

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N°40

2007

**Des agents
très spéciaux en
bactériologie**



BIOFORMA

FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



Chère Consœur, Cher Confrère,

Voici le quarantième Cahier de Formation continue en biologie médicale.

Depuis le premier numéro, en 1995, l'objectif d'apporter à chaque biologiste, dans sa pratique quotidienne, des ouvrages de formation permanente et de mise à jour des connaissances est régulièrement atteint, sur des thèmes variés et choisis en Commission Nationale Paritaire.

Les partenaires conventionnels, syndicats et caisses, peuvent mesurer, au travers des 40 numéros édités, le travail accompli, par la profession et par Bioforma au titre de cette formation continue conventionnelle. L'intérêt et la qualité scientifique et technique de chacun de ces livres sont indiscutables de l'avis de vous tous qui les recevez au laboratoire.

Que tous les auteurs qui nous ont apportés leurs connaissances et leurs expériences en rédigeant ces cahiers soient, ici, remerciés et félicités.

Sous le titre provocateur et sibyllin, voulu par ses auteurs, de ce nouvel ouvrage, se cachent, comme elles savent si souvent le faire, des bactéries qu'il faut traquer et rechercher comme pour des espions ou des malfaiteurs.

Ce Cahier n°40, supervisé par le Professeur Philippon, et rédigé par une équipe choisie pour ses compétences, vous apportera une mise à jour des éléments de connaissance pratique et théorique plus précisément sur ce sujet.

Les Zoonoses sont la cause de pathologies compliquées, quelquefois létales, dont les origines sont souvent banales, mais difficiles à identifier.

C'est un domaine d'excellence pour que s'exerce pleinement une collaboration étroite entre le clinicien et le biopathologiste.

La biologie, et les biologistes, ont ici encore un rôle primordial dans la chaîne de soins et dans le système de Santé Publique.

En vous souhaitant une bonne lecture de ce quarantième cahier, nous vous prions d'agréer nos cordiales et confraternelles salutations.

230, boulevard Raspail
75014 Paris

Tél. 01.56.54.39.39
Fax : 01.56.54.39.30

site internet : www.bioforma.net
E-mail : bioforma@wanadoo.fr

Association régie par la loi de 1901
siret : 391 155 744 00025
code APE : 8040

Adrien BEDOSSA
Président

Liste des auteurs

■ **Josée Vaissaire**

*Directeur du Centre National de Référence Francisella (2002-2005)
AFSSA/Lerpaz 23 Avenue du Général de Gaulle 94700 Maisons-Alfort
Tél: 01 49 77 13 00
Fax : 01 43 68 97 62
courriel : j.vaissaire@afssa.fr*

■ **Alain Le Coustumier**

*Laboratoire associé Centre National de Référence Francisella (2002-2005)
Centre hospitalier, BP269, 46000 Cahors
Tel : 05 65 20 50 75
Fax : 05 65 20 51 10
Courriel : lecoustumier@ch-cahors.fr*

■ **Guillaume Arlet**

*Service de Bactériologie - Hôpital Tenon
4, rue de la Chine 75020 Paris
Courriel : guillaume.arlet@tnn.ap-hop-paris.fr*

■ **Florence Fenollar**

*Unité des rickettsies, IFR 48
CNRS UMR 6020
Université de la Méditerranée - Faculté de médecine
27 Boulevard Jean Moulin - 13385 Marseille cedex 5 - France
Tel : 04 91 38 55 17
Fax : 04 91 83 03 90
Courriel : florence.fenollar@medecine.univ-mrs.fr*

Des agents très spéciaux en bactériologie

ouvrage réalisé sous la direction
du Professeur A. Philippon

Ce cahier de formation est dédié à mes précédents formateurs :
Goret P., Leblanc A., Le Minor L., Névot P., Pilet Ch., Plommet M., Véron M.

PRÉFACE

Compte tenu de l'importance du maillage des LABM en France et de leur rôle croissant, par exemple dans la déclaration des maladies à déclaration obligatoire (MDO), il paraît tout à fait justifié de mettre à jour leurs connaissances dans le domaine microbiologique, ou mieux bactériologique d'autant qu'émergent de nouvelles espèces, voire de nouveaux groupes ou genres bactériens, les progrès taxonomiques ayant été conséquents au cours des deux dernières décennies.

La survenue à un moment donné plus fréquente de certaines bactéries est en partie liée à des facteurs d'émergence comme pour *Yersinia enterocolitica* ou encore *Listeria monocytogenes* à une époque pas si lointaine.

Dans notre pays, les facteurs d'émergence ou de ré-émergence sont multiples et peuvent s'exprimer assez rapidement. Un exemple récent mérite d'être rapporté comme le développement des élevages porcins de "plein air" ayant, pour corollaire, la réémergence de la brucellose porcine, maintenant diagnostiquée dans vingt deux départements, d'où un éventuel danger pour l'homme. Un autre exemple significatif concernant les facteurs d'émergence est lié à un retour à la nature comme une plus grande pratique des ballades "écologiques" favorisant certains contacts avec divers agents infectieux, *Borrelia burgdorferi* par exemple traité dans un cahier précédent, ou encore par ingestion à l'occasion d'un pique nique d'une eau de puits contaminée (*Francisella tularensis*) ou même à la suite d'un simple contact avec un animal malade.

Le numéro spécial du Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH) consacré aux zoonoses non alimentaires de juin 2006 (http://www.invs.sante.fr/BEh/2006/27_28/index.htm) rappelle opportunément les principales zoonoses en les hiérarchisant : maladies prioritaires, importantes, peu importantes. La création au cours de ces dernières années de plusieurs Centres Nationaux de Référence (CNR) indique le souci des autorités de maintenir une veille bactériologique qui doit être relayée par les biologistes des LABM. Parmi les autres facteurs d'émergence de zoonoses, doivent encore être cités, celui qui est lié aux activités de l'homme lui-même. En effet, les menaces de bioterrorisme avec l'épisode américain des enveloppes contaminées par du bacille du

charbon (“anthrax” pour les anglo-saxons) de 2001 illustrent la possibilité d’isoler des bactéries peu familières des biologistes mais hautement pathogènes qui paraissaient avoir disparues.

Enfin un important “facteur d’émergence” de nouvelles bactéries est celui du développement de nouvelles techniques plus performantes pour le diagnostic telle l’amplification génique (PCR) qui devient habituelle dans les LABM pour la recherche de *Chlamydia*.

Ces approches moléculaires incluant le séquençage de gènes tel celui codant pour l’ARNr 16S ont généré de nouvelles connaissances comme, par exemple sur le genre *Bartonella* et ses "23" espèces actuelles. La PCR et le séquençage de gènes ont permis de développer de nouvelles approches diagnostiques inégalées comme dans la maladie de Whipple (*Tropheryma whipplei*).

N’oublions pas l’augmentation de la durée de vie avec pour corollaire, un développement considérable des voyages dits du troisième âge dans diverses contrées lointaines. Le Professeur H.H. Mollaret, spécialiste mondialement reconnu de la peste, avait pour habitude de dire, à l’occasion de conférences que *Yersinia pestis* était à quelques heures de Boeing® de Paris. Nous pourrions seulement rajouter :”ou d’Airbus®”. Savez-vous qu’en 2005, plus de 1200 cas de peste humaine ont été rapportés à Madagascar !

Le biopathologiste médical doit continuer d’être un important et actif acteur en santé publique, aussi convient-il de l’aider à bien exercer ce rôle en améliorant continuellement son expertise. L’objet de ce cahier est d’illustrer l’intérêt des nouvelles approches diagnostiques pour des germes inhabituels, donc des agents très spéciaux. Il convient de rappeler que la banque de données bactériologiques numériques de Bacterionet® en est une autre expression mensuelle, non négligeable développée par Bioforma.

