée au virus d'Epstein-Barr.

Les méthodes de PCR qualitatives sont utilisables dans des compartiments biologiques dans lesquels le virus n'est pas habituellement retrouvé, tel le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Diagnostic non spécifique :

Techniques de diagnostic sérologique non spécifique :

Les anticorps hétérophiles, des IgM agglutinant certains globules rouges animaux, apparaissent très spécifiquement au cours de la MNI à EBV, bien qu'ils ne soient pas dirigés contre des antigènes du virus.

Ces anticorps hétérophiles apparaissent au cours de la MNI, généralement vers le huitième jour de la maladie, et disparaissent en quelques mois. Ils ne sont présents que dans 70 à 80 % des cas et sont plus souvent absents chez l'enfant que chez l'adolescent ou l'adulte jeune.

Leur détection par l'ancienne réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn ou, surtout aujourd'hui, par les tests d'agglutination sur lame (MNI tests...), simples, rapides et économiques, est d'une portée partiellement limitée, surtout en dehors de la fourchette des 15-25 ans.

Réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn :

Le but de cette réaction est de révéler la présence d'IgM hétérophiles agglutinant les hématies de mouton, de cheval et de bœuf. Dans la réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn, les anticorps hétérophiles apparus au cours de la MNI se distinguent des agglutinines naturelles dirigées contre les antigènes de Forssman (antigènes érythrocytaires hétérophiles) par absorption préalable du prélèvement sur des cellules de rein de cobaye.

MNI-test :

Le but de la réaction est de détecter les anticorps hétérophiles dirigés contre les hématies de cheval fixées au formol. Cette réaction est rapide mais moins fiable que la réaction de Paul-Bunnell-Davidsohn.

Evolution et traitement :

La guérison de la MNI est le plus souvent spontanée en trois ou quatre semaines. Cependant, certaines complications rares (10 % des cas) mais graves peuvent conduire au décès : cardiaques, neurologiques (méningite, méningo-encéphalite, syndrome de Guillain-Barré), rupture de rate, hépatite fulminante [10]. Des anémies hémolytiques auto-immunes peuvent se voir.

Le traitement de l'infection aiguë à EBV est purement symptomatique, avec le paracétamol et/ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens, contre la fièvre et les douleurs. Les antiviraux tels qu'aciclovir ou valaciclovir ne doivent pas être utilisés chez les patients immunocompétents. Ils diminuent certes la réplication d'EBV lytiques dans l'oropharynx, de manière transitoire, mais n'ont aucun effet sur la gravité ni sur l'évolution de la maladie aiguë, pas plus que sur l'incidence et le type des complications tardives. Les corticostéroïdes ne doivent pas non plus être utilisés dans une MNI sans complication. Ils ne doivent être envisagés qu'en cas de graves réactions inflammatoires systémiques, de cytopénie significative ou de complications locales telles que stridor ou (menace de) rupture de rate [1].

Conclusion :

La définition d'une mononucléose infectieuse à EBV est biologique, mais la démarche diagnostique doit s'aider des données de l'interrogatoire, de l'examen clinique et des sérologies [2]. La séoprévalence de l'EBV est fonction de l'âge, du status socioéconomique, de l'ethnie et du sexe [1]. La guérison de la MNI est le plus souvent spontanée. Mais, certaines complications sont rares et graves. Le traitement de l'infection aiguë à EBV est purement symptomatique. Les antiviraux ne doivent pas être utilisés chez les patients immunocompétents. Les corticostéroïdes sont réservés aux formes compliquées. [1].

Références :

1. Karrera U., Nadalb D. Medizinische Poliklinik M., Kantonsspital Winterthur b Infektiologie und Spitalhygiene, Universitäts-

Kinderspital Zürich. Forum Med Suisse 2014;14(11):226–232

2. Higgins CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, et al. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis* 2007;195:474–82.
3. Chan KH, Tam JS, Peiris JS, Seto WH, Ng MH. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infancy. *J Clin Virol* 2001;21:57–62.
4. Niederman JC, Evans AS, Subrahmanyam L, McCollum RW. Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults. *N Engl J Med* 1970;282:361–5.
5. Cohen JL. Epstein Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343:481–92.
6. Fujimoto H, Asaoka K, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H, Kaji M. Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Intern Med* 2003;42:33–40.
7. Kennedy M, Apostolova M. A rare case of infectious mononucleosis complicated by Guillain-Barre syndrome. *Neurol Int* 2013;5:20–2.
8. Sullivan JL, Woda BA, Herrod HG, Koh G, Rivara FP, Mulder C. Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome: virological and immunopathological studies. *Blood* 1985;65:1097–104.
9. Whitelaw F, Brook MG, Kennedy N, Weir WR. Haemolytic anaemia complicating Epstein-Barr virus infection. *Br J Clin Pract* 1995;49:212–3.
10. Stahl JP. Infections aiguës graves à EBV. *Reanima*

Technique de diagnostic rapide des bactéries productrices de carbapénémases : le Carba NP test



N-E-KOUDA-A.KASSAH-LAOUAR

Résumé : Un test rapide et fiable pour la détection de bactéries productrices de carbapénémases. Un test à forte valeur médicale confirme la détection de bactéries productrices de carbapénémases à partir de cultures sur gélose. Appelé Carba NP test

Mots clés : carbapénémases-caraba N test

Microbiologie clinique

Mise au point

Introduction :

Les carbapénémases, un problème mondial

La résistance microbienne aux antibiotiques en constante augmentation constitue **l'un des problèmes de santé publique les plus urgents aujourd'hui**. Les carbapénèmes sont utilisés en général en dernier recours pour soigner les infections bactériennes. Cependant, **des souches de bactéries résistantes aux carbapénèmes** émergent rapidement, en particulier chez les **entérobactéries**. Il existe deux types de résistance aux carbapénèmes :

- Résistance non enzymatique, non transmissible : imperméabilité et efflux. L'isolement des patients n'est pas nécessaire.
- Résistance enzymatique, a pour origine **la présence d'enzymes de type carbapénémases**, celle-ci est transmissible et impose de prendre des mesures préventives. C'est pourquoi les infections provoquées par les bactéries productrices de carbapénémases sont :
- **Très difficiles à soigner,**
- **Responsables d'un taux de mortalité élevé et se propagent facilement** entre personnes (par contact, par l'alimentation et l'eau), ce qui augmente le risque d'épidémies d'Infections Associées aux Soins (IAS).

Dans le rapport Antibiotic Resistance Threats 2013 (Menaces liées à la résistance aux antibiotiques 2013), le Center for Disease Control and Prevention (CDC) classe la résistance aux carbapénèmes dans la catégorie la plus grave (menace urgente), la qualifiant de « **menace immédiate pour la santé publique, nécessitant des actions urgentes et dynamiques** »¹.

La détection de la résistance aux carbapénèmes, en particulier lorsqu'elle est provoquée par des bactéries transmissibles productrices de carbapénémases, est décisive afin de pouvoir adapter correctement le traitement antibiotique, mettre en place les mesures d'isolement appropriées et décider d'éventuelles autres mesures complémentaires. La plupart des méthodes de détection et de confirmation existantes permettent d'obtenir un résultat avec un temps d'attente long et/ou complexe voire avec un coût plus élevé. De plus, certains de ces tests manquent de sensibilité et de spécificité, rendant les résultats moins fiables.

La détection des plasmides de transmission (avec les carbapénémases émergentes comme OXA-48 et VIM) est importante mais difficile, car les isolats peuvent n'avoir qu'une réduction limite de la sensibilité aux carbapénèmes, et la résistance peut être médiée par mécanismes autres que la production de carbapénémases (par exemple bêta lactamase à spectre étendu [BLSE] avec diminution de la perméabilité).

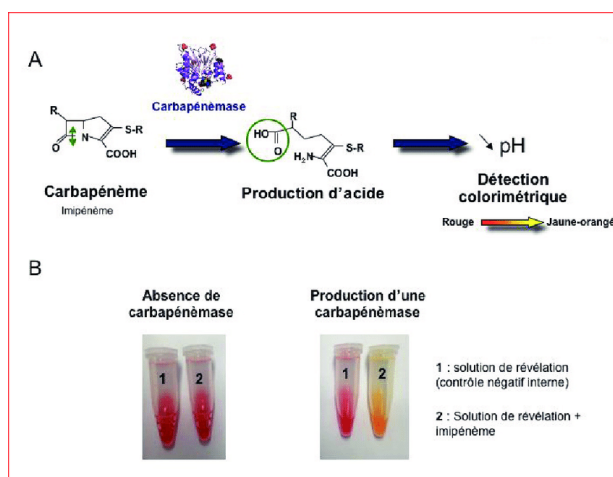
Bien que les méthodes moléculaires soient confirmatives, les tests peuvent ne pas être disponibles immédiatement et peuvent être limités par le nombre de cibles analysées. Le test Hodge modifié, un Test de confirmation anciennement recommandé par le CLSI pour la production de carbapénémase, souffre d'un manque de spécificité, d'un long délai d'exécution, et une faible sensibilité pour la détection des métallobêta lactamases.

Un test phénotypique rapide pour dépister les carbapénémases est hautement souhaitable.

En 2013, Nordmann et al. Décrit un test rapide chromogène de détection de carbapénémase basé sur l'hydrolyse de l'anneau bêta lactame de l'imipénème, le test Carba NP (Carba Nordmann-Poirel test).

Principe du test :

Le principe de ce test repose sur l'identification d'une acidification du milieu liée à l'hydrolyse d'une carbapénème (imipénème) par une carbapénémase quelle qu'elle soit. L'indicateur de pH change de couleur lorsque le milieu devient acide. Cette technique est particulièrement rapide (30 min à 120 min) ne nécessite aucun matériel de coût important ni de personnel entraîné. Elle est sensible et spécifique (100% *Enterobacteriaceae* vs 94.4 % *Pseudomonas*). Elle peut être réalisée à partir de souches isolées ou directement à partir des prélèvements cliniques (hémocultures).



A. Principe du Carba NP test. **B.** Résultats du Carba NP test avec une souche ne produisant pas de carbapénémase (*E. coli* produisant la BLSE CTX-M-15, panel de gauche) et avec une souche produisant une carbapénémase (*K. pneumoniae* produisant KPC-2, panel de droite). Les tubes 1 et 2 contiennent la souche à tester et, respectivement, du milieu réactionnel (tube 1) ou du milieu réactionnel supplémenté avec de l'imipénème (tube 2). La photographie a été réalisée après 1 h d'incubation à 37°C.

Dépistage

Plusieurs laboratoires dans le monde utilisent désormais le Carba NP test. La détection des porteurs sains est particulièrement importante pour prévenir le développement d'épidémies à bactéries multirésistantes en milieu hospitalier. Elle s'adresse essentiellement à deux types de patients ; les patients transférés de tout hôpital étranger et les patients des unités à risques (réanimation, chirurgie lourde, immunodéprimés, greffés).

Ce dépistage repose actuellement sur un screening des selles des patients par l'utilisation de géloses sélectives permettant d'identifier des souches suspectes, résistantes aux carbapénèmes. Après cette étape de culture (24 h), le screening des souches productrices de carbapénémases peut se faire notamment par l'utilisation du Carba NP test.

Pourquoi détecter les bactéries productrices de carbapénémases ?

Dans la mesure où la perspective à court terme de commercialisation de nouveaux antibiotiques est particulièrement limitée, il est indispensable d'être capable d'identifier le plus rapidement possible ces souches productrices de carbapénémases pour :

- adapter au mieux la thérapeutique chez les patients infectés ;
- limiter leur diffusion, tout particulièrement en milieu hospitalier.

C'est pourquoi on recommande l'identification des patients porteurs. La détection de patients infectés par de telles souches repose sur un premier dépistage basé sur l'analyse des profils de résistance aux bêta-lactamines, et plus particulièrement aux carbapénèmes des souches infectantes. De nombreuses techniques

phénotypiques ont été proposées et utilisées pour identifier les EPC. Le délai d'obtention des résultats est important (48-72 h), avec une sensibilité et une spécificité variables ; la lourdeur des tests utilisés jusque-là implique un temps technique important.

Les techniques moléculaires d'identification des gènes de carbapénémases présentent, quant à elles, une excellente spécificité et une excellente sensibilité mais ont un coût très élevé et nécessitent un personnel additionnel formé aux techniques de biologie moléculaire ; leurs résultats sont obtenus là encore relativement tardivement.

DÉTECTION DES Entérobactéries

Productrices de Carbapénémase (EPC)

En première intention, toute diminution de sensibilité aux carbapénèmes (imipénème, méropénème, ertapénème, doripénème) doit initier une recherche de carbapénémase. Classiquement et quelle que soit la carbapénémase impliquée, l'ertapénème est souvent la molécule la plus hydrolysée, et donc le marqueur le plus fiable possédant la meilleure sensibilité pour la détection des souches d'EPC. D'après les critères de l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) et du CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), les limites de sensibilité aux carbapénèmes sont 2 mg/L pour l'imipénème et le méropénème, 1 mg/L pour le doripénème, et 0,5 mg/L pour l'ertapénème (www.eucast.org).

Par contre les CMI requises par le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), les limites de sensibilité aux carbapénèmes sont 1 mg/L pour l'imipénème et le méropénème, et 0,5 mg/L pour l'ertapénème. Cependant, sur la seule base de ces valeurs critiques de CMI, la détection des souches d'EPC reste difficile. Certaines souches productrices de carbapénémase en particulier OXA-48 apparaissent sensibles aux carbapénèmes avec des CMI aux carbapénèmes situées juste en dessous de ces valeurs critiques. D'où l'intérêt de rechercher la présence d'une carbapénémase devant non seulement (i) toute souche classifiée comme intermédiaire ou résistante à l'un des carbapénèmes (et notamment à l'ertapénème, qui doit absolument être testée), mais aussi devant (ii) toute souche possédant une légère diminution de sensibilité aux carbapénèmes par rapport à un phénotype sauvage. Cette conduite à tenir est d'autant plus vraie que les valeurs limites (S, I, R) ont beaucoup varié dans les années récentes et dépendent, de plus, de l'organisme qui les définit : EUCAST, CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)...

Pour la détection de l'activité d'une carbapénémase plusieurs techniques phénotypiques ont été proposées. Tests d'inhibition (de l'acide clavulanique, du tazobactam et de l'acide boronique) vis-à-vis des carbapénémases de type KPC, et sur l'activité inhibitrice de l'EDTA et de

l'acide dipicolinique vis-à-vis des métallo- β -lactamases. Malheureusement la sensibilité et la spécificité de ces techniques est variable, en plus de du délai de rendu du résultat important au clinicien (au moins 24 h à partir du résultat de l'antibiogramme). De plus, le test de Hodge modifié est utilisé pour l'identification de la production *in vivo* d'une carbapénémase s'est avéré à la fois manque de spécificité (nombreux faux positifs avec les souches d'*Enterobacter* sp. Surexprimant leur céphalosporinase chromosomique) et de sensibilité (faux négatifs, notamment avec les souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase de type NDM). Il a d'ailleurs été démontré que l'ajout de zinc dans le milieu de culture permettait d'augmenter la sensibilité de ce test.

La détection de l'activité carbapénémase peut également être réalisée par spectrophotométrie UV. Cette technique qui se déroule en plusieurs étapes, peu onéreuse (hors coût) nécessite du personnel rodé.

L'équipe du Pr P. Nordmann a réussi à mettre au point un test biochimique dénommé « **Carba NP test** », basé sur l'hydrolyse *in vitro* de l'imipénème et dont l'avantage, il peut être réalisé directement sur des colonies isolées (ou à partir de l'antibiogramme) d'une part la rapidité dans la détection de la carbapénémase, en moins de 2 h l'hydrolyse de l'imipénème *via* le changement de couleur d'un indicateur coloré (du rouge au jaune-orangé) (<http://www.cnresistance-antibiotiques.fr/expertise-des-souches-1.html>).

Ce test a une spécificité et une sensibilité de 100 %, Il peut ainsi différencier facilement les souches productrices d'une carbapénémase (connue ou non) des souches résistantes aux carbapénèmes *via* l'association d'autres mécanismes (céphalosporinase et/ou BLSE + imperméabilité). Le Carba NP test est rapide, peu onéreux, et peut être mis en place dans n'importe quel laboratoire de microbiologie, répondant ainsi parfaitement aux exigences cliniques d'identification rapide des patients infectés par des EPC.

Avantages :

- ✓ Peu coûteux
- ✓ Peut être réalisé sur les souches isolées voir directement à partir des hémocultures positives
- ✓ Facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire (nécessite peu de moyens : matériels et réactifs)
- ✓ Sensible et spécifique (96%)
- ✓ Rapide (< 2h) sur souches isolées
- ✓ Excellence sensibilité et spécificité de détection de TOUTES les carbapénémases
- ✓ Ce test contribue à une meilleure gestion du patient et à un meilleur contrôle de la propagation des IAS.

Limites du test :

- ✓ Pas de différenciation entre les carbapénémases.
- ✓ Autres mécanismes de résistance aux carbapénèmes en dehors de l'enzymatique.

Conclusion

Au vu de l'émergence et de la dissémination actuelle des souches productrices de carbapénémases, le criblage, l'identification ainsi que le diagnostic rapide de ces bactéries multirésistantes et des mécanismes correspondants sont cruciaux et constituent un enjeu de santé publique. Seul un diagnostic rapide, spécifique, sensible et, si possible, peu onéreux peut permettre de retarder leur diffusion et d'éviter en particulier le développement d'épidémies hospitalières rapidement incontrôlables. Fort heureusement, des outils diagnostiques existent, et leur développement est en pleine expansion. À chaque laboratoire de décider, selon ses capacités financières, ses infrastructures matérielles, l'expertise de ses personnels, mais également selon les données épidémiologiques et la fréquence de suspicion de tels isolats, quelles sont les techniques les plus appropriées. Reste que la disponibilité aisée de ces différentes techniques doit rendre obligatoire leur utilisation, sachant qu'il est encore temps d'agir mais qu'il y a urgence à bloquer le processus de dissémination extensif.

Références:

1. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ; **74** : 88-90.
2. Cunningham SA, Limbago B, Traczewski M, Anderson K, Hackel M, Hindler J, Sahm D, Alyanak E, Laws A, Gulvik CA, De Man TJ. Multicenter performance assessment of Carba NP test. *Journal of clinical microbiology*. 2017 Jun 1;55(6):1954-60.
3. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Further proofs of concept for the Carba NP test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014 Feb 1;58(2):1269-.
4. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemas producing *Pseudomonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:3773–3776
5. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. Feuilles de Biologie VOL LIV N° 312 - MAI 2013 Épidémiologie, détection et

- identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases
6. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012 ; **18** : 1503-1507.
 - 7.
 8. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Multirésistance aux antibiotiques : l'émergence des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Revue francophone des laboratoires*-février. 2013 Feb 1;449:35-7.
 9. Nordmann P., Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2012 ;**68** : 487-9.
 10. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012 ; **18** : 432-8.
 11. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012 ; **50** : 477-9.
 12. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Sep 1;51(9):3097-101.

Transplantation de la matière fécale : un vrai traitement !



Par Docteur : I. KOURAR
imenekourar@gmail.com

Microbiologie clinique
Mise au point

Résumé :

La transplantation fécale a montré sa supériorité par rapport aux antibiotiques dans les infections récurrentes à *Clostridium difficile*. Proposée en traitement de première intention, elle a permis de réduire la mortalité ainsi que de guérir des patients atteints de formes graves. D'autres indications telle que la décolonisation digestive des bactéries multirésistantes sont émergentes et la meilleure connaissance du microbiote digestif permettra de proposer des thérapeutiques ciblées dans de nombreuses indications.

Mots clés : Transplantation-fécale-Clostridium difficile microbiote

Introduction :



Considérées comme un simple produit de dégradation aux origines antédiluviennes, les matières fécales sont actuellement portées au firmament par la communauté scientifique, au sens large du terme, après le succès éblouissant des premiers cas de transplantation fécale effectuée chez des patients atteints de colite pseudo-membraneuse récidivante à *Clostridium difficile*. Chaque mois, d'autres indications thérapeutiques de la transplantation fécale viennent s'ajouter à la longue liste des vertus fantasmées de ces déjections à haute valeur ajoutée potentielle et très faible coût financier. Que d'espoirs animent donc les professionnels de la santé ! Il paraît dès lors opportun pour ne pas dire judicieux de revenir aux faits objectifs de cette nouvelle classe thérapeutique avant d'en entrevoir les éventuelles applications majeures de demain.

Historique :

Cette thérapeutique était déjà utilisée dans la médecine chinoise dès le IV^e siècle par l'alchimiste Ge Hong qui en prescrivait l'administration pour le traitement de diarrhées sévères. On la retrouve encore de nos jours en Chine sous l'appellation de soupe jaune ou soupe dorée.

Le transplant fécal a été développé à la fin du XX^e siècle comme un traitement alternatif pour la colite pseudo-membraneuse.

Cette approche n'est pourtant pas tout à fait nouvelle. Elle a longtemps été utilisée chez les animaux d'élevage, par exemple, pour prévenir la salmonellose chez les poulets (1).

Qu'es qu'une transplantation fécale ?



La transplantation fécale ou *bactériothérapie fécale*, également nommée « fécalothérapie », ou pour les anglophones « *Human probiotic infusion* » (HPI) et « *fecal microbiota transplantation* » (FMT) est une thérapie qui vise à restaurer l'écologie microbienne et l'homéostasie du côlon. Le recours à la transplantation fécale est devenu l'un des standards admis par la communauté scientifique. Le principe est donc simple : on remplace un « organe » malade (le microbiote digestif) par un « organe » sain en instillant les matières fécales quasi brutes d'un donneur en bonne santé à un malade au moyen d'une sonde nasoduodénale, d'un endoscope ou encore en demandant au malade d'avaler des gélules renfermant la précieuse substance (figure 1).

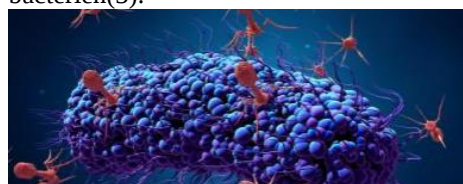
Une forme modifiée de la bactériothérapie fécale est en cours d'élaboration pour certains patients à

risque d'infection par *C. difficile* : c'est l'« auto restauration des germes fécaux », dite ARGF qui est *a priori* plus sûre, plus efficace et plus facile à administrer. Un échantillon fécal autologue est prélevé chez le patient avant le traitement médical, par exemple avant une opération ou une situation à risque. L'échantillon est stocké au réfrigérateur puis extrait dans une solution saline et filtré. Le filtrat est lyophilisé. Le lyophilisat (poudre) résultant est mis sous forme de gélules entérosolubles (résistantes à l'acide gastrique stomacal) pour restaurer la flore colique antérieure du patient en faisant concurrence à *C. difficile*. Cette procédure permet d'éviter les risques d'introduire un autre pathogène provenant d'un donneur qui n'est pas le patient. Elle permet aussi d'éviter la problématique de l'administration par sonde nasale pour atteindre le duodénum du patient.

Principe théorique :

L'hypothèse qui sous-entend la bactériothérapie fécale est qu'il existe une écologie microbienne intestinale et qu'il est possible d'utiliser une flore bactérienne équilibrée et inoffensive pour repousser des micro-organismes pathogènes.

Le microbiote est considéré comme une entité biologique, voire un organe métabolique symbiote associé à l'organisme de son hôte ; un organe composé d'un nombre d'organismes pouvant chez l'homme atteindre un total de 10^{13} /ml et pouvant inclure de 500 à 1 000 espèces différentes formant un génome collectif qui est estimé contenir 100 fois plus de gènes que le génome de l'hôte. Dans la mesure où la proportion de bactéries aérobies/anaérobies est de 1/1000 au niveau du colon, il est probable que la transplantation effective soit surtout celle du virome plus que des bactéries du microbiote. L'action des virus qui sont des bactériophages d'une bactérie *Clostridium difficile* a en effet été mise en évidence. L'infection par *Clostridium difficile* pourrait résulter d'une dysbiose du virome (déficit en virus Caudovirales). Il serait donc plus approprié de parler de phagothérapie(2). En effet, dans le cas de la bactérie *Clostridium difficile* si celle-ci est devenue résistante aux antibiotiques, elle est établie en biofilm qui n'est très probablement perturbé que par un nouvel environnement viral et non bactérien(3).



Indication :

Traitement des infections à *Clostridium difficile*

La principale indication de la transplantation fécale est la colite pseudo-membraneuse infectieuse récurrente à *Clostridium difficile*, première cause de diarrhée liée aux soins. Elle touche en particulier les sujets âgés de plus de 65 ans, notamment dans les structures de moyen ou long-séjour.

En 2015, des études ont rapporté l'intérêt de la greffe fécale en première intention dans des formes graves d'infection liées au ribotypage hypervirulent 027 alors que l'indication était réservée, jusqu'alors, aux formes récurrentes (4).

La restauration du microbiote intestinal chez les immunodéprimés

L'efficacité et la tolérance de la greffe fécale ont été montrées chez des patients présentant une immunodépression, initialement considérée comme une des principales limites dans les indications de cette technique. Incluant des patients séropositifs pour le VIH, des patients transplantés d'organes et des patients traités par immunosuppresseurs pour cancer ou pour une maladie inflammatoire de l'intestin, il a été montré l'absence de complications majeures, notamment infectieuses.

Décolonisation des bactéries multirésistantes (BMR)

Les infections à bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) et, en particulier, les entérobactéries productrices de carbapénémase, sont un problème croissant de santé publique. Leur prise en charge hospitalière comprend des mesures d'isolement renforcées et de dépistages des sujets contacts qui sont excessivement lourdes, coûteuses, voire difficilement applicables. La prise en charge par antibiotiques de ces colonisations est non seulement néfaste mais totalement inutile. Récemment des essais cliniques ont montré l'efficacité d'une greffe de microbiote fécal dans des cas de colonisation par des *Escherichia coli* et des *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémase ainsi que des entérocoques résistants à la vancomycine et les *Staphylococcus aureus* méticillino-résistants. Des études complémentaires sont en cours pour explorer cette piste de traitement (5).

Autres indications

D'autres indications, non infectieuses, ont été proposées. Parmi les principales, on peut citer les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et en particulier la maladie de Crohn (6). De nombreux travaux s'intéressent également aux troubles fonctionnels intestinaux. Cependant, que ce soit dans cette dernière indication ou dans des indications liées à l'axe supposé entre cerveau et microbiote digestif (autisme, maladie de Parkinson,

dépression etc.), les niveaux de preuve restent jusqu'à présent nettement moins satisfaisants que dans les indications infectieuses (7-8).

Effets secondaires :

Les effets secondaires sont rares et le plus souvent modérés (9). La plupart des effets secondaires observés sont surtout digestifs avec environ 75 % des patients qui présentent des diarrhées et 50 % qui déclarent avoir des douleurs abdominales dans les heures suivant la transplantation fécale. Un faible nombre de patients disent souffrir de constipation à la suite de la greffe. Les effets secondaires graves comme des bactériémies causées par des entérobactéries, parfois fatales, ou des perforations intestinales, sont rares.

Perspectives :

La création de banques de microbiotes, qui est déjà initiée, sera une étape indispensable au développement de la pratique (10). Si l'approche empirique, utilisant un microbiote entier, demeure la principale méthode qui a prouvé jusqu'à présent son efficacité, une meilleure connaissance des bactéries à l'origine de différentes pathologies permettra probablement d'envisager un traitement les ciblant spécifiquement.

Conclusion :

La transplantation fécale a révolutionné la prise en charge des infections récidivantes à *C. difficile* avec des taux d'efficacité de l'ordre de 90 %. Bien que des essais contrôlés soient encore nécessaires, cette approche semble également efficace pour le traitement des formes réfractaires ou compliquées en alternative à la chirurgie.

References :

1. Sanders WE, Sanders C, « *Modification of normal flora by antibiotics: effects on individuals and the environment* », New Dimensions in Antimicrobial Chemotherapy, 1984, p. 217-241.

2. T. Zuo et al. *Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection is associated with treatment outcome*. Gut, vol. 67, no 4, p. 634-643, avr. 2018.

3. Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. Am J Gastroenterol 2014; 109: 1065-1071.

4. Singh R, Nieuwdorp M, ten Berge IJ, et al. The potential beneficial role of faecal microbiota transplantation in diseases other than *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 1119-1125.