Pr A.Philippon

SOMMAIRE

CHAPITRE I - <i>Francisella tularensis</i> et tularémie	11
Introduction - historique	12
Aspects épidémiologiques	14
Réservoir, cycle animal	14
Voies de transmission vers l'homme	16
Géographie	18
Aspects cliniques	21
<i>Tularémie ulcéro-ganglionnaire</i>	21
<i>Tularémie ganglionnaire</i>	21
<i>Tularémie oculo-ganglionnaire</i>	21
<i>Tularémie oro-pharyngée</i>	23
<i>Tularémie pulmonaire</i>	23
<i>Tularémie : forme typhoïdique</i>	24
<i>Tularémie : forme digestive</i>	24
<i>Tularémie : formes atypiques</i>	24
Agent causal : <i>Francisella tularensis</i>	25
Physiopathologie	26
Diagnostic biologique	27
Commémoratifs	27
Hémogramme	29
Diagnostic bactériologique	30
<i>Prélèvements</i>	30
<i>Examen direct</i>	30
<i>Cultures</i>	31
<i>Aspects cultureux</i>	31
<i>Caractères d'identification</i>	34
<i>Antibiogramme</i>	35

Inoculation à la souris.....	38
Diagnostic indirect (Sérodiagnostic)	38
Diagnostic allergique (intradermoréaction)	40
Nouvelles techniques de diagnostic	40
<i>Diagnostic par biologie moléculaire : Amplification génique in vitro (PCR) :</i>	40
Typage moléculaire.....	43
Aspects thérapeutiques, traitements antibiotiques	44
Tularémie et guerre biologique	46
Aspects prophylactiques	47
Conclusion	48
Revue générale.....	49
Principales références citées	50
Adresses de sites	51
Annexes	52

SOMMAIRE

CHAPITRE II - <i>Bartonella</i> et Bartonelloses	55
Introduction	56
Aspects cliniques des infections à <i>B. henselae</i>	62
La maladie des griffes du chat (MGC)	62
Formes cliniques inhabituelles de la MGC	64
<i>Les formes neurologiques</i>	65
<i>Les formes viscérales</i>	65
<i>Les formes observées chez les patients immuno-déprimés</i>	66
<i>Epidémiologie</i>	67
Aspects cliniques des infections à <i>B. quintana</i>	70
Histopathologie et physiopathologie	71
Diagnostic biologique	73
Culture	73
Diagnostic moléculaire	76
Diagnostic sérologique	79
Diagnostic anatomopathologique	82
La stratégie diagnostique	82
Sensibilité aux antibiotiques et traitement des infections humaines	84
Références citées	85
Adresses de sites	86

CHAPITRE III - *Tropheryma whipplei* et maladie de Whipple 87

Introduction et historique	88
Historique	88
L'agent causal	89
Aspects physiopathologiques	93
Aspects épidémiologiques et cliniques	94
Maladie de Whipple classique	96
L'endocardite	98
Infection neurologique isolée	98
Autres présentations	99
Porteurs asymptomatiques	99
Diagnostic biologique	100
Echantillons à prélever en cas de suspicion	100
Diagnostic non spécifique	101
<i>Bilan sanguin</i>	101
<i>Diagnostic par microscopie électronique</i>	101
<i>Diagnostic histologique par coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS)</i>	101
Diagnostic spécifique	103
<i>Diagnostic direct par immunohistochimie</i>	103
<i>Diagnostic direct par biologie moléculaire</i>	104
<i>Diagnostic direct par culture</i>	106
<i>Diagnostic indirect par sérologie</i>	108
Aspects thérapeutiques	110
Références	112
Adresses de sites	119

Francisella tularensis **et tularémie**

J. Vaissaire - A. Le Coustumier

CHAPITRE I

Introduction - historique

La tularémie est une zoonose bactérienne due à *Francisella tularensis* dont on connaît de multiples appellations suivant les pays, suivant les formes cliniques en médecine humaine, et selon les espèces animales touchées. Elle est ainsi appelée : maladie de Francis, fièvre de la vallée de Pahvant, fièvre de la mouche du cerf, fièvre de la mouche du bœuf, fièvre à tiques, fièvre ondulante, fièvre de Ohara ou Yato-Byo (fièvre du lapin) au Japon. C'est en Californie dans le comté de Tulare que Mac Coy en 1911 a mis en évidence l'affection chez des écureuils et il l'appela "maladie pseudo-pestique des rongeurs". Lamb et ses collaborateurs ont identifié les premiers cas humains de conjonctivite ulcéreuse en 1914, 1915 et 1917. En 1919-1920, Francis isole "*Bacterium tularense*" de sept malades de la "fièvre de la mouche du cerf" et de dix sept lapins infectés de la "pseudo- peste des rongeurs". L'identité bactériologique des deux affections est prouvée et il l'appelle "tularémie".

En 1924, Parker, Spencer et Francis montrent la présence de *B. tularense* chez un lapin ("snow shoe rabbit") et chez une tique recueillie sur cet animal : *Dermacentor andersoni*. Le rôle certain des vecteurs est démontré.

De 1921 à 1939, la maladie est mise en évidence dans de nombreux Etats d'Amérique du Nord et Centrale, en Russie, au Japon, en Suède, en Norvège, en Finlande, en Turquie et en Grèce, puis dans les pays d'Europe Centrale : Autriche, Allemagne, Tchécoslovaquie, Hongrie. Les cas humains sont nombreux particulièrement dans les zones humides et de grands deltas.

- En France, les premiers cas sont diagnostiqués en 1946-1947 en Touraine, Franche-Comté, Côte-d'Or, Gironde, 80 cas sont répertoriés en Lorraine, mais dès 1930-1932, plusieurs formes cliniques suspectes avaient été déjà décrites chez l'homme. Des cas ou foyers sporadiques sont rapportés chaque année chez l'homme et l'animal.

Agent possible du bioterrorisme, cette zoonose a été récemment classée: "zoonose importante" justifiant en 2002, d'une part, la réinscription de cette maladie à déclaration obligatoire (DO) et d'autre part en octobre 2002, la création d'un Centre National de Référence (CNR) (BEH, juillet 2006). Tous les cas doivent faire l'objet d'un signalement précoce. L'objectif de la DO est de suivre les tendances évolutives de l'incidence de la maladie et de décrire les caractéristiques en termes cliniques, épidémiologiques et géographiques. Elle doit également permettre de détecter précocement tout phénomène inhabituel, en particulier des cas groupés ou l'apparition d'une souche plus virulente utilisée à des fins malveillantes.