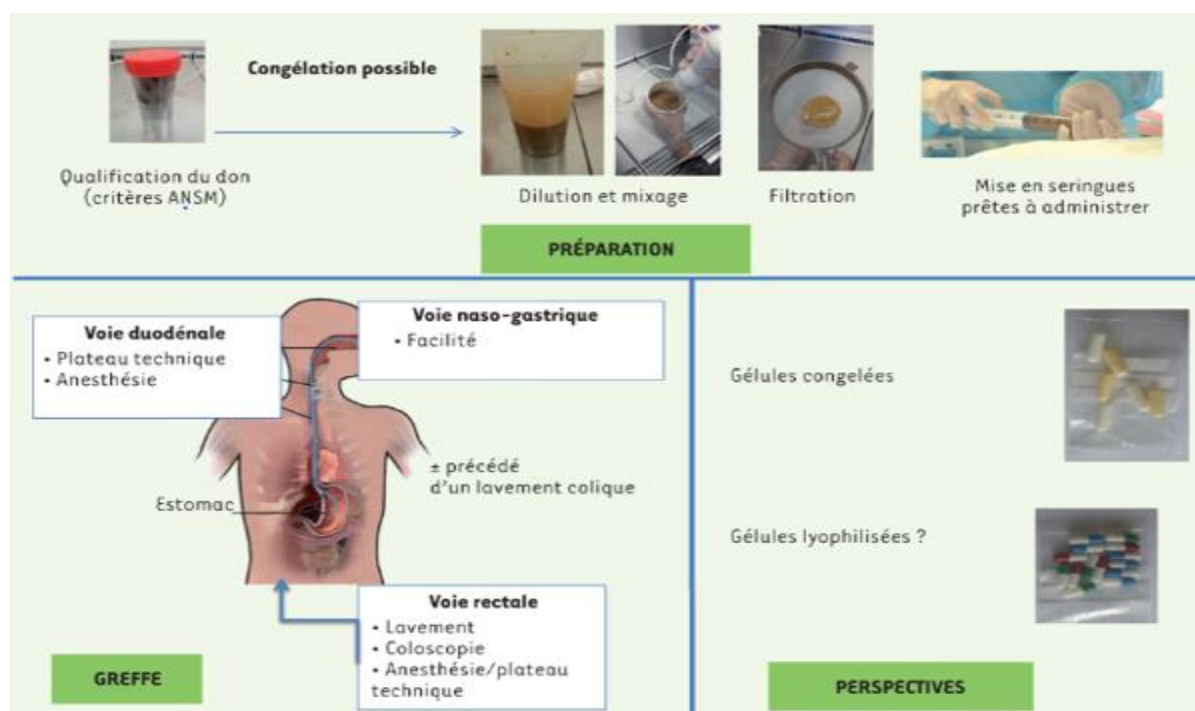
5. S Collins Z Kassam P. Bercik. The adoptive transfer of behavioral phenotype via the intestinal microbiota: Experimental evidence and clinical implications. Curr Opin Microbiol 2013 ;16.

6. E Hsiao S McBride S Hsien. The microbiota modulates gut physiology and behavioral abnormalities associated with autism. Cell 2013;155.

7. Baxter M, Colville A. Adverse events in faecal microbiota transplant: a review of the literature. J Hosp Infect 2016; 92: 117-127.

8. Costello SP, Tucker EC, La Brooy J, et al. Establishing a fecal microbiota transplant service for the treatment of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2016 ; 62 : 908-914.

Figure-1. Méthode de préparation et modes d'administration de la transplantation fécale.



Syndrome Hémorragique : Comment Procéder dans un laboratoire d'hémodiagnostic ? Partie 2 « Coagulation »



Dr Khebrim .MK

khebrim@yahoo.fr

Hémodiagnostic et transfusion sanguine

MISE AU POINT

La coagulation plasmatique est l'ensemble des réactions biologiques conduisant à transformer un liquide (le plasma) en un gel constitué de fibrine. La fibrine provient du clivage enzymatique du fibrinogène par la thrombine, qui est l'enzyme-clé de la coagulation. La coagulation se déroule en plusieurs étapes consécutives : initiation de la coagulation, formation des complexes ténase, formation des complexes prothrombinase, formation de la fibrine, et stabilisation de la fibrine.

La conception classique de la coagulation décrit deux voies différentes pour aboutir à la production de thrombine : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La diminution de l'activité coagulante d'une protéine est due à quatre mécanismes : la réduction de sa synthèse, une synthèse anormale, l'accélération de son catabolisme, la présence d'un inhibiteur.

La diminution de cette activité pourrait être responsable d'un syndrome hémorragique profond, d'intensité variable.

Mots clés : *Coagulation, Temps de Céphaline Activateur, Temps de Quick, Syndrome hémorragique.*

L'exploration de la coagulation s'inscrit dans le cadre du dépistage d'anomalies exposant au risque de saignement (ou de thrombose qui ne seront pas traités dans cet article), du suivi d'un traitement antithrombotique ou de l'évaluation du retentissement d'une pathologie.

Les anomalies de la coagulation sont responsables d'un syndrome hémorragique de type profond : Hémorragies touchant les tissus profonds (articulation, muscle, etc.), saignement provoqué par un traumatisme minime, saignement retardé

Cette exploration s'appuie essentiellement sur l'utilisation de tests plasmatiques explorant les étapes initiales de la coagulation et sur des tests analytiques mesurant la quantité et l'activité des molécules mises en jeu au cours de la coagulation.

Une bonne conduite d'interprétation des différents tests permis, en règle générale, à l'identification de l'anomalie.

Etape pré-analytique :

La phase pré analytique est primordiale pour assurer la fiabilité des résultats et doit éviter toute activation artéfactuelle de la coagulation, source de résultats erronés.

✓ Prélèvement :

Le prélèvement est effectué par ponction veineuse franche, le garrot est peu serré, idéalement le patient est au repos depuis au moins 10 mn et à jeun de matière grasse. L'anticoagulant est le citrate de sodium, chélateur du calcium qui empêche la coagulation du sang (9volume de sang/1volume d'ATC). Le mélange sang/anticoagulant est assuré immédiatement par retournements successifs et lents, pour éviter tout début de coagulation.

✓ Transport :

Le délai entre le prélèvement et le traitement des échantillons doit être le plus court possible, au maximum 2 ou 3 heures.

Obtention d'un plasma pauvre en plaquettes :

Les prélèvements sont centrifugés au laboratoire de façon à séparer le plasma des cellules sanguines (obtention d'un plasma pauvre en plaquettes : PPP) à 2500g pendant 15 minutes.

✓ Conservation du PPP :

Le plasma peut être congelé soit à -30°C ou -80°C et au moment de l'essai le décongelé à 37°C.

Principaux Tests de l'hémostase :

Le principe de ces tests est d'induire la formation du caillot à partir du plasma et de mesurer le temps de formation initiale du caillot.

Chaque méthode va évaluer une ou plusieurs étapes de la coagulation, la détection de ces caillots formés se fait par des méthodes chronométriques, électromécaniques ou optiques.

✓ TEMPS DE QUICK :

• Principe :

Repose sur la mesure du temps de coagulation (en sec) à 37°C d'un plasma citraté recalcifié en présence de thromboplastine.

Le temps est ensuite converti en pourcentage par comparaison à une droite d'étalonnage obtenue en mesurant le temps de coagulation d'un pool de plasmas normaux à différentes dilutions. La mesure peut se faire en manuel au bain marie ou sur les automates de coagulation.

• Résultats :

⇒ Le temps de Quick est pathologique s'il dépasse le témoin de 2 Secondes ou plus

⇒ Taux de prothrombine : 70 - 100 %

✓ TEMPS DE CÉPHALINE PLUS ACTIVATEUR :

• Principe :

Repose sur la mesure du temps (en sec) de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes recalcifié en présence de céphaline et d'un activateur de système de contact.

La mesure peut se faire en manuel au bain marie ou sur les automates de coagulation.

Remarque : Le TCA est un test extrêmement réactif-dépendant et les nombreux réactifs présents sur le marché contiennent des phospholipides de nature et de concentration variées et des activateurs différents selon les fabricants. Les réactifs utilisant le kaolin comme activateur sont particulièrement sensibles aux déficits en facteurs et donc à privilégier pour le dépistage des déficits en facteurs de coagulation.

• Résultats :

Les résultats sont interprétés par rapport à un témoin ou sous forme de rapport TCA malade / TCA témoin.

Valeurs normales :

⇒ TCA dépassant le Témoin de 10 Secondes

⇒ Rapport < 1,2 ou < 1,3 chez le nouveau-né et le jeune enfant.

TCA nettement allongé en cas de déficit sévère, modérément allongé en cas de déficit modéré ou mineur.

Rapport TCAm / TCAt > 1,2.

✓ DOSAGE DE FIBRINOGENE :

• Principe :

Il s'agit d'une méthode chronométrique fonctionnelle qui repose sur la mesure du temps (en sec) de coagulation à 37°C d'un plasma citraté, dilué, pauvre en plaquettes, recalcifié en présence d'un excès de thrombine. Ce temps est proportionnel à la concentration en fibrinogène, une droite de calibration est donc réalisée, à l'aide d'un plasma titré en fibrinogène. La mesure peut se faire en manuel au bain marie ou sur les automates de coagulation.

• Résultats :

Le taux de fibrinogène est normal si son taux est compris entre 1.5 et 3.5 g/L).

Le dosage des facteurs VIII et IX peut se faire aussi par méthode chromogénique, les résultats sont exprimés en pourcentage de la normale.

✓ TEST DE GENERATION DE THROMBINE :

Le but de la thrombinographie est de suivre quantitativement la concentration de thrombine active dans un échantillon sanguin en fonction du temps en réponse à un stimulus donné.

La concentration de thrombine mesurée est, à tout moment, le résultat de la génération et de l'inhibition de sa synthèse.

Même si certaines étapes de l'hémostase ne sont pas explorées, ce test a l'avantage d'être sensible à tous les inhibiteurs de la coagulation actifs dans le sang circulant.

Intérêt :

Les résultats de l'étude de génération de thrombine par thrombinographie reflètent, mieux que l'ensemble des tests de l'hémostase jusqu'ici disponibles, le phénotype hémorragique ou thrombotique d'un patient.

Interprétation des anomalies des Tests de la coagulation :

✓ ALLONGEMENT ISOLE DU TEMPS DE QUICK : (Figure 1)

- Un allongement isolé du TQ, sans allongement du TCA, évoque l'existence d'un déficit isolé en facteur VII, exceptionnellement constitutionnel, plus souvent observé au début d'un traitement par les AVK ou d'une hypovitaminose K. Cet effet précoce est dû à la courte durée de vie du facteur VII.
- Une insuffisance cellulaire hépatique modérée entraîne des déficits modérés des facteurs de coagulation synthétisés dans le foie avec un allongement du TQ qui peut très bien ne pas être accompagné d'un allongement du TCA parce que ce test a une moindre sensibilité.

✓ ALLONGEMENT ISOLÉ DU TEMPS DE CÉPHALINE ACTIVATEUR : (Figure 2)

- L'HNF allonge le TCA qui est utilisé pour la surveillance de cet antithrombotique. Les héparines de bas poids moléculaire n'allongent que modérément et de façon inconstante le TCA, qui n'est utilisé dans ce cas que pour dépister un éventuel surdosage.
- Une fois la présence d'un ACC éliminée, l'allongement isolé du TCA doit faire envisager un déficit isolé en l'un des facteurs de coagulation explorés spécifiquement par le TCA (facteurs XII, XI, prékallikréine, KHPM, VIII, IX) : le dosage spécifique de chacun de ces facteurs permet le diagnostic.
- Dans un contexte clinique évocateur (hémorragies essentiellement cutanéomuqueuses), un déficit isolé en facteur VIII, même s'il n'est pas associé à un allongement du temps de saignement, doit amener à explorer le facteur Willebrand.

✓ ALLONGEMENT ASSOCIÉ DU TEMPS DE CÉPHALINE ACTIVATEUR ET DU TEMPS DE QUICK : (Figure 3)

- Un allongement associé du TCA et du TQ s'observe dans une hypovitaminose K et chez les sujets traités par les AVK au long cours : Les taux de facteurs II, VII et X sont diminués ; le taux de facteur V est normal ; le nombre des plaquettes est normal.
- En cas d'insuffisance hépatocellulaire et en fonction de la sévérité de l'atteinte hépatique, les taux de facteurs II, VII, X et V diminuent et le déficit entraîne un allongement du TQ et à un moindre degré du TCA. Le taux de fibrinogène est variable, comme le nombre de plaquettes. Le taux de facteur VIII n'est pas diminué puisque la synthèse de cette protéine n'est pas majoritairement hépatocytaire.
- Dans un contexte clinique particulier (septicémies, néoplasies, brûlures étendues, pathologie obstétricale, chirurgie...), l'allongement du TQ et du TCA peut traduire l'existence d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)
- Les ACC de type antiphospholipides allongent simultanément le TCA et le TQ, s'ils sont puissants.
L'absence de correction du TCA par le plasma normal prouve la présence de l'inhibiteur.
- Les inhibiteurs de la fibrinoformation allongent le temps de thrombine, mais peuvent aussi, s'ils sont en concentration élevée, allonger le TCA et le TQ : ce sont des inhibiteurs de la polymérisation de la fibrine (dysglobulinémies) ou des produits de dégradation de la fibrine (CIVD, fibrinolyse aiguë, traitements thrombolytiques).

✓ TEMPS DE THROMBINE (TT) :

- Principe :

C'est le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma citraté déplaqué, en présence d'une quantité standardisée de thrombine diluée et de Ca²⁺.

La vitesse de coagulation est fonction de la quantité et de la qualité du fibrinogène et de la présence ou

non d'inhibiteurs de la fibrinoformation (héparine non fractionnée [HNF], produits de dégradation de la fibrine, anticorps anti-thrombine...).

Le TT n'explore pas le facteur XIII.

Les résultats sont exprimés en secondes, par référence à un témoin.

Les Valeurs Normales :

L'expression des résultats se fait sous forme d'un rapport M/T (temps du malade/temps du témoin).

L'allongement du temps de thrombine est significatif pour un rapport M/T > 1,20.

Le TT est sensible :

-Taux de fibrinogène.

-Dysfibrinogénémies, afibrinogénémie.

-Présence d'un inhibiteur de la thrombine (héparine+++, Immunoglobuline monoclonale, PDF, Anticorps antithrombine...).

✓ TEMPS DE REPTILASE :

- Principe :

C'est le temps de coagulation 37 °C d'un plasma citraté déplaqué, en présence d'un venin de serpent activateur direct du facteur X.

Ce test, normal en présence d'héparine, permet d'identifier les allongements du temps de thrombine dus à la présence d'héparine. Ce test n'est plus couramment utilisé.

✓ DOSAGE SPECIFIQUE DES FACTEURS DE COAGULATION :

Les dosages spécifiques des facteurs de la coagulation ne sont effectués qu'en cas d'allongement des tests de dépistage (TQ ; TCA).

Le dosage des facteurs II, V, VII, X se fait par méthode chronométrique dans un système TQ ; à l'aide de réactifs déficients dans le facteur à doser.

Le dosage des facteurs VIII, IX, XI se fait par méthode chronométrique dans un système TCA, à l'aide de réactifs déficients dans le facteur à doser.

Stratégie diagnostique devant un allongement du TQ

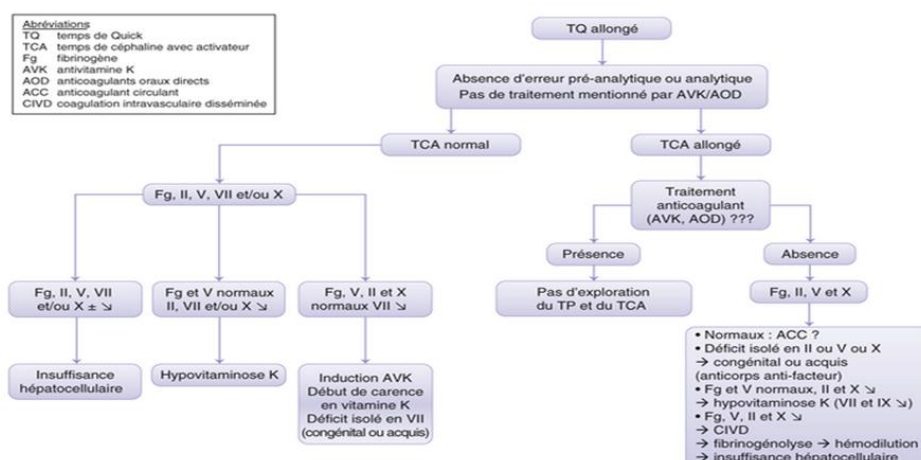


Figure 1 : Arbre Décisionnel : Démarche Diagnostic devant un allongement isolé du Temps de Quick

Conduite à tenir devant un TCA allongé

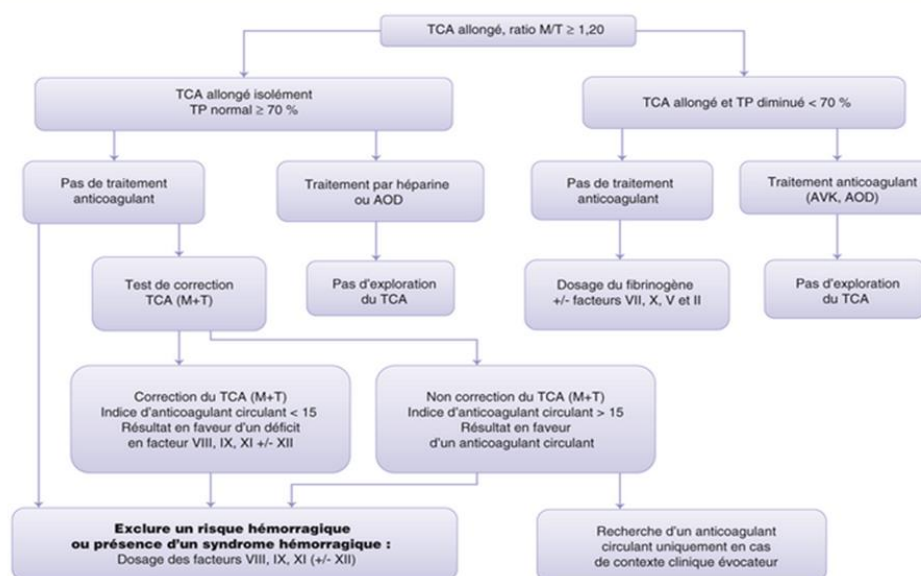


Figure 2 : Arbre Décisionnel : Démarche Diagnostic devant un allongement isolé du Temps de Céphaline Activateur

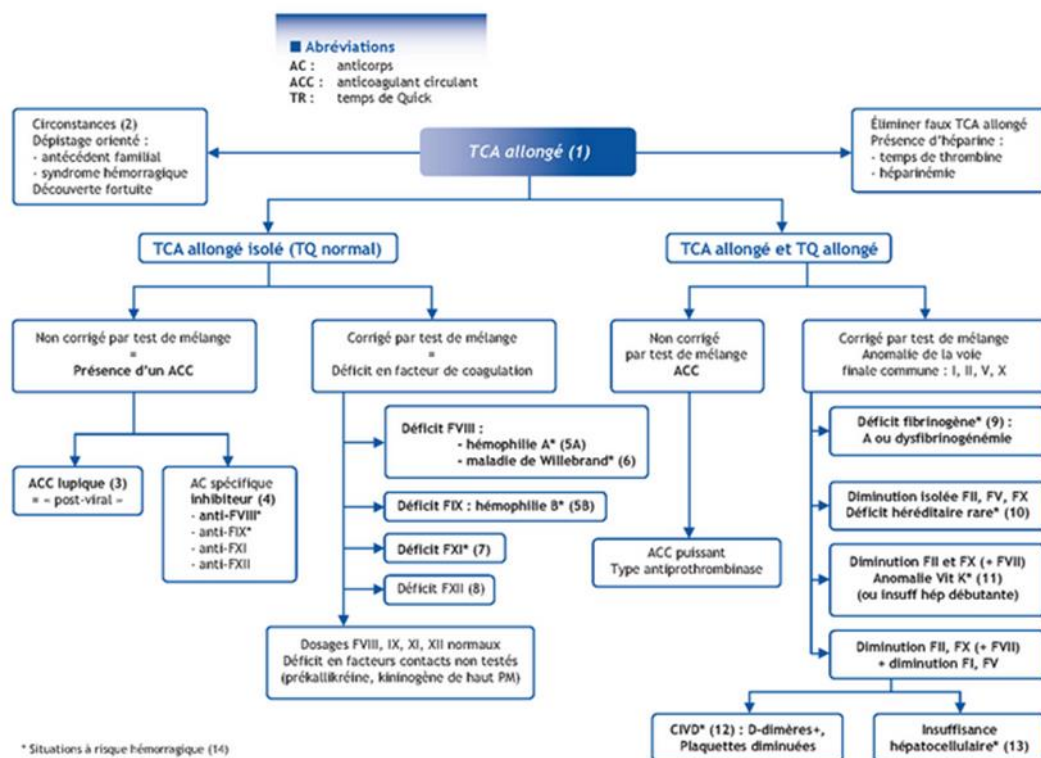


Figure 3 : Figure 1 : Arbre Décisionnel : Démarche Diagnostic devant un allongement Associé du Temps de Quick et du Temps de Céphaline Activateur

Références :

- [1] Galli M, Dlott J, Norbis F, Ruggeri L, Cler L, Triplett DA et al. Lupus anticoagulants and thrombosis: clinical association of different coagulation and immunologic tests. *ThrombHaemost* 2016 ; 84 : 1012-1016
- [2] Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic genopolymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2009 ; 95 : 1517-1532

- [3] Recommandations du GEHT. Les variables préanalytiques en hémostase. *STV* 2018 ; (n° spécial) 3-40

- [4] Sampol J, Arnoux D, Bouthière B. Manuel d'hémostase. Paris : Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier, 2019

- [5] Exploration de la coagulation
 A Bezeaud, MC Guillin, 2017 Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. Encyclopédie Médico-Chirurgicale

Erreurs de détermination de la NFS par les automates d'hématologie cellulaire

Partie2 : Erreurs de numération des globules rouges et les constantes hématimétriques



N. Benkhelfallah
LCBM CLCC Batna
nabila.benkhelfallah@gmail.com

Résumé: De diverses situations induisent à une anomalie de numération des globules rouges (GR) incluant l'hyperlipémie, les agglutinines, les cryoglobulines, hyperleucocytose. Les fausses augmentations ou diminutions de la numération des GR sont variablement observés selon la technologie utilisée. Avec la technique par impédance, la numération des GR se fait grâce à des impulsions électriques générées par les GR traversant l'orifice de comptage permettant de détecter à la fois le nombre et le volume des GR c'est ainsi que les anomalies de détermination de GR qui peuvent ou non être associées aux anomalies de détermination des constantes hématimétriques qui sont le volume globulaire moyen (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en Hémoglobine (CCMH)

Mots clés : GR-VGM-CCMH.

A-Anomalies de numération de globules rouges (GR)

o Fausses augmentations

1-Cas d'Hyperleucocytose : les grandes hyperleucocytoses à un taux > 100 G/L peuvent induire des modifications significatives de la numération des GR, surtout chez les sujets anémiques atteints d'une leucémie myéloïde chronique et en cas de lymphome à petites cellules [1]. Le nombre de GR réel est calculé par soustraction du nombre de leucocytes.

2-Plaquettes géantes : peuvent être énumérés comme GR mais les perturbations restent modestes.

o Fausses diminutions

1-Les agglutinines froides : A une température < 37°C et en présence d'agglutinines froides (même en présence d'agglutinines à anticorps chauds) les GR s'agrègent et seront énumérés comme une seule population, les plus volumineux sont négligés. On va avoir un nombre de GR sous-estimé,

2- L'hémolyse in vitro : induit une diminution des GR, de l'Hb et les indices érythrocytaires.

B- Anomalies de détermination du VGM

o VGM faussement augmenté

1- les agglutinines froides : diminution des GR (parfois diminution des plaquettes), augmentation du CCMH

2-L'hyperleucocytose : avec augmentation du nombre des GR

3-Hyperglycémie : l'augmentation du VGM est directement lié à la quantité du glucose intra érythrocytaires [1]

4- Autres :

L'hypernatrémie

Excès de l'EDTA K2

Sang vieilli : plus de 24 H

o Fausse diminution :

En cas d'hyponatrémie

C-Anomalies de détermination de CCMH

1-En plus de l'hyperleucocytose et les agglutinines froides et chaudes, le CCMH peut être faussement augmenté en présence d'un taux élevé de bilirubine et des médicaments immunosuppresseurs. En revanche l'hyperglycémie induit sa diminution VGM surestimés et un CCMH élevé ce qui est pathognomonique des agglutinines froides [2]. Le taux de l'Hb reste normal. Le chauffage de l'échantillon au bain marie à 37°C confirme leur présence.

2-Les cryoglobulines : induisent une diminution du nombre de GR et du taux de l'hémoglobine. Cette diminution est liée aux problèmes d'aspiration causés par l'hyperviscosité du sang générée par le taux élevé des protéides.

3-Les microcytes/les schizocytes : induisent une sous-estimation des GR avec une surestimation des Plaquettes [1].

4-Problèmes liés à la qualité de l'échantillon : l'échantillon peut être coagulé, une homogénéisation insuffisante est souvent la cause. L'échantillon peut être dilué par excès de l'anticoagulant (EDTA K3) surtout en néonatalogie [3].

Conclusion

Les erreurs de déterminations de l'hémogramme ont progressivement conduit à des améliorations

des technologies utilisées. L'optimisation du traitement informatique a abouti aux développements des messages

D'alertes qui sont informatifs devant les variables analytiques liées aux patients. Cependant les variables prés analytiques sont sans doute à considérer.

Références

1- Zandecki M.C Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire Partie 3. Hémoglobine, hématies, indices érythrocytaires,

réticulocytes,biologie Annales de biologie clinique,2012 ;70(2)/155-68

2. Petrucci JV, Duanne PA, Chapman CC. Spurious erythrocyte indices as measured by the model S Coulter counter due to cold agglutinins. Am J Clin Pathol 1971 ; 56 : 500-2.

3. Pewarchuk W, VanderBoom J, Blajchman MA. Pseudopolycythemia, pseudothrombo-cytopenia, and pseudoleukopenia due to overfilling of blood collection vacuum tubes.Arch Pathol Lab Med 1992 ; 116 : 90-2.

Suivi thérapeutique pharmacologique du Méthotrexate au décours de son administration à haute-dose: les principes



Pharmacologie
Mise au point

N. ACHACHI^{1,2}, D. MATMOUR², H. TOUMI², A. KASSAH LAOUAR¹,

¹Laboratoire Central de biologie Médicale, Centre de Lutte Contre le Cancer, Batna. nawel.ach@gmail.com

²Laboratoire de Recherche en Développement Pharmaceutique, Service de Pharmacovigilance, EHU 1^{er} Novembre, Faculté de Médecine d'Oran.

Résumé : Le suivi thérapeutique pharmacologique du méthotrexate est assez unanimement proposé lorsque ce médicament est administré à haute dose dans divers protocoles de chimiothérapie. L'objectif est de déceler précocement les patients chez qui l'élimination du médicament est retardée et qui présentent de ce fait un risque accru de toxicité. Cette pratique, qui fait effectivement l'objet de recommandations figurant dans le résumé des caractéristiques du produit des spécialités correspondantes, repose sur un faisceau d'arguments cliniques montrant un lien entre des concentrations élevées et le risque de toxicité. Ainsi l'analyse de la littérature confirme qu'il existe des valeurs seuil à divers temps de prélèvements, au-delà desquelles le risque de toxicité augmente. Le résultat du dosage est utilisé pour adapter les mesures de sauvetage par administration d'acide folinique et/ou intensification de l'hyperhydratation alcaline, ou par l'administration de carboxypeptidase dans les situations nécessitant une prise en charge immédiate.

Mots clés : Méthotrexate à haute dose, dosage, toxicité, valeurs seuil, acide folinique

Introduction

Un des problèmes majeurs de la chimiothérapie anticancéreuse est celui de la variabilité, qui se manifeste tant au niveau de la réponse thérapeutique qu'au niveau de la tolérance au traitement. De plus, l'une des ses grandes difficultés réside dans l'étroitesse de l'index thérapeutique. Administrés à forte dose, les médicaments anticancéreux peuvent provoquer des toxicités aiguës sévères, voire létales ; mais un sous-dosage peut modifier le pronostic vital. Il faut tenir compte de l'effet dose et donc de l'intensité de dose. Ce concept incite à doser les médicaments pour guider leur posologie et essayer d'atteindre une efficacité optimale pour une toxicité minimale. Le méthotrexate (MTX) est un médicament antinéoplasique qui, depuis son découvert en 1948, a vu son champ d'application s'étendre et c'est en cherchant à vaincre les résistances à ce médicament que le concept de MTX à haute dose, a été proposé [1].

Le MTX est utilisé seul ou en association en général à la posologie de 3 à 8 g/m², mais parfois beaucoup plus dans certains sarcomes. Ses principales indications sont les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), les lymphomes non hodgkiniens et notamment les lymphomes cérébraux, les lymphomes de Burkitt et les sarcomes de l'adulte et de l'enfant. Il est également utilisé à faibles doses (10 à 15 mg) par voie intrathécale pour la prophylaxie ou le traitement des atteintes méningées. À des doses moindres, il est utilisé dans les carcinomes épithéliaux ORL ou urothéliaux, les adénocarcinomes mammaires ou ovariens, les tumeurs malignes placentaires, les carcinomes bronchiques à petites cellules [2]. Ainsi que dans diverses pathologies inflammatoires et auto-immunes [3].