Aspects épidémiologiques

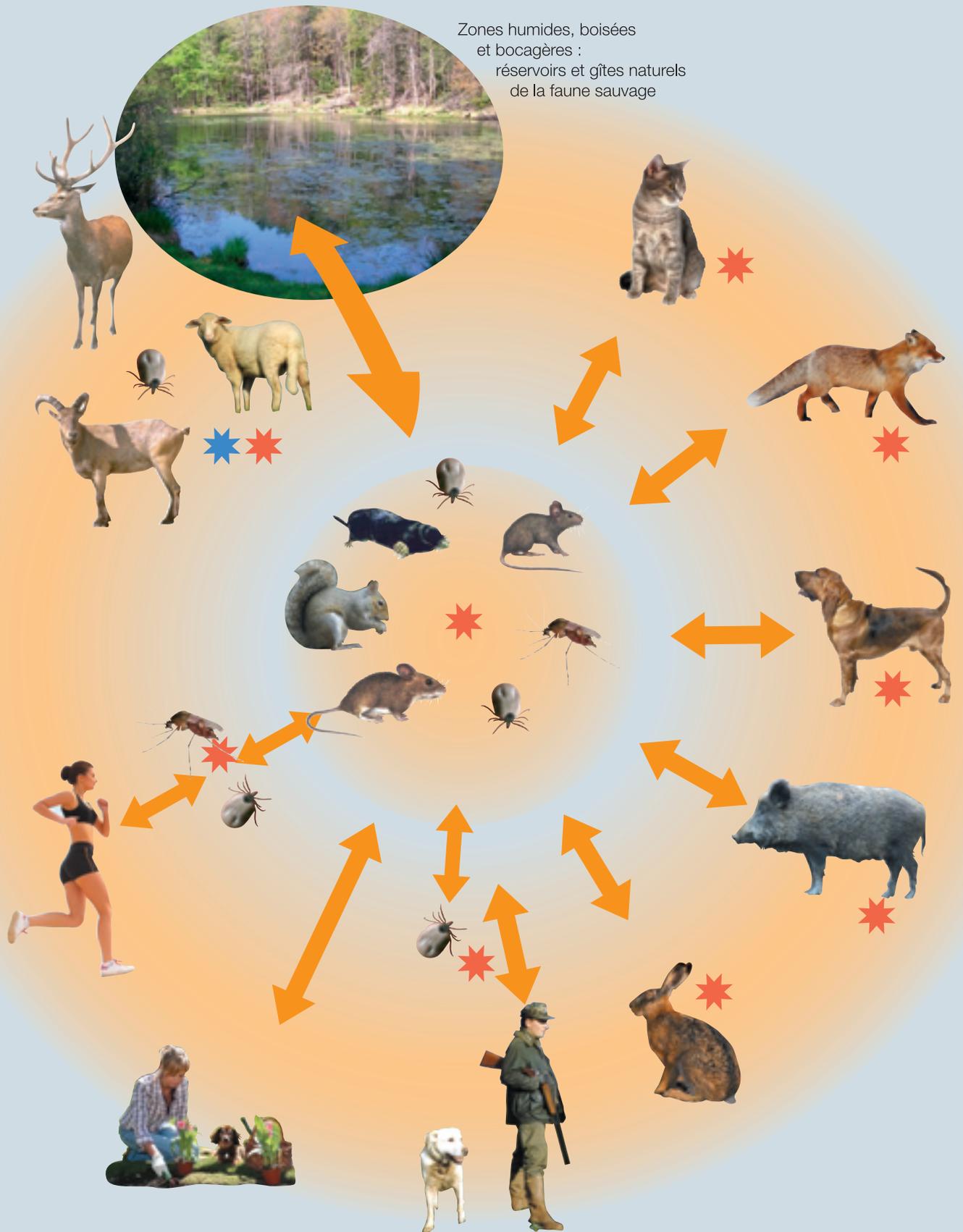
Réservoir, cycle animal

Les petits mammifères de la faune sauvage et les arthropodes, plus particulièrement les tiques, sont les principaux réservoirs de la tularémie : les rongeurs terrestres (campagnols, rats taupiers, écureuils), les rongeurs aquatiques (rats d'eau, ragondins, rats musqués, castors) ; les lagomorphes (lièvres, lapins sauvages ; etc..) ; les insectivores (taupes). Les carnivores domestiques et sauvages peuvent aussi jouer un rôle dans la contamination de l'homme. Ce rôle est le plus souvent passif, excepté pour les chats. Les chiens, les renards peuvent être porteurs sains, éventuellement excréteurs, ainsi que d'autres mammifères tels que les sangliers, plus rarement les herbivores domestiques et sauvages (moutons, cervidés). Ils peuvent contaminer l'homme. La tularémie a été signalée chez plusieurs espèces d'oiseaux : perdrix, gélinotte, tetras, grand-duc, goéland. Les acariens (tiques) sont des vecteurs ("tick fever") mais aussi des réservoirs qui peuvent pérenniser l'affection dans certaines zones géographiques sur plusieurs années, peut-être des décennies du fait de la transmission verticale trans-ovarienne. Les moustiques (culicinés) et les insectes vecteurs piqueurs (tabanidés : taons) jouent aussi un rôle dans la transmission de la maladie (maladie de la mouche du daim aux USA).

Le germe survit peu de temps dans le milieu extérieur, sauf quand la température est voisine ou inférieure à 0°C. La persistance de la bactérie dans l'eau est mal connue, mais sa possibilité de survie a été montrée chez des mammifères aquatiques sensibles ou porteurs sains, des amphibiens, des crustacés d'eau douce ou des organismes unicellulaires de type protozoaire (amibes libres).

L'homme n'est qu'un hôte accidentel dans ce cycle épidémiologique. Ce sont ses activités agricoles, forestières, d'élevage, de jardinage, sportives, de loisirs (cueillette, chasse) éventuellement de braconnage qui l'expose soit par des contacts directs, soit par des contacts indirects, aux animaux, à leur excréta ou aux vecteurs. Les sites privilégiés sont les zones humides et les proximités de cours d'eau. La maladie a la particularité d'évoluer par flambées puis de sembler s'éteindre pour réapparaître des années plus tard. D'autres facteurs favorisants interviennent: conditions climatiques, cycles de reproduction des petits mammifères et des vecteurs, gîtes, conditions alimentaires, migrations ([figure 1](#)).

Figure 1 : Cycle naturel de la tularémie



★ Mammifères pouvant être contaminés (suivant les sous-espèces de *Francisella*).

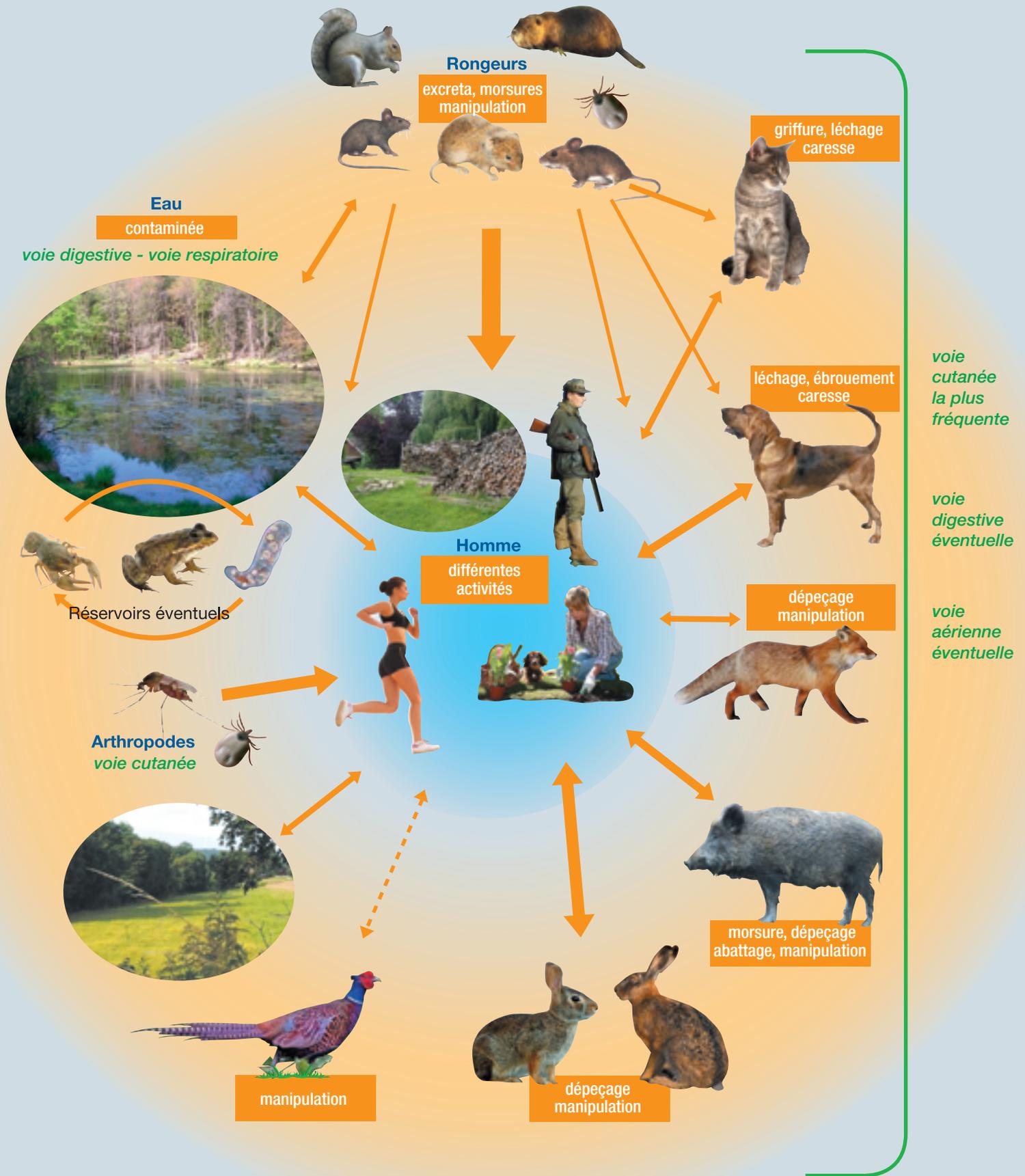
(J. Vaissaire 2006)

★ Mammifères, arthropodes, insectes pouvant être potentiellement contaminants pour l'homme (infectés ou porteurs sains transitoires).

Voies de transmission vers l'homme (figure 2)

- ◇ La transmission de la tularémie se fait le plus souvent par voie cutanée, par contact direct avec l'animal contaminé ou par les cadavres d'animaux morts de la maladie ou de façon indirecte par l'urine, les excréments, les poils, la peau d'animaux malades ou morts.
- ◇ Dix à 10^3 bactéries, suivant la virulence de la souche, peuvent suffire. Le germe pénètre au travers de la peau saine mais plus fréquemment par des excoriations cutanées, même minimes. Celui-ci peut aussi s'effectuer par voie conjonctivale, par simple frottement des paupières avec des mains contaminées.
- ◇ Un autre mode de transmission inter-animale ou entre l'animal et l'homme se fait par l'intermédiaire d'ectoparasites infectés. Ce sont les tiques, dans nos régions, qui semblent jouer le rôle le plus important, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus* et *reticulatus* essentiellement pour l'Eurasie, d'autres espèces peuvent intervenir éventuellement, tel que *Dermacentor andersoni* aux États-Unis. Les *Culicinés*, *Culex* sp., (moustiques) interviennent aussi en Europe Centrale et du Nord dans les régions humides ou marécageuses, ainsi que des insectes vecteurs mécaniques, tels que les *Stomoxynés* et les *Tabanidés*.
- ◇ La transmission peut aussi se faire par voie orale, par l'ingestion soit de viande mal cuite issue d'une carcasse contaminée, soit d'eau contaminée. Cette voie orale est généralement peu efficace et le nombre de bactéries ingérées doit être très important (au minimum 10^8 bactéries).
- ◇ Enfin, la transmission par voie respiratoire est très efficace et bien documentée lors de dépouillement de gibier, d'autopsies d'animaux atteints, d'une aérosolisation de bactéries dans des locaux à ventilation dynamique, ou encore lors d'utilisation de tondeuses à gazon dans des zones de gîtes de micromammifères. La quantité de bactéries inhalées pour provoquer la maladie peut être faible (10 à 10^2 ou plus, suivant les souches). Cette particularité a permis de classer *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* parmi les trois principales bactéries susceptibles d'être utilisées comme agent de guerre biologique et de bioterrorisme.
- ◇ La transmission inter-humaine n'a pas été décrite à ce jour, nous en avons, cependant, observé un cas en Alsace lors de soins après une morsure d'écureuil.

Figure 2 : Principaux types de transmission et de contamination naturelle de l'homme



type de contamination

voie de contamination

(J. Vaissaire 2006)

Géographie

La tularémie sévit dans l'hémisphère nord, le plus généralement entre le 30^{ème} et le 71^{ème} degrés de latitude.

Aux Etats-Unis, le nombre annuel de cas humains est passé de 1200 cas environ dans les années 1940 à environ 200 à 300 cas entre 1960 et 1969 pour ne plus être que d'une centaine dans les années 2000. Au Canada, les cas sont sporadiques. Dans les Pays de l'Est, les cas de quelques centaines à quelques milliers lors des années de flambées épidémiques, avant les années 1950, sont passés à quelques centaines à l'heure actuelle. Des flambées épidémiques sont encore observées. En 2000, 917 cas ont été recensés en Finlande et 468 en Suède. Au cours de l'hiver 1999, en pleine guerre au Kosovo, plus de 300 personnes ont été atteintes d'une forme oro-pharyngée où l'on a craint un temps une utilisation délibérée. Une épidémie à Moscou en 1995 a été imputée à du lait contaminé et à de l'eau de puits souillée. En Allemagne, on dénombre quelques foyers sporadiques. L'Espagne a découvert ses premiers cas dans la province du Léon en 1997, puis en 1999. En Italie, quelques foyers sporadiques apparaissent annuellement. En Suisse, en 1998, un cas chez un ouistiti à toupet blanc (*Callithrix jacchus*) appartenant à un particulier, puis chez un lièvre du même canton et enfin sur une tique ont relancé les recherches. *Francisella* n'y avait plus été mis en évidence depuis 1973 sur une marmotte.

La maladie est apparemment inconnue en Angleterre, en Amérique du Sud et en Afrique (figure 3).

En France, la surveillance animale (réseau SAGIR) permet de recenser entre 30 à 60 cas annuels chez les lièvres. Elle sévit toujours de façon endémique sur les lièvres d'Europe Centrale et les importations de ces animaux peuvent éventuellement être à l'origine de cas. On en dénombre vraisemblablement à peu près autant chez l'homme, mais les chiffres sont difficiles à définir, l'affection n'est devenue une maladie à déclaration obligatoire en humaine que depuis 2002, et n'est plus une Maladie Réputée Légalement Contagieuse (MRLC) chez l'animal depuis 1996. En santé animale, elle est devenue une maladie à déclaration obligatoire (MDO) depuis 2006 (Décret 2006-179 du 17 février 2006).