Données pharmacologiques

Le MTX est un antimétabolite phase-dépendant, analogue de l'acide folique. Il agit en faux substrat, inhibe de manière compétitive l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme-clé du métabolisme des folates et induit un déficit en bases puriques et pyrimidiques, aboutissant à un défaut de synthèse de l'ADN et un blocage du cycle cellulaire en phase S. Sa pharmacologie et son élimination rénale sont bien décrites et permettent d'appréhender la gestion d'une toxicité parfois très sévère notamment après utilisation à fortes doses [2].

Le MTX est une petite molécule (PM 454 d) qui circule majoritairement sous forme liée à l'albumine (50-80 %) ou libre [4]. Son volume de distribution est évalué à 0,76 l/kg avec une diffusion principalement dans l'espace extracellulaire mais avec la capacité de pénétrer les membranes cellulaires et, à haute dose, la barrière hémato-méningée. Par ailleurs, le MTX peut se concentrer dans tout troisième secteur éventuel (épanchement pleural, ascite). L'hypoalbuminémie ou un troisième secteur peuvent être à l'origine d'une élimination prolongée et représentent des situations à risque de toxicité.

Le MTX est principalement métabolisé en 7-OH-MTX (métabolite inactif) et en dérivés poly-gamma-glutamyl actifs. L'élimination principale est urinaire sous forme inchangée et se fait à 60 à 90 % en 24 heures. Cette élimination implique partiellement une sécrétion tubulaire proximale [2].

Modalités de l'utilisation du MTX à haute dose

L'administration du MTX à forte dose obéit à des règles bien établies et doit être réalisée en milieu spécialisé.

Les hautes doses de MTX ($> 500 \text{ mg/m}^2$) sont toujours délivrées avec une administration séquentielle d'acide folinique (« sauvetage par l'acide folinique ») et sous couvert d'une diurèse alcaline et abondante. La fonction rénale, le bilan hépatique, l'albuminémie, l'hémogramme et le pH urinaire doivent être attentivement analysés avant le début et au décours de la perfusion.

Il faut proscrire l'utilisation concomitante de médicaments entrant en compétition pour la liaison protéique ou la sécrétion tubulaire rénale (AINS, cotrimoxazole) et les agents néphrotoxiques (aminosides, ciclosporine, etc).

En règle générale, les doses de MTX sont diminuées de 50 % en cas de clairance de la créatinine entre 30 et 60 mL/min et de 75 % entre 10 et 30 mL/min.

Le MTX et le 7-OH-MTX sont nettement plus solubles à pH basique (> 7). Il est donc fondamental d'obtenir avant son administration une alcalinisation des urines pour en faciliter l'excrétion et éviter sa précipitation intratubulaire. L'alcalinisation urinaire est obtenue par perfusion de bicarbonates de sodium isotonique (NaHCO_3 à 14%) et doit être prolongée tant qu'il persiste une concentration sérique de MTX détectable. Le MTX ne doit pas être débuté si le pH urinaire est inférieur à 7.

L'acide folinique, antidote du MTX, reconstitue la réserve cellulaire de folates réduits et rétablit la synthèse des nucléotides. Le dosage de la concentration plasmatique de MTX permet en effet d'évaluer le risque de toxicité et d'adapter individuellement les doses d'acide folinique (Tableau I). [2]

Gestion de surexposition en MTX

La toxicité du MTX à haute dose est essentiellement hématopoïétique (thrombopénie, leucopenie, plus rarement anémie, agranulocytose ou pancytopenie), rénale (augmentation de la créatininémie) et hépatique (augmentation des transaminases), des mucites gastro-intestinales, des hépatites, des vomissements importants, des dermatites desquamatives et, surtout, des néphrotoxicités responsables du retard d'élimination du médicament, ayant parfois conduit au décès de certains patients [1, 2, 5].

En présence de concentrations très supérieures aux valeurs attendues à un temps de prélèvement donné ou d'altération précoce de la fonction rénale, deux stratégies peuvent être mises en œuvre selon l'intensité de la surexposition [6] :

- Intensification du sauvetage par acide folinique et l'hydratation alcaline selon les abaques donnés dans les divers protocoles.
- Administration de carboxypeptidase G2 : la réalisation systématique du dosage sanguin du MTX permet également d'objectiver ou de confirmer une surexposition franche, situation

nécessitant une prise en charge particulière immédiate, notamment par l'administration de carboxypeptidase. Widemann et al. indiquent que l'utilisation de la carboxypeptidase est justifiée lors des surexpositions au MTX caractérisées par une méthotrexatémie à $h 48 > 10 \mu\text{M}$ [7].

– Dialyse : l'hémodialyse à haut débit semble être la méthode la plus efficace avec une diminution médiane des concentrations de MTX de 75,7% (42-94%) en un temps médian de 4 heures (4-12 heures) [8]. L'efficacité n'est que partielle car on observe souvent un rebond de concentrations du au relargage tissulaire mais cette méthode ne doit pas être négligée.

Modalités de STP du MTX à haute dose

Indications et justificatifs du dosage

Le suivi thérapeutique du MTX est recommandé en raison de l'importante variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique de ce produit : les concentrations plasmatiques/sériques peuvent varier d'un facteur 1 à 7 après administration d'une même dose à des patients différents. Il est particulièrement justifié en cas d'association à la ciclosporine (diminution réciproque des clairances des deux médicaments) et aux sulfamides antibactériens (déplacement de la liaison aux protéines plasmatiques), chez les sujets dont la fonction rénale ou hépatique est altérée et chez les patients âgés.

Le STP permet de vérifier que la posologie est efficace, sans atteindre la zone de toxicité. Il permet ainsi une meilleure adaptation posologique. Dans le traitement de la LAL de l'enfant et dans celui de l'ostéosarcome, il a été montré une relation entre l'exposition au produit et l'efficacité thérapeutique (une augmentation du taux de rémission à 5 ans); ainsi, dans un essai randomisé mené chez des enfants atteints de LAL de type B, une augmentation significative du taux de rémission complète a été retrouvée dans le groupe ayant bénéficié d'un suivi thérapeutique.

Enfin, des dosages répétés des concentrations plasmatiques/sériques du MTX sont utiles à la détermination de la dose et de la durée du traitement de sauvetage par l'acide folinique[3].

Niveau de preuve

Le suivi des concentrations plasmatiques du MTX, avec pour corollaire la mise en œuvre des mesures d'hyperhydratation et de sauvetage par l'acide folinique, contribue à limiter l'incidence et/ou la gravité des manifestations toxiques au décours des traitements par le MTX à haute dose, même si aucune étude comparative n'a été menée pour le démontrer [6]. Les comparaisons historiques indiquent que l'incidence des décès toxiques serait passée de 5-6 % dans les années 70 à moins de 0,1 % avec cet ensemble de mesures [9]. De même, une revue des études publiées, effectuée par Widemann

et al. [7] montrait que, depuis les années 80, l'incidence des néphrotoxicités de grade ≥ 2 ne serait plus que de 1,8 %. À noter que leur travail ne prenait pas en compte les patients traités pour un lymphome cérébral, souvent plus âgés et à risque probablement augmenté de néphrotoxicité.

L'efficacité de ces mesures n'a pas été démontrée par des études comparatives mais Selon la définition du groupe STP de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique et parmi les niveaux de preuve du suivi thérapeutique pharmacologique (indispensable, fortement recommandé, recommandé, éventuellement utile, restant à évaluer), celui du méthotrexate est considéré comme « recommandé » [6].

Recommandations pré-analytiques

- Prélèvement : sérum pour toutes les techniques, sérum ou plasma pour les techniques immunologiques. Éventuellement urine, LCR, autres liquides biologiques pour l'HPLC.
- Contenant : tube en verre sec, sans séparateur, sec (pour le sérum) ou contenant de l'héparine, de l'EDTA, de l'oxalate de potassium ou du fluorure de sodium (pour le plasma).
- Renseignements cliniques indispensables : heure de début et durée de la perfusion, horaires et quantités de l'hyperhydratation alcaline, traitements associés et fonction rénale.
- Conservation et acheminement du prélèvement
Instable à la chaleur et à la lumière :
 - décanter le sang rapidement ;
 - congeler (-20°C ou -80°C) ;
 - protection de la lumière indispensable.
- Durées de conservation :
 - quelques heures à $+4^{\circ}\text{C}$ et à l'obscurité
 - quelques jours à -20°C et à l'obscurité.
- Horaires préférentiels de prélèvement : le suivi habituel repose sur des mesures de concentration réalisées à intervalles périodiques, le temps. Les modalités précises du suivi, et en particulier les horaires des contrôles, sont généralement décrites par le protocole clinique dans lequel le patient est inclus [6]. Ils dépendent des paramètres recherchés et du mode d'administration.
 - Pour un simple suivi thérapeutique, surtout pour une perfusion de courte durée (< 8 heures), un prélèvement quelques minutes avant la fin de la perfusion et des prélèvements, étant compté à partir du début de la perfusion[5, 6], à 24, à 48 et à 72 heures, voire 96 heures ou plus, suffisent.
 - Pour une adaptation de posologie lors de perfusions longues, les mêmes prélèvements sont utiles, plus deux prélèvements à la 4e et 5e heure de perfusion, pour modifier éventuellement la posologie au changement de flacon à 6 heures révolues. Si la perfusion dure 36 heures, un prélèvement peut être effectué à la 23e heure pour une éventuelle modification de posologie à 24 heures révolues, au changement de flacon. Pour une

adaptation de posologie de l'acide folinique, un prélèvement peut être effectué dès la 12e heure après la fin de la perfusion.

Ces horaires pour l'adaptation de posologie correspondent à une perfusion de MTX précédée d'une hyperhydratation alcaline lors des 12 heures précédentes.

D'autres protocoles sont possibles. Dans tous les cas, il faut indiquer l'heure réelle des prélèvements. [3]

Méthodes de dosage

Le dosage du MTX inchangé repose sur des méthodes immunochimiques [FPIA (« Fluorescence Polarization Immunoassay ») ou EMIT (« Enzyme Multiplied Immunoassay Test ») principalement]. En revanche, une méthode « High Performance Liquid Chromatography » (HPLC) doit être utilisée pour le suivi de la concentration de méthotrexate après administration de carboxypeptidase G2 afin d'éviter l'interférence de l'anticorps avec l'acide 4-amino-4-deoxy-N-méthylptéroïque (DAMPA), produit de dégradation du MTX issu de l'hydrolyse enzymatique [6].

Interprétation des résultats

Zones thérapeutiques et concentrations cibles

Ostéosarcome de l'enfant ou du jeune adulte : une Cmax en fin de perfusion (perfusion de 4 à 6 heures) supérieure à 10^{-3} M serait corrélée à une probabilité plus élevée de réponse de la tumeur et de durée de survie sans rechute.

Leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant : une concentration plasmatique à l'état stable (= bolus + perfusion de 24 heures) supérieure à $16\mu\text{M}$ serait associée à une réduction du risque de rechute [3].

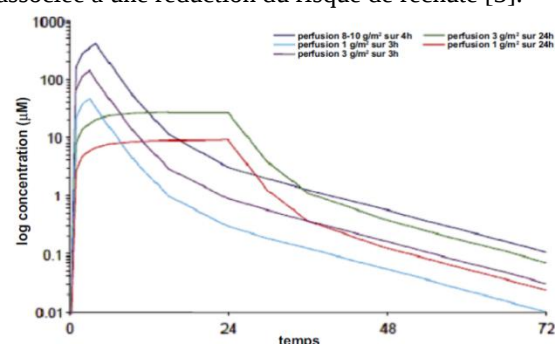


Figure 1. Profil moyen d'évolution des concentrations sériques de méthotrexate lors de son administration selon diverses modalités (doses et durées de perfusion) chez l'adulte [6].

Adaptation de l'acide folinique

En résumé, il est couramment admis sur la base des études, que les seuils de concentration associés à un risque plus important de toxicité sont :

- Dans le cas de perfusions de 3 à 6 h :
 - MTX supérieur à $10\mu\text{M}$, 24 heures après le début de la perfusion (h 24),

– MTX supérieur à 1 μM , 48 heures après le début de la perfusion (h 48).

• Dans le cas de perfusions de 24 h :

– La mesure à h 24 correspond à la concentration d'équilibre mais n'est pas utilisée pour le suivi, d'autant qu'elle est très sensible aux conditions de prélèvement (rinçage de la voie veineuse centrale),

– MTX supérieur à 0.5 μM , 48 heures après le début de la perfusion (h 48).

Les études publiées ne font pas apparaître de différences de seuils selon que l'on considère l'adulte ou l'enfant, recevant la même dose. Ainsi, si la pharmacocinétique est certainement différente chez ces derniers, il n'y a en revanche pas d'argument pour l'existence de seuils de concentration spécifiques. En pratique, les modalités d'administration sont différentes dans les indications pédiatriques et dans celles de l'adulte et il convient de se référer aux seuils préconisés pour chaque modalité d'administration (dose et durée de perfusion). Des abaques orientant les mesures de sauvetage en fonction de la concentration mesurée à chaque temps sont proposées dans les divers protocoles de traitement [6].

Le sauvetage par l'acide folinique est débuté 24 à 36 heures après le début de la perfusion à des doses de 15 à 25 mg à répéter scrupuleusement toutes les six heures pendant 48 à 72 heures et à adapter aux dosages de MTX. À titre d'exemple, le sauvetage peut être interrompu précocement si la méthotrexatémie est inférieure à 0,2 à 0,05 μM ou au contraire intensifié et prolongé en cas de retard à l'élimination du MTX. L'acide folinique est donné en quatre prises quotidiennes espacées de 6 heures (Tableau I) [2, 3, 5, 6].

Tableau I. Adaptation de posologie de l'acide folinique en fonction de la concentration sanguine de MTX chez l'adulte [2, 3].

Perfusion de 3 à 6 h				
Concentration de MTX (μM)	24h	48h	72h	>72h
> 10	50 mg * 4	200 mg * 4	200 mg * 4	200 mg * 4
5-10	20 mg * 4	100 mg * 4	200 mg * 4	200 mg * 4
1-5	20 mg * 4	50 mg * 4	100 mg * 4	200 mg * 4
0,5-1	20 mg * 4	20 mg * 4	50 mg * 4	100 mg * 4
0,1-0,5	20 mg * 4	20 mg * 4	20 mg * 4	50 mg * 4
0,05-0,1	20 mg * 4	20 mg * 4	20 mg * 4	20 mg * 4
< 0,05	0	0	0	0
Perfusion de 24 h				
Concentration de MTX (μM)	36h	48h	72h	96h
> 10	25 mg * 4	100 mg * 4	400 mg * 4	400 mg * 4
5-10	25 mg * 4	25 mg * 4	200 mg * 4	400 mg * 4
1-5	25 mg * 4	25 mg * 4	100 mg * 4	200 mg * 4
0,5-1	25 mg * 4	25 mg * 4	25 mg * 4	100 mg * 4
0,2-0,5	25 mg * 4	25 mg * 4	25 mg * 4	25 mg * 4
< 0,2	0	0	0	0

Justification et modalités d'une analyse pharmacocinétique éventuelle

La méthode de la dose-test permet de calculer la clairance du MTX avant la perfusion et de proposer ainsi une posologie adaptée dès la première cure, selon l'équation $Q = C \times T \times P$ (la posologie Q dépend du choix du clinicien pour la concentration

plasmatique à l'équilibre, C correspondant au plateau P et pour le temps de perfusion T).

L'emploi d'un estimateur Bayésien permet d'estimer à partir d'un nombre limité de prélèvements sanguins la dose nécessaire pour obtenir lors de la cure suivante des valeurs définies de C_{max} , C_{ss} (concentration moyenne à l'état stable) ou AUC (aire sous la courbe de concentration en fonction du temps) (figure 1). Ces paramètres pharmacocinétiques permettraient d'adapter la posologie dès la 6^e heure révolue de la première cure, dans le but de supprimer les toxicités graves (myélosuppression, troubles digestifs et hépatiques) et d'obtenir une meilleure efficacité quand la C_{max} efficace est connue (par exemple au cours d'une perfusion de 8 heures, 10^{-3} M correspondrait à l'exposition minimale efficace pour les ostéosarcomes de l'enfant) [3].

Conclusion

Le suivi thérapeutique du MTX administré à haute dose fait l'objet d'un consensus général et est recommandé en terme de contrôle de la toxicité car il permet d'adapter les mesures correctives à mettre en œuvre dès qu'une surexposition est objectivée.

Références :

1. Bagarry-Liégey, D., Nicoara, A., Duffaud, F., Guillet, P., Pignon, T., Catalin, J., Favre, R. (1996). Adaptation individuelle de posologie du méthotrexate à haute dose (MTX-HD) en pratique clinique courante. La Revue de Médecine Interne, 17(8), 689–698
2. Reutenauer, S., Chauveau, D., & Récher, C. (2009). Surdosage au méthotrexate : complications, prise en charge et prévention. Réanimation, 18(7), 654–658
3. Marquet P, Carpentier N, Milano G, Thyss A, Favre R. Suivi thérapeutique pharmacologique du méthotrexate. EMC - Biologie médicale 2006;7(1):1-4 [Article 90-45-0080]
4. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid Arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis 2007;65:168—73
5. Balloy T, Desroches M.C, Moussay C, Merkadal L, Fernandez C, Farinotti R.

Modalités de prise en charge des intoxications aiguës par le méthotrexate haute dose. *J Pharm Clin*, vol. 26, n° 4, décembre 2007

6. Le Guellec, C., Blasco, H., Benz, I., & Hulin, A. (2010). Niveau de preuve du suivi thérapeutique pharmacologique du méthotrexate au décours de son administration à haute-dose. *Thérapie*, 65(3), 163–169
7. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006; 11: 694-703
8. Widemann BC, Balis FM, Murphy RF, *et al.* Carboxypeptidase-G2, thymidine, and leucovorin rescue in cancer patients with methotrexate-induced renal dysfunction. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2125-3
9. Crom WR, Glynn-Barnhart AM, Rodman JH, *et al.* Pharmacokinetics of anticancer drugs in children. *Clin Pharmacokinet* 1987; 12: 168-213



Contrôle Qualité d'un Antibiotique Appartenant à la Classe des Bêta-lactamines

Pharmacologie
Mise au point

Derouicha Matmour^{1,2,4}, Nawel Achachi⁴, Hanane Zitouni⁴, Abdelaali Belhachem⁴, Habiba Fetati⁴, Asma Memou⁴, Yahia Dellaoui⁴, Fatima Hadjadj Aoul³, Houari Toumi⁴.

¹Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Département de Pharmacie, ²Laboratoire Central, CHU de Sidi Bel-Abbès, Université de Sidi Bel-Abbès. ³Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Département de Pharmacie, Université d'Alger. ⁴Laboratoire de Recherche en Développement Pharmaceutique, EHU 1^{er} Novembre, Université d'Oran.

Correspondance: Email: drmatmour24@hotmail.fr

Résumé : L'efficacité et la sécurité d'un traitement médicamenteux à base de l'Ampicilline dépend de la qualité de la matière première de son ingrédient actif. De ce fait, l'objectif de ce travail est d'évaluer la qualité d'un lot de matière première pharmaceutique dénommée Ampicilline Trihydratée utilisé dans la formulation des gélules. Le lot en question a été contrôlé selon les exigences de la Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition. Les résultats ont montré que l'Ampicilline Trihydratée se présente sous forme de poudre cristalline blanche, peu soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans l'éthanol. Son pH est de 4,3, son pouvoir rotatoire spécifique est de + 297 et son identification par CCM a révélé une tache semblable à celle du standard avec un RF de 0,51. Sa teneur en eau déterminée par Karl-Fisher est de 12,17 % et sa teneur en Ampicilline anhydre déterminée par HPLC est de 101,4 %. Le lot d'Ampicilline Trihydratée a répondu conforme aux exigences de sa qualité physico-chimique. Il serait intéressant de compléter cette étude par le contrôle microbiologique afin de juger la qualité finale de cette matière première.

Mots-clés: Ampicilline Trihydratée, Matière première pharmaceutique, ingrédient actif, Pharmacopée Européenne, HPLC.

1. Introduction

L'Ampicilline est un antibiotique β -lactame appartient au groupe des pénicillines. La structure de base des pénicillines est l'acide 6-aminopénicillanique, consiste en un cycle thiazolidine fusionné à un cycle β -lactame avec une chaîne latérale où l'Ampicilline présente un groupe amine primaire inexistant dans les autres pénicillines sauf l'épicilline et la bécampicilline [1]. L'Ampicilline est extrêmement active contre les organismes Gram positif et Gram négatif, y compris plusieurs organismes entériques pathogènes, de ce fait, elle est utilisée pour traiter les infections causées, par *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus* et *Klebsiella* malgré toutes les espèces résistantes [2,3].

L'efficacité et la sécurité d'un traitement médicamenteux à base de l'Ampicilline dépendent de la qualité de la matière première pharmaceutique de l'actif et celle des excipients utilisés dans la formulation du produit fini [4]. De ce fait, le contrôle qualité des matières premières

pharmaceutiques est une tâche indispensable en industrie pharmaceutique.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la qualité d'un lot de matière première pharmaceutique appartenant à la classe des Bêta-lactamines, dénommée Ampicilline Trihydratée et utilisé dans la formulation des gélules.

2. Matériel et Méthodes

Le contrôle qualité de la matière première pharmaceutique : Ampicilline Trihydratée est effectué selon les exigences de la Pharmacopée Européenne (Ph Eu) 9^{ème} édition [5].

2.1. Caractères organoleptiques et solubilité

Vérification de l'aspect et de la solubilité de l'Ampicilline Trihydratée dans l'eau et dans l'éthanol à 96 % conformément aux exigences de la Ph Eu 9^{ème} édition.

2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Solution à examiner : 25 mg d'Ampicilline Trihydratée est dissout dans 10 mL de solution de bicarbonate de sodium.

Solution témoin : 25 mg d'Ampicilline Trihydratée de référence est dissout dans 10 mL de solution de bicarbonate de sodium.

2.4. Pouvoir rotatoire spécifique

62,5 mg d'Ampicilline Trihydratée est dissout dans 25 mL d'eau [5,7].

2.5. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau est réalisée selon la méthode de Karl Fischer en utilisant 0,1 g d'Ampicilline Trihydratée [5,8].

2.6. Détermination de la teneur en Amicilline anhydre par HPLC

Un appareil HPLC de marque Thermo-UltiMate 3000 a été utilisé, les conditions chromatographiques ont été réglées comme suit : volume d'injection à 50 µL, débit à 1 mL/min, température à 25 ° C, colonne C₁₈ (5 µm x 4,6 mm x 250 mm) et la longueur d'onde λ à 254 nm. La phase mobile est composée de 1 V d'acétonitrile et 99 V de solution de phosphate monopotassique 0,2 M. Le pH a été ajusté à 5 avec une solution d'hydroxyde de sodium [5, 9].

La phase mobile A est composée de 0,5 mL d'acide acétique dilué, 50 mL de solution de phosphate monopotassique 0,2 M et 50 mL d'acétonitrile, puis complétée à 1000 mL avec de l'eau. La phase mobile B a la même composition que la phase mobile A excepte le volume d'acétonitrile qui est de 400 mL. La solution à examiner et la solution de référence ont été préparées à 0,62 mg/mL dans la phase mobile A [5, 9].

3. Résultats et discussion

3.1. Caractères organoleptiques et solubilité

L'Ampicilline Trihydratée se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche peu soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96% (figure 1).

Figure 1. Caractères organoleptiques de l'Ampicilline Trihydratée.

3.2. Chromatographie sur couche mince

La révélation de la plaque CCM sous la lampe UV à 254 nm après séchage est illustrée dans la figure 2. Après le calcul du rapport frontal (RF), le standard et l'échantillon présentent le même RF qui est de 0,51. La tâche principale obtenue avec la solution à examiner est semblable quant à sa position, sa coloration et ses dimensions à la tâche principale obtenue avec la solution témoin.

Phase mobile : 10 volumes d'acétone et 90 volumes d'une solution d'acétate d'ammonium à 154 g/L préalablement ajustée à pH : 5,0.

Plaque au gel de silice silanisé pour CCM [5,6].

2.3. Détermination du pH

0,1 g d'Ampicilline Trihydratée est dissout dans 40 mL d'eau [5].

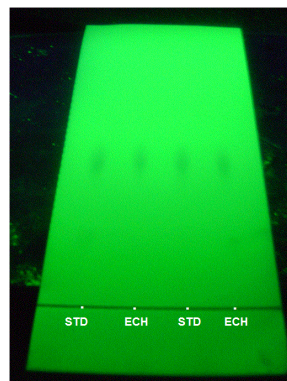


Figure 2. Plaque CCM révélée sous la lampe UV à 254 nm.

3.3. Détermination du pH

La détermination du pH a révélée une valeur moyenne de 4.3, valeur incluse dans l'intervalle exigé [3,5-5,5].

3.4. Pouvoir rotatoire spécifique

Le pouvoir rotatoire spécifique de la solution d'Ampicilline Trihydratée est de + 297, une valeur incluse dans l'intervalle exigé [+ 280 à + 305].

3.5. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau est de 12,17 %, valeur incluse dans l'intervalle exigé [12 % à 15 %].

3.6. Détermination de la teneur en Amicilline anhydre par HPLC

Les chromatogrammes de la solution standard et de la solution à examiner sont représentés dans la figure 3 et la figure 4. La détermination de la teneur en Ampicilline anhydre par HPLC est représentée dans le tableau I.

Selon les chromatogrammes, le temps de rétention de l'Ampicilline Trihydratée est de 8,742 min. La teneur en Ampicilline anhydre est de 101,4 %, cette teneur répond aux normes exigées [96%-102%].

4. Conclusion

Le lot d'Ampicilline Trihydratée utilisé dans la formulation des gélules a répondu conforme aux exigences de sa qualité physico-chimique excepte

l'essai des substances apparentées qui n'a pas été effectué par faute de moyen. Quant au contrôle microbiologique, il serait intéressant de l'effectuer pour compléter ce travail afin de juger la qualité finale de cette matière première pharmaceutique.

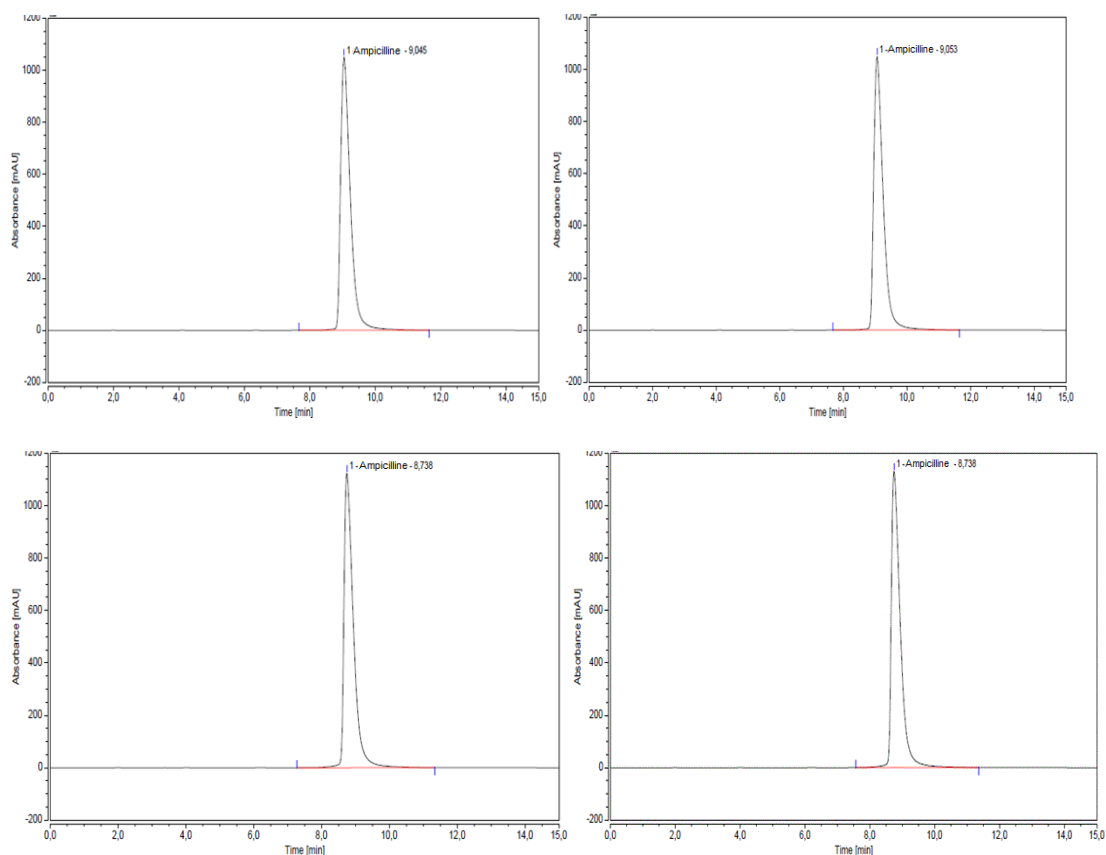
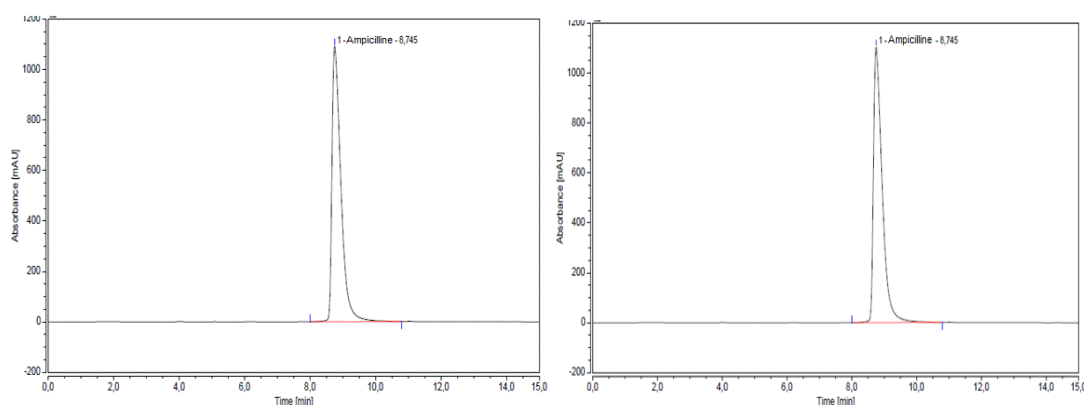


Figure 3. Chromatogrammes des quatre injections de la solution standard.