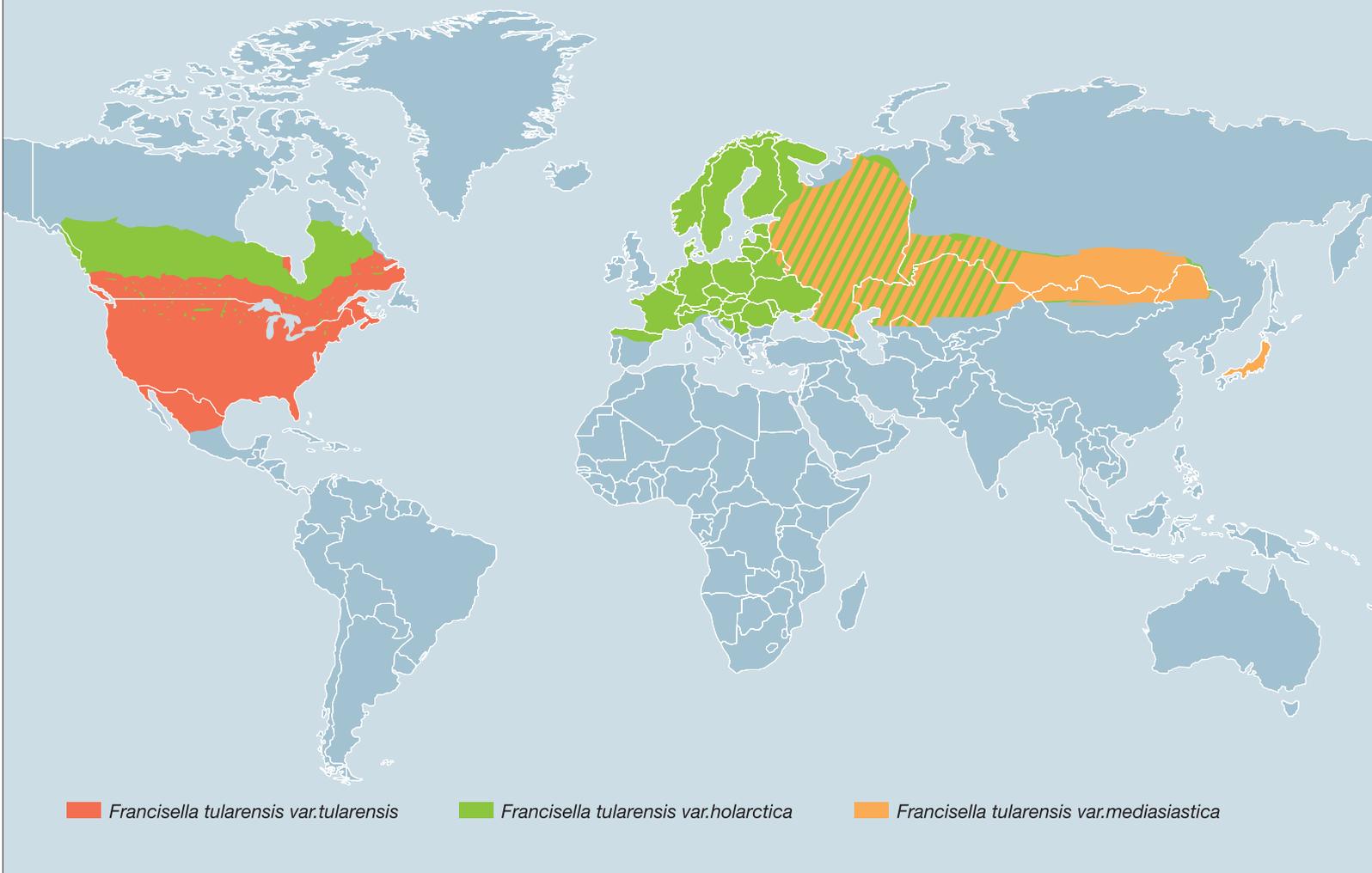
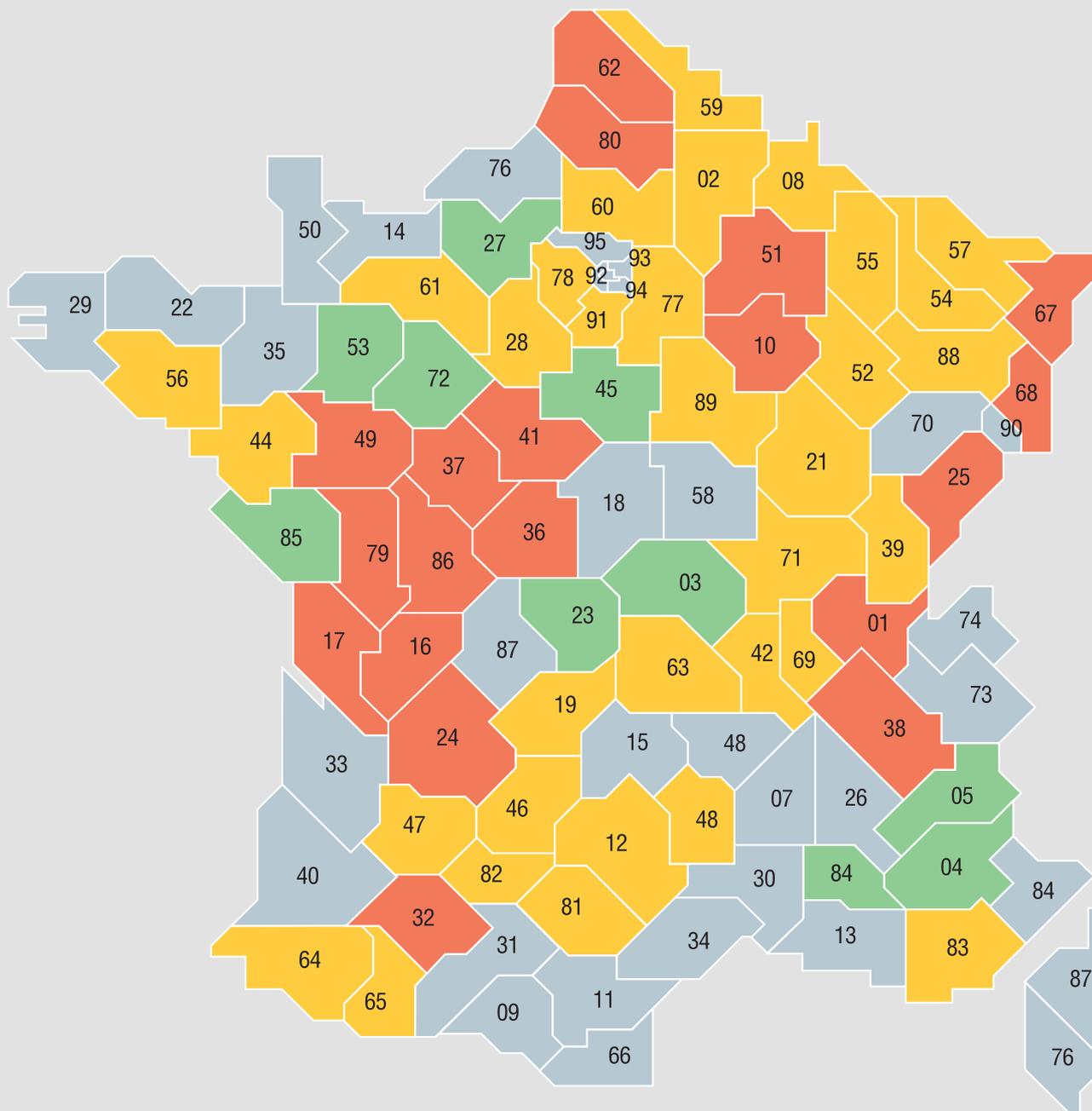


Figure 3 : La tularémie : situation dans le monde

En France, grâce à la déclaration obligatoire, vingt cas sporadiques ont été notifiés en 2003 et 21 en 2004 représentant une incidence annuelle de 0,03 cas pour 100 000 habitants, sans doute sous-estimée. Parmi ces 41 patients, 25 (61 %) présentaient une forme ganglionnaire. Une exposition à risque était retrouvée pour 40 patients (98 %) dont 20 (49 %) avaient dépecé du gibier, 8 avaient été mordus par une tique (20 %) et 1 patient avait été contaminé dans un laboratoire.

Les patients résidaient principalement en Poitou-Charentes, Touraine, Sologne et en Alsace-Lorraine. Cependant des cas sporadiques sont trouvés hors de ces régions. En 2004, un épisode de 14 cas groupés lié à une source commune aéroportée est survenu en Vendée. La majorité des diagnostics a été établie par sérologie. L'isolement de la bactérie est rare, car le diagnostic de suspicion est souvent tardif. Les expositions à risque les plus retrouvées étaient le dépeçage d'un animal de la faune sauvage, la manipulation de végétaux vulnérants, les morsures de tiques et enfin, les loisirs en plein air (figure 4).