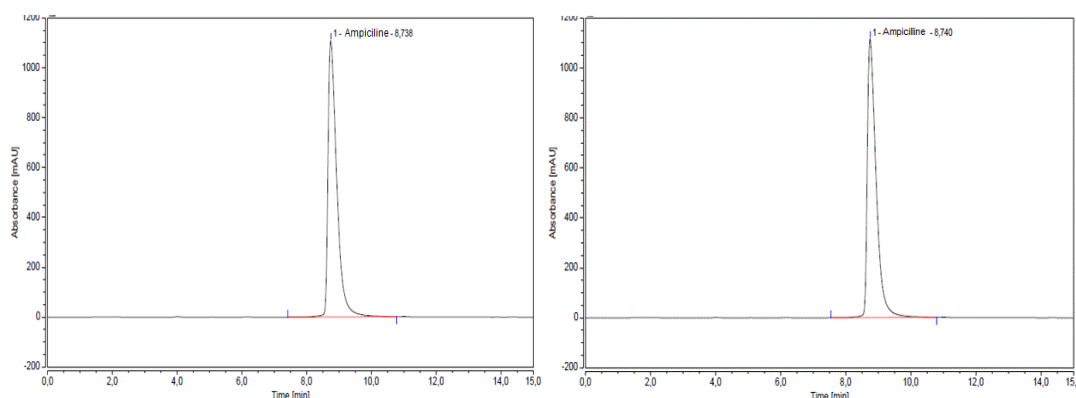


Figure 4. Chromatogrammes des quatre injections de la solution à examiner.

Tableau I. Détermination de la teneur en Ampicilline anhydre par HPLC.

Nom	Temps de Rétention (min)	Aire (mAu.min)	Moyen Teneur (%)	Normes (%)
Solution standard	8,894	356,726	92,5	96-102
Solution à examiner	8,742	343,999	101,4	

5. Références

1. Ashnagar A et Gharib Naseri N. Analysis of Three Penicillin Antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin and Cloxacillin) of Several Iranian Pharmaceutical Companies by HPLC. *E-Journal of Chemistry*.2007; 4: 536-545.

2. Udobi CE et Onalapo JA. Microbiological assay of the active component of ampicillin in ampicillin and ampicillin/cloxacillin suspensions using *Bacillus megatharium* NCTC 10342A76 as indicator organism. *African Journal of Microbiology Research*.2010; 4 (1): 51-54.

3. Batool Mutar M. Role of Antimicrobial Agents in the Management of Perianal Abscess.New Concepts in the Management of Septic Perianal Conditions. 2018: 71-77.

4. Emerich G, Armin G, Reto T, Thomas S. Quality Control of Raw Materials. *Certified Quality Control Manager*, Denmark; 2015:1-4.

5. Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé. Monographie de

l'Ampicilline Trihydratée. **In** : *Pharmacopée Européenne*. 9^{ème} éd. France : EDQM, 2018, p.1871-1873.

6. Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé. Méthodes Analytiques, Chromatographie sur couche mince. **In** : *Pharmacopée Européenne*. 9^{ème} éd. France : EDQM, 2018, p.47- 48.

7. Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé. Méthodes Analytiques, Pouvoir rotatoire. **In** : *Pharmacopée Européenne*. 9^{ème} éd. France : EDQM, 2018, p.29.

8. Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé. Méthodes Analytiques, Semi-microdosage de l'eau. **In** : *Pharmacopée Européenne*. 9^{ème} éd. France : EDQM, 2018, p.177.

9. Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé. Méthodes

Avis

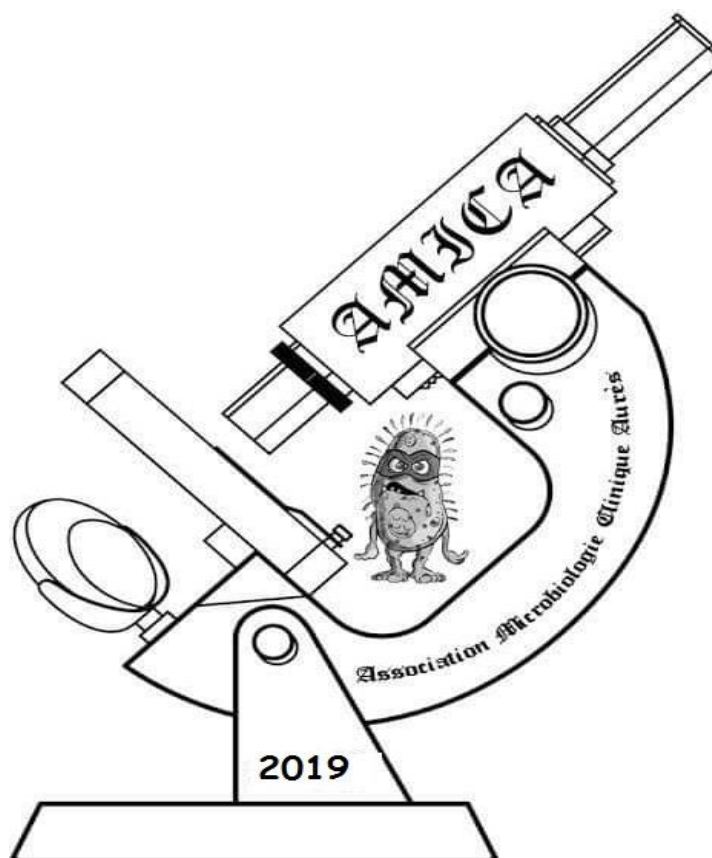
Bonjour chers amis et collègues.

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 (**AMJCA**).

A cet effet nous invitons tous nos amis biologistes de nous prêter contribution et main forte quant à la réussite dans sa mission.

AMJCA héberge tous les biologistes de la région sans distinction.

Adhérer à votre association **AMJCA**



L'évènement du mois

Les Troisièmes Rencontres Aurassiennes de Microbiologie Clinique (JAMiC III)

La journée scientifique (JAMiC III) est une des activités centrales des programmes du Laboratoire Central de Biologie Médicale (LCBM)

Nous vivons depuis l'année 2018, des journées de formation et d'information en Biologie Médicale, les étudiants et chercheurs se réunissent pour une journée annuelle dont le niveau se compare très favorablement aux congrès internationaux de biologie médicale. 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 portera sur les infections associées aux soins (IAS) et pathologie cancéreuse, la participation d'un nombre important de scientifiques des différentes disciplines biologiques et médicales, médecins, pharmaciens, biologistes vont enrichir par leurs connaissances cette manifestation.

A cette occasion le président du comité d'organisation **Professeur A. KASSAH-LAOUAR** Président du comité d'organisation des journées souhaite la **BIENVENUE** à tous les participants.

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 associées
aux soins et cancers**

Communications libres

11&12 Mars 2020 à partir de 13h30

Comité d'organisation :

Président :
Pr A. Kassah-laouar
Secrétaire général :
Docteur MK. Khebri

Le pionnier de la
bactériologie



LOUIS PASTEUR
1822-1895

2^{ème} partie

Page d'histoire

PAR Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-BATNA
prkassa@yahoo.fr

Pasteur et la génération spontanée

Depuis que l'humanité peut contempler le monde dans lequel elle vit, l'origine des micro-organismes dans la nature était un vaste débat et depuis très longtemps, on croyait que les organismes inférieurs pouvaient naître de conditions physico-chimiques particulières, idée selon laquelle la vie peut émerger du non-vivant, c'était la théorie de la génération spontanée.

La question était : d'où viennent les ferments, provoquant les fermentations? Proviennent-ils de germes semblables à eux ou apparaissent-ils spontanément dans les milieux fermentescibles? Le biologiste français, Félix-Archimède Pouchet, directeur du Muséum d'Histoire Naturelle de Rouen, prétendait que les micro-organismes étaient le résultat d'une génération spontanée, pour lui, renier la génération spontanée, c'était renier la création divine.

Dès 1861 Pasteur était fermement convaincu, à l'inverse, que la génération spontanée était impossible et que tout germe provient nécessairement d'un autre germe. Pasteur mis en œuvre des expériences montrant que ces organismes existent tout simplement dans les poussières de l'air et qu'il suffit de maintenir un milieu de culture à l'abri de l'air pour qu'il reste indéfiniment stérile; ce sera la base de l'asepsie et de la grande révolution chirurgicale du XX^e siècle.

"Il n'y a ni religion, ni philosophie, ni athéisme, ni matérialisme, ni spiritualisme qui tienne... Tant pis pour ceux dont les idées philosophiques sont gênées par mes études."

En 1862 il a le Prix Alhumbert pour ses recherches sur la génération spontanée. Cette même année Pasteur affirme "la génération spontanée est une chimère: chaque fois qu'on y a cru, on a été le jouet d'une erreur".

Quant à la théorie de la génération spontanée, elle ne se relèvera pas de cette expérience cruciale, qui ouvre à Pasteur les portes de l'Académie des Sciences à l'âge de 39 ans.

Le 8 décembre 1862 il est élu à l'Académie des Sciences (section minéralogie) et en 1863 il est nommé professeur de géologie, physique et chimie appliquées, à l'École des Beaux-Arts.

Pour ou contre la génération spontanée, la controverse déclencha les passions et fut débattue à l'Académie des sciences, qui trancha officiellement en faveur de Pasteur. C'est dans le grand amphithéâtre de la Sorbonne, le 7 avril 1864 devant un immense auditoire composé de savants, d'étudiants, de curieux instruits et de badauds que Pasteur fait sa communication selon laquelle il n'y a aucune circonstance connue permettant d'affirmer que des êtres microscopiques sont venus au monde sans parents semblables à eux.

Ces débats se prolongèrent jusque dans les années 1870, donnèrent un élan considérable à la microbiologie, et en particulier aux méthodes expérimentales.

Louis Pasteur et les travaux sur le vin

En 1863, Napoléon III avait des problèmes avec sa flotte, parce que la perte rapide du vin en mer, après seulement quelques semaines, poussait les marins à la mutinerie. Les rêves de grandeur de Napoléon étant alors tenus en échec par quelques barils de vinaigre, il demanda à Pasteur de l'aider. Pasteur ayant été élevé à Arbois, ville renommée pour ses excellents vins, en 1864 il installe un laboratoire dans cette ville et étudie l'influence de l'oxygène de l'air sur la vinification à l'aide de son microscope. Pasteur réalisa une étude microbiologique du vin en distinguant des germes "parasites", qui se développent en plus des microorganismes responsables de la fermentation "normale" qui causaient la perte du vin. Après avoir installé un laboratoire à Arbois, il fait une communication en 1865, à l'Académie des sciences sur un procédé de conservation et d'amélioration des vins par chauffage modéré à l'abri de l'air. Pasteur en dépose le brevet sous le nom de "pasteurisation".

Dès 1865 il apprend alors aux industriels des fermentations (brasseurs, viticulteurs, fabricants de vinaigre...) à n'utiliser que des souches pures de microorganismes, pour éviter les accidents de production. L'étude de la transformation du vin en vinaigre lui permet aussi d'indiquer aux fabricants de vinaigre d'Orléans des améliorations qui rendent la fabrication du vinaigre plus complète et plus rapide.

Mais il ne se contente pas d'étudier les micro-organismes qui les produisent, il "trouve le remède au mal dont il a fait connaître la cause", Pasteur met au point une technique permettant de réduire le niveau de contamination d'un milieu grâce à un chauffage de quelques minutes entre 55° et 60°C en l'absence d'air, sans modifier le goût du vin.

Cette méthode, appliquée à tous les liquides altérables, est connue dans le monde entier sous le nom de "Pasteurisation".

Pasteur s'intéressa également au problème du lait aigre et proposa une solution similaire: chauffer le lait à haute température et le pressuriser avant la mise en bouteille. Ce procédé sera également appliqué au traitement moderne des liquides en bouteilles pour la conservation du lait et des jus de fruits. (Il est important de savoir que la pasteurisation n'est pas une stérilisation.)

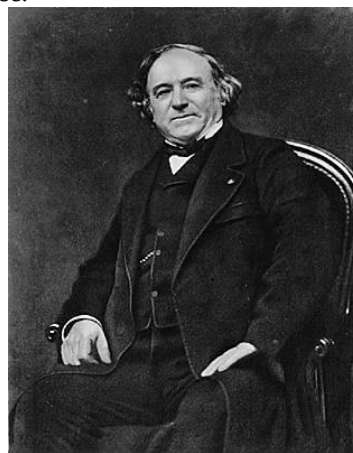
Pasteur s'est également occupé d'améliorer la fabrication de la bière pour laquelle la France est tributaire de l'Allemagne, c'est ainsi qu'il montra dans une publication sur la bière en 1876 qu'on peut obtenir une bière claire et savoureuse en procédant à une stérilisation du moût par chauffage, suivie d'un refroidissement à l'abri de toute contamination, et avant mise en fermentation au moyen de levures pures et sélectionnées.