Figure 4 : La tularémie animale : situation des foyers en France (1991-2004)



(J. Vaissaire 2006)

Cas répertoriés (foyers majoritairement répertoriés chez les lièvres)

- Départements régulièrement atteints chaque année
- Départements irrégulièrement atteints chaque année
- Départements ayant eu des cas sporadiques ces dix dernières années
- Départements n'ayant eu des cas ou absence de données

Aspects cliniques

Chez l'homme, la période d'incubation est de 3 à 8 jours, mais elle peut varier de 2 à 15 jours. Il existe diverses formes cliniques de la maladie qui sont déterminées par la voie d'entrée de l'agent causal.

Quelle que soit la forme, la maladie débute soudainement, avec de la fièvre qui peut-être ondulante, des frissons, des céphalées, des myalgies, des douleurs articulaires, des vomissements étant possibles, et une asthénie importante est rapportée.

► **Tularémie ulcéro-ganglionnaire** : c'est la forme la plus fréquente, qui représente environ 80 % des cas. Une lésion se forme au point d'inoculation de l'agent, suite à une égratignure, une érosion cutanée ou à une piqûre de vecteur et donne une ulcération. A partir de cette lésion, la bactérie gagne, par voie lymphatique, le ganglion qui draine le territoire correspondant et s'y multiplie. Une adénopathie régionale apparaît avec évolution vers une abcédation, fistulisation et sclérose. Lors de contact avec des petits animaux de la faune sauvage ou autre mammifère, la lésion est très souvent à la main ou à un doigt. Lors de piqûre de tiques, l'ulcère est retrouvé aux membres inférieurs ou en région périnéale dans 50 % des cas, au tronc dans 30 % des cas ou à la tête dans 5 à 10 % des cas. De façon pathognomonique, la lésion d'inoculation qui semblait en voie de guérison se réactive lors de l'éclosion de l'adénopathie (**figure 5a, 5b et 5c**).

Des éruptions cutanées peuvent s'observer sur le membre ou la région proche du point d'inoculation (cf. formes atypiques).

► **Tularémie ganglionnaire** : cette forme est similaire à la forme ulcéro-ganglionnaire, mais il n'est pas retrouvé de chancre d'inoculation.

► **Tularémie oculo-ganglionnaire** : cette forme se développe lorsque du matériel contaminé (éclaboussures ou frottement avec des mains souillées) entre en contact avec la conjonctive. La lésion est souvent unilatérale et touche majoritairement la paupière inférieure avec formation d'un petit nodule ou d'une lésion ulcéreuse. Une conjonctivite purulente, douloureuse se déclare avec quelquefois un oedème périorbital et une adénopathie satellite (syndrome de Parinaud). Ces formes sont rares, moins de 5 % des cas.



photo : Le Coustumier



photo : Le Coustumier

Figures 5a et b : Chancre tularémique

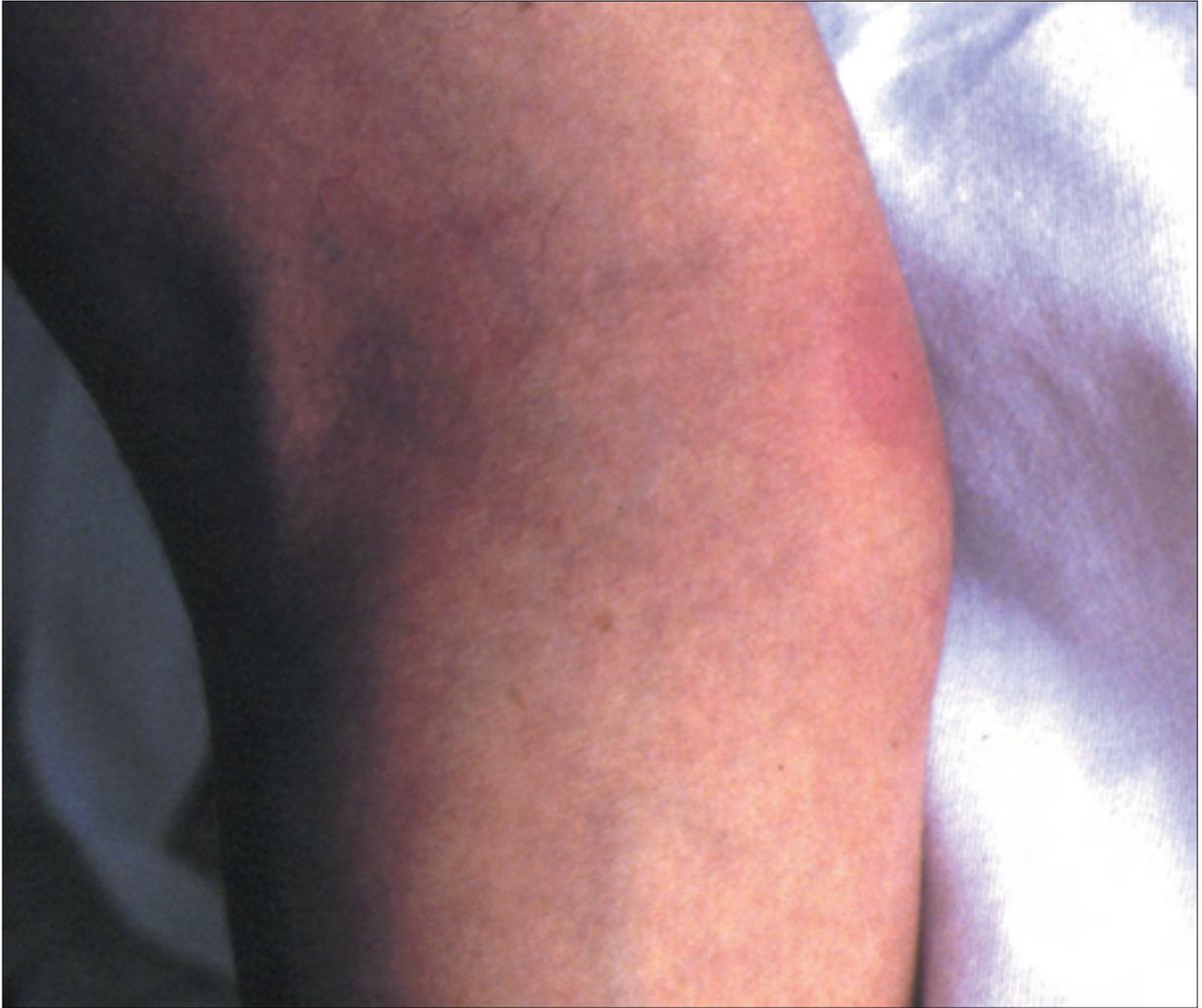


photo : Le Coustumier

Figure 5c : Adénopathie (ganglion épitrochléen)

► **Tularémie oro-pharyngée** : cette forme est également peu fréquente, mais peut se constater lors de l'ingestion de viande de lièvre malade insuffisamment cuite ou lors de l'ingestion de végétaux contaminés par de l'urine ou des excréments d'animaux malades et consommés crus ou insuffisamment lavés ou lors d'ingestion d'aliments avec des mains souillées. On observe une angine, une sécheresse de la muqueuse buccale avec une sensation de brûlure très caractéristique. Elle s'accompagne d'une adénopathie cervicale le plus souvent. Elle peut se compliquer de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements, de diarrhée qui peut quelquefois être hémorragique (ulcérations intestinales) avec adénopathie mésentérique.

► **Tularémie pulmonaire** : cette maladie est de diagnostic difficile et peu fréquent, car peu envisagé. Cette forme primaire peut se manifester lors d'inhalation d'un petit nombre de bactéries en aérosol, mais aussi dans les formes secondaires, elle peut suivre une dissémination septicémique. Une pneumonie franche peut se déclarer uni ou

bilatérale, avec une toux sèche, de la dyspnée et des douleurs thoraciques. Une détresse respiratoire peut s'installer. L'examen radiographique peut montrer des îlots de pneumonie au niveau d'un ou plusieurs lobes avec souvent une pleurésie accompagnée d'adénopathies péri-hilaires. Des formes pulmonaires peuvent être secondaires à des formes ulcéroganglionnaires dans 10 à 15 % des cas et à des formes typhoïdiques dans 30 à 70 % des cas.

▶ **Tularémie : forme typhoïdique** : cette forme septicémique pure, paucisymptomatique se traduisant souvent par une fièvre nue est de diagnostic très difficile. Elle est peu fréquente.

▶ Elle peut être associée à une **forme digestive** primaire ou secondaire où on peut observer des signes de gastro-entérite et de toxémie. Des lésions ulcéreuses peuvent apparaître sur les muqueuses de l'ensemble du tube digestif, s'accompagnant d'adénites cervicales, pharyngées et mésentériques. Elle peut être causée par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminée.

Les localisations pulmonaires secondaires sont assez fréquentes, mais les formes pulmonaires peuvent aussi dégénérer en formes typhoïdiques.

L'évolution dépend principalement de la virulence de la souche causale.

▶ **Tularémie : formes atypiques** : des éruptions cutanées peuvent s'observer dans 10 à 20 % des cas (tularémides) localisées sur le membre ou les régions proches du point d'inoculation. Des méningites, des endocardites, des péricardites, des pleurésies, des péritonites sont aussi possibles. Des insuffisances rénales aiguës et des hépatites peuvent survenir.

Evolution de la maladie

Elle est de 3 à 5 semaines et le taux de mortalité peut évoluer de 1 à 10 % en l'absence de traitement et suivant la virulence de l'agent causal, faible pour les souches européennes et américaines de type B, élevée pour les souches américaines de type A. La convalescence est longue de plusieurs semaines à plusieurs mois, l'asthénie pouvant persister plusieurs semaines.

En conclusion, la clinique partage donc une symptomatologie qui peut faire évoquer la brucellose, pour certains symptômes une maladie de Lyme, une chlamydie, une fièvre Q ou une peste bubonique, etc...

L'agent causal : *Francisella tularensis*

L'agent de la tularémie (*Francisella tularensis*) est un petit coccobacille à Gram négatif. Cette bactérie a connu des appellations successives : *Bacterium tularense*, *Pasteurella tularensis*, *Brucella tularensis*, *Francisella tularense* puis *Francisella tularensis* d'une part, en hommage des microbiologistes soviétiques à l'égard de Francis, et d'autre part, à sa première localisation dans le comté de Tulare en Californie. Cette bactérie intracellulaire est entourée d'une capsule pour les formes virulentes, de 0,02 à 0,04 µm d'épaisseur qui, si elle disparaît, s'accompagne d'une perte de virulence. Les lipides de la paroi et ceux de la capsule sont en proportions inhabituelles (70 et 50 %) pour une bactérie à Gram-négatif et la nature des acides gras est particulière au genre *Francisella*. Après avoir été rangé dans les *Pasteurella*, le genre *Francisella* a une position taxonomique incertaine. Les études d'hybridation ADN-ADN et la valeur du G+C p.cent montrent qu'il n'est pas apparenté aux genres *Brucella*, *Escherichia*, *Pasteurella* ou *Yersinia*. L'étude de la séquence de l'ARNr16S montre que le genre *Francisella* appartient à la subdivision gamma des Proteobacteria. Après les travaux d'Olsujev et al., de Jellison et al., d'Aikimbaev, et d'Olsujev et Meschcheryakova en 1983, différentes sous-espèces de *F. tularensis* sont validées. Il s'agit de : *Francisella tularensis subsp. tularensis* (ancien biovar tularensis, ancien type A de Jellison), *Francisella tularensis subsp. holarctica* (ancien biovar appelé précédemment palearctica, ancien type B), *Francisella tularensis subsp. mediasiatica*. *Francisella philomiragia* est une espèce nouvelle pathogène pour l'homme, d'identification difficile en l'absence de critères moléculaires

F. tularensis subsp. tularensis (Ftt) est la plus virulente. Elle est isolée essentiellement en Amérique du Nord, particulièrement aux Etats-Unis, sa présence a été signalée en Europe (1998) chez des arthropodes en Slovaquie dans la région de Bratislava. Un petit nombre de bactéries (10 à 50) est capable par voie respiratoire ou cutanée de provoquer une maladie sévère chez l'homme avec un taux de létalité de 10% à 30% en l'absence de traitement antibiotique spécifique, mais qui peut être abaissé à 1% si le traitement est rapidement administré. La pathogénicité de cette sous-espèce en fait un agent de guerre bactériologique par les formes sévères et l'évolution invalidante prolongée de la maladie qu'elle détermine.

F. tularensis subsp. holarctica (Fth) est moins virulente. Elle est isolée essentiellement en Europe, et également aux Etats-Unis et au Canada où elle cohabite avec *Ftt* dans ces deux derniers pays. La maladie qu'elle détermine est beaucoup moins sévère avec un taux de létalité de 1% en l'absence de traitement, s'abaissant à 0,1% lors d'un traitement précoce.

Il en est de même pour *F. tularensis subsp. mediasiatica* qui sévit en Asie.

Physiopathologie

Cette bactérie pathogène intracellulaire a un tropisme d'organe avec atteinte du derme et du système réticulo-histiocytaire : ganglions lymphatiques, rate, foie. Après pénétration par voie cutanée ou muqueuse, les bactéries se multiplient localement, puis gagnent les ganglions lymphatiques qui drainent le territoire touché où elles s'y multiplient provoquant des adénites et des abcès. Elles passent une première fois dans le sang, puis se multiplient dans le foie, la rate, enfin provoquent une septicémie, le plus souvent mortelle chez l'animal sensible.

Les facteurs de pathogénicité sont mal connus. Ainsi la tularémie peut être contractée par ingestion d'une eau contaminée, mais aucune invasine n'a été identifiée et les mécanismes d'invasion de l'organisme à partir de l'intestin ne sont pas connus. *F. tularensis* pénètre dans les macrophages et s'y multiplie avec une inhibition de l'explosion respiratoire par la synthèse d'une phosphatase acide ou protéine *Acpa*, une inhibition de la fusion phagosomes-lysosomes et une acidification des phagosomes indispensable à la multiplication bactérienne. La bactérie possède un LPS qui n'induit pas la synthèse d'interleukine 1 par les macrophages, mais ne provoque la synthèse que de faibles quantités de TNF et de monoxyde d'azote qui est indispensable à la croissance dans les macrophages et pour la résistance au pouvoir bactéricide du sérum.

Diagnostic biologique

Commémoratifs

Compte tenu de la virulence de l'agent infectieux nécessitant certaines précautions ainsi que la nécessité d'employer des milieux de culture particuliers, un interrogatoire du patient est important et la suspicion clinique doit être impérativement signalée sur la feuille de demande d'examen (cf modèle) (figures 6, 7, 8).