Louis Pasteur et les maladies des vers à soie

Jean-Baptiste Dumas son ancien professeur est devenu entre-temps Ministre de l'Agriculture; en 1865 il charge son élève Pasteur d'étudier à Alès dans le Gard les maladies qui déciment les élevages de vers à soie : la pébrine et la flacherie des magnaneries et qui menacent de ruiner cette industrie prospère. Au terme de quatre ans d'observations et d'expériences sur place, (1865-66-67-68) Pasteur aboutit à la conclusion que certains petits corpuscules ovoïdes de 2 à 3 µ de longueur, qui abondent dans les différents organes des vers à soie et des papillons et qui existent même dans les œufs, étaient des organismes pathogènes.

Il surveilla alors les éclosions et démontra que la pébrine n'est pas seulement contagieuse, mais également héréditaire. En 1870 il publie des études sur les maladies des vers à soie. Il en conclut qu'il fallait séparer les œufs malades des œufs sains, c'est le "grainage sélectionné" qui lui permettra de supprimer l'épidémie en détruisant les pontes dues à

des femelles contaminées. En adoptant cette méthode de sélection, l'industrie de la soie fut sauvée. Pasteur, regroupant ces données, insistait à juste titre sur l'importance du terrain en pathologie infectieuse.



Jean-Baptiste Dumas

En 1867, à la suite de désordres à l'école Normale, Pasteur avait dû résilier ses fonctions d'administrateur. Mais il devient directeur du laboratoire de chimie physiologique qui est créé à l'école Normale, il avait également été nommé professeur de chimie organique à la Sorbonne, en remplacement de son ancien maître Balard. Mais l'attitude hostile autant qu'injuste des Normaliens l'avait vivement peiné. Il reçoit le Grand Prix de l'Exposition universelle pour ses études sur le vin. D'autre part les marchands de graines de vers à soie, craignant pour leur négoce, lui suscitaient des luttes sans fin, qui empêchaient l'application de ses méthodes. S'il ne craignait pas la polémique, les injustices l'affectaient au plus haut point; elles le fatiguaient énormément et le laissaient complètement désemparé. Il eut de plus à gravir un douloureux calvaire, car il perdit en peu de temps son père et ses deux filles.

En 1868, il est fait docteur en médecine de l'Université de Bonn.

Le 19 octobre 1868, alors qu'il revenait d'une séance de l'Académie des Sciences, il n'a que quarante-cinq ans, Pasteur est victime d'une hémiplegie gauche. On craint d'abord pour sa vie, il conserve l'usage de la parole, et jusqu'au terme de son existence il gardera un avant-bras fléchi et contracturé, une démarche difficile et lente. L'Empereur Napoléon III l'envoya se reposer dans une villa qu'il possédait à Trieste, et le fait Commandeur de la Légion d'Honneur.

En 1870, Pasteur publie les Etudes sur la maladie des vers à soie. Mais cette année-là éclate la guerre franco-allemande. Pasteur qui était extrêmement patriote eut un grand chagrin de ne pas pouvoir servir son pays. Il eut en revanche la consolation de voir son fils s'engager à 18 ans pour aller faire son

devoir dans l'Armée de l'Est. Après l'inutile bombardement de Paris il adresse sa protestation au vainqueur en retournant au doyen de la Faculté de Médecine de Bonn, le diplôme de Docteur Honoraire qui lui avait été décerné. Il assurait les professeurs de tout son respect, mais ne voulait pas voir son nom accolé plus longtemps à celui d'un roi, qui, pour satisfaire un orgueil criminel, s'obstinait dans le massacre de deux grands peuples. En retour Pasteur reçut du doyen de Bonn une lettre de grossières injures.

Pasteur effectue un séjour dans sa province natale, il gagne Clermont-Ferrand où l'appelle son ancien préparateur, Émile Duclaux; il s'intéresse alors aux maladies de la bière.

Après l'abdication de Napoléon III et la guerre contre la Prusse, Pasteur, fervent napoléonien, ne reprend que lentement ses recherches. Il s'étonna que l'on n'ait pas trouvé d'hommes supérieurs au moment du péril. De l'armée d'Alsace, le chirurgien Sédillot signale l'affreuse mortalité des blessés, les ravages que font les complications infectieuses des plaies. Lister, inspiré des travaux de Pasteur, publie dès 1867 dans "The lancet of king's college" à Londres les premières étapes de l'antisepsie. Dans une lettre il remercie Pasteur pour ce dont la chirurgie lui est redevable.

Pasteur est élu en avril 1873 à l'Académie de Médecine (avec une seule voix de majorité). Dans cette noble assemblée, entourée de médecins, il est parfois mal à l'aise : ceux-ci semblent trop souvent dire : "Je viens de sauver mon semblable" !

A partir de 1874, Louis Pasteur agrandit, aménage et transforme sa résidence arboisienne pour en faire une coquette demeure familiale.

En juillet 1874, la Troisième République lui attribue une rente viagère de 25.000 francs, après le vote par la Chambre des députés reconnaissant que le savant "avait rendu d'éminents services à l'état," avec le grand cordon de la Légion d'Honneur.

En 1876, il présente sa candidature aux élections sénatoriales du Jura, mais essuie un échec.

A suivre...

Citation et Proverbe du Numéro.

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR

« La médecine est une science des pannes, celles de l'organisme humain.... Mais si le médecin est dépanneur- rien de plus, rien de moins- il est dépanneur d'une machine dont il ne possède pas les plans. »

« Médecin, soigne-toi toi-même »

Proverbe russe

Les étapes de la vie :

Les jeunes : ils ont le temps et l'énergie, mais pas d'argent

Les adultes : ils ont l'argent et l'énergie, mais pas le temps

Les vieux : ils ont le temps et l'argent, mais pas d'énergie

Moralité : Profitez de la vie et du moment présent, car vous ne pourrez jamais tout avoir !

Beau Poème de Félix Leclerc sur la vieillesse

VIEILLIR EN BEAUTÉ... ET EN SAGESSE

« Ce n'est pas parce que je suis un vieux pommier que je donne de
vieilles pommes. »

– Félix Leclerc.

Vieillir en beauté, c'est vieillir avec son cœur,
Sans remords, sans regret, sans regarder l'heure.

Aller de l'avant, arrêter d'avoir peur,
Car à chaque âge se rattache un bonheur.

Vieillir en beauté, c'est vieillir avec son corps,
Le garder sain en dedans, beau en dehors.

Ne jamais abdiquer devant un effort.

L'âge n'a rien à voir avec la mort.

Vieillir en beauté, c'est donner un coup de pouce
À ceux qui se sentent perdus dans la brousse,

Qui ne croient plus que la vie peut être douce
Et qu'il y a toujours quelqu'un à la rescousse.

Vieillir en beauté, c'est vieillir positivement.
Ne pas pleurer sur ses souvenirs d'antan.
Être fier d'avoir les cheveux blancs,

Car pour être heureux, on a encore le temps.

Vieillir en beauté, c'est vieillir avec amour,
Savoir donner sans rien attendre en retour,

Car où que l'on soit, à l'aube du jour,
Il y a quelqu'un à qui dire bonjour.

Vieillir en beauté, c'est vieillir avec espoir,
Être content de soi en se couchant le soir.

Et lorsque viendra le point de non-recevoir,
Se dire qu'au fond, ce n'est qu'un au revoir!

**Ne regrette pas de vieillir.
C'est un privilège refusé à beaucoup!**

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-Batna
Mots croisés : Grille N°2

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

HORIZONTAL

- 1: Inflammations des tissus cellulaires sous-cutanés
- Relâchement des ligaments viscéraux ou des parois abdominales
3: Liquide jaune verdâtre sécrété par le foie
5: Assoupissement profond dans lequel tombe un malade
9: Enflure aux pieds ou aux mains causée par le froid
11: Se dit d'un pied mal formé
- Petites masses de liquide coagulé
13: Action de retrancher
15: Amas de pus
- Maladie de la peau

VERTICAL

- 1: Infection contractée en pays marécageux caractérisée par une fièvre intermittente
3: Plaies, contusions
5: Affections cutanées, contagieuses
- Embryon d'un être animé
7: Enflure non douloureuse due à des infiltrations séreuses dans le tissu cellulaire
9: Bandelette de soie, de linge effilé qu'on passe sous la peau pour déterminer un écoulement d'humeur
11: Fragments qui se détachent d'os fracturés
13: Bandelettes de soie, de linge effilé qu'on passe sous la peau pour déterminer un écoulement d'humeur
15: Inflammation de la vessie

CAS CLINIQUE

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC Batna

Cas clinique 1 :

Patient Y.K âgé de 23 ans, consulte pour la première fois aux urgences pour brûlures mictionnelles intenses. Le médecin demande un ECBU qui objective une leucocyturie amicrobienne, dans les antécédents du malade on retrouve un rapport sexuel non protégé qui remonte à 21 jours.

Suite à l'anamnèse et aux résultats de l'ECBU, le médecin prescrit une injection de ceftriaxone.

Trois jours plus tard, le patient reconsulte pour persistance des signes cliniques.

- 1- A quel diagnostic pensez-vous ?
- 2- Expliquer les raisons de l'échec thérapeutique ?
- 3- Conduite à tenir ?

CAS CLINIQUE

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC Batna

Cas clinique 2 :

Femme âgée de 20 ans, originaire des Aurès, obèse, sans antécédents particuliers, primipare, grossesse, il y a

deux années compliquée d'un diabète gestationnel.

Elle se présente aux urgences avec une toux sèche, asthénie, fièvre, amaigrissement. L'examen clinique retrouve des râles crépitants, une radiographie du thorax est demandée et qui revient avec des opacités cavitaires diffuses au niveau du poumon droit et gauche.

Une bacilloscopie est demandée.

Le compte rendu du laboratoire précise qu'il s'agit d'une lame riche à **3 croix**.

- 1- A quoi correspond ce résultat ?

Le traitement anti-tuberculeux est instauré, mais la malade ne répond pas.

- 2- Expliquer les raisons de l'échec thérapeutique ?

Un deuxième prélèvement est demandé après deux mois, il revient positif à une croix.

- 3- A quoi correspond ce résultat ?

La culture est toujours positive, un antibiogramme est fait, il revient comme suit :

Iso niaz ide	Rifa mpic ine	Pyra zina mide	Eth amb utol	Ethi ona mide	Capr éomy cine	cipro flox a cine
Rés ista nt	Rési stan t	Rési stan t	Sen sibl e	Rési stan t	Résis tant	Sensi ble

4- Comment classer la bactérie ?

5- La culture et l'antibiogramme nécessite un délai d'au moins 28 jours, pour palier à ce problème que proposez-vous pour accélérer le diagnostic ?

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC-Batna
Solution Mots croisés : Grille N°2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	P	H	L	E	G	M	O	N	S		P	T	O	S	E
2	A		E		A		E		E						
3	L		S		L		D		T			B	I	L	E
4	U		I		E		M		O						
5	D		O		S		E		N			C	O	M	A
6	I		N								E				
7	S		S								S				
8	M										Q		S		
9	E					E	N	G	E	L	U	R	E		C
10					F						I		T		Y
11	B	O	T		O			C	A	I	L	L	O	T	S
12					E						L		N		T
13	A	B	L	A	T	I	O	N			E		S		I
14					U						S				T
15	A	B	C	E	S							A	C	N	E

CAS CLINIQUE REPONSES

Par Professeur A.KASSAH-LAOUAR
LCBM-CLCC Batna

Cas clinique 1 :

Réponse :

- 1- Il s'agit d'une urétrite **infectieuse**. Au vu du traitement prescrit, le diagnostic supposé par le médecin est celui d'une urétrite **GONOCOCCIQUE**.
- 2- L'échec thérapeutique est probablement du ;
 - a. soit à une cause autre que celle évoqué par le médecin (urétrite non gonococcique à *Chlamydia trachomatis* ou à *Mycoplasma genitalium*) ces deux dernières bactéries sont à l'origine d'urétrites à incubation longue contrairement à celles conférées par le gonocoque, dépourvues de paroi et ne répondant pas aux Bêta-lactamines, cause la plus probable.
 - b. Ou à une résistance de la souche *N.gonorrhoeae* aux C3G
- 3- Conduite à tenir :
 - a. Demander un ECB du prélèvement urétral accompagné d'une PCR sur premier jet urinaire à la recherche de *N.gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium*.
 - i. Si culture positive à *N.gonorrhoeae*, compléter avec un test de sensibilité aux antibiotiques selon les recommandations du CLSI.
 - ii. Convoquer éventuellement le partenaire pour une prise en charge diagnostique et thérapeutique

- iii. Compléter par la recherche des autres IST à savoir syphilis, HIV, HBV et HCV (pour le couple).

Vos commentaires :

Cas clinique 2 :**Réponse :**

- 1- Une bacilloscopie avec un résultat positif à 3 croix correspond à la présence de plus de 10 BAAR/champ microscopique, il s'agit d'un cracheur de bacilles tuberculeux.
- 2- L'échec thérapeutique peut s'expliquer par :
 - a. Une mauvaise observance du traitement, sachant que le traitement de la tuberculose est un traitement lourd de 06 mois à base de 04 quatre molécules : Rif-INH-PZA-Ethambutol, si le patient n'a pas pris son traitement correctement.
 - b. Ou bien une résistance primaire au traitement anti-tuberculeux, peut être le patient s'est contaminé par une souche résistante aux antibiotiques de première ligne.
- 3- C'est une lame moyennement riche qui correspond à la présence de 10 à 99 BAAR/100 champs microscopiques
- 4- La bactérie est classée MDR, car il y a une résistance au moins à l'isoniazide et à la rifampicine, il ne s'agit pas d'une XDR, car la définition englobe aussi une résistance à une fluoroquinolone et au moins à un médicament injectable.
- 5- Pour pallier à la lenteur de la culture et pouvoir instaurer un traitement rapidement, les techniques de biologie moléculaires aussi bien la PCR en point final ou la PCR en temps

réel et qui sont applicables quand l'examen microscopique est positif, ces techniques permettent la recherche des gènes de résistance à la rifampicine *rpoB* et *KatG*

Vos commentaires :

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.

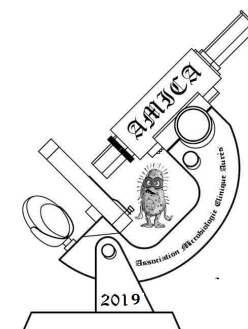
Ex :

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 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 32:2553–2558.

A
m
i
C
A



Bureau exécutif



2
0
1
9