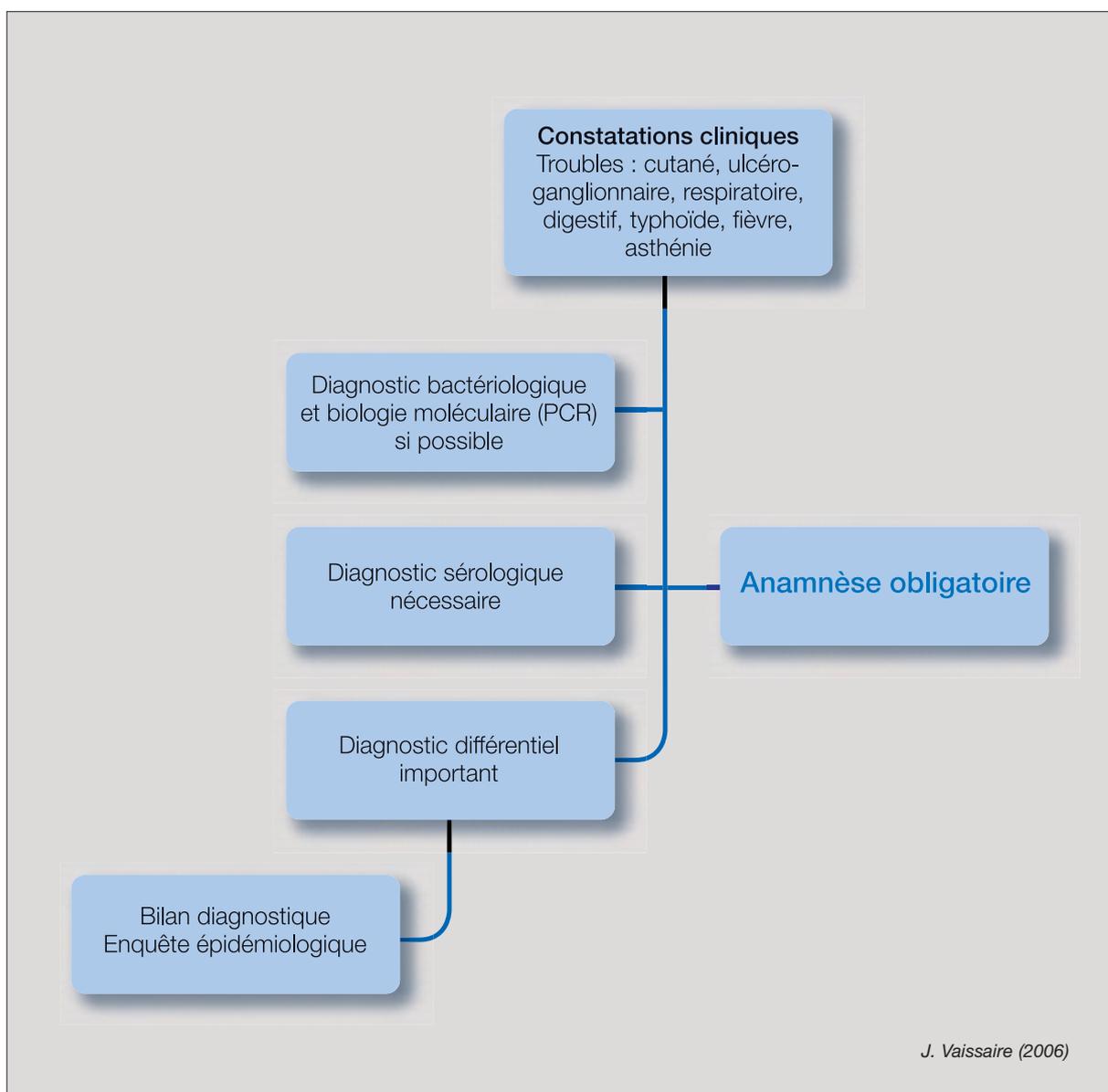


Figure 6 : Arbre décisionnel général

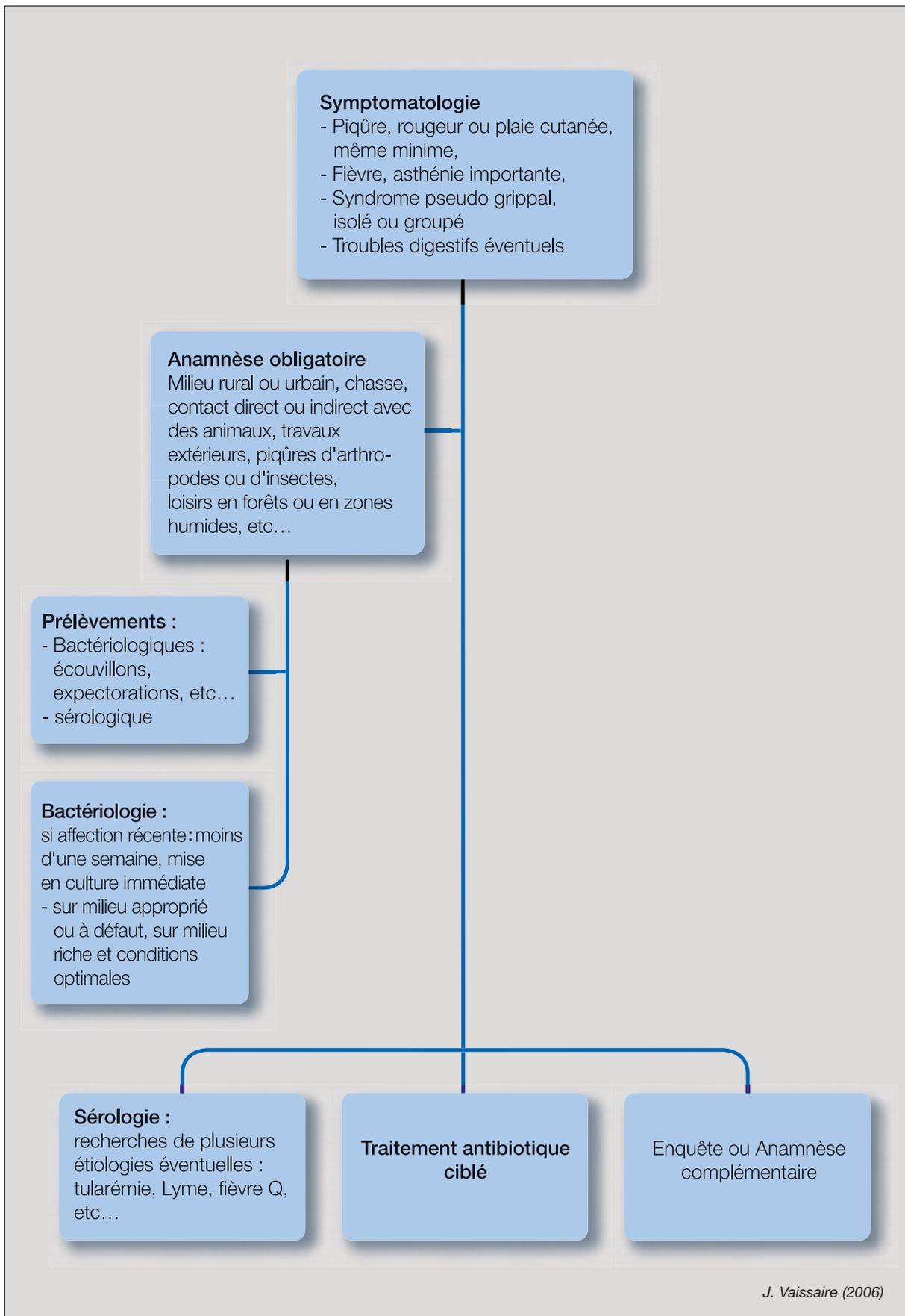


Figure 7 : Arbre décisionnel lors des premiers symptômes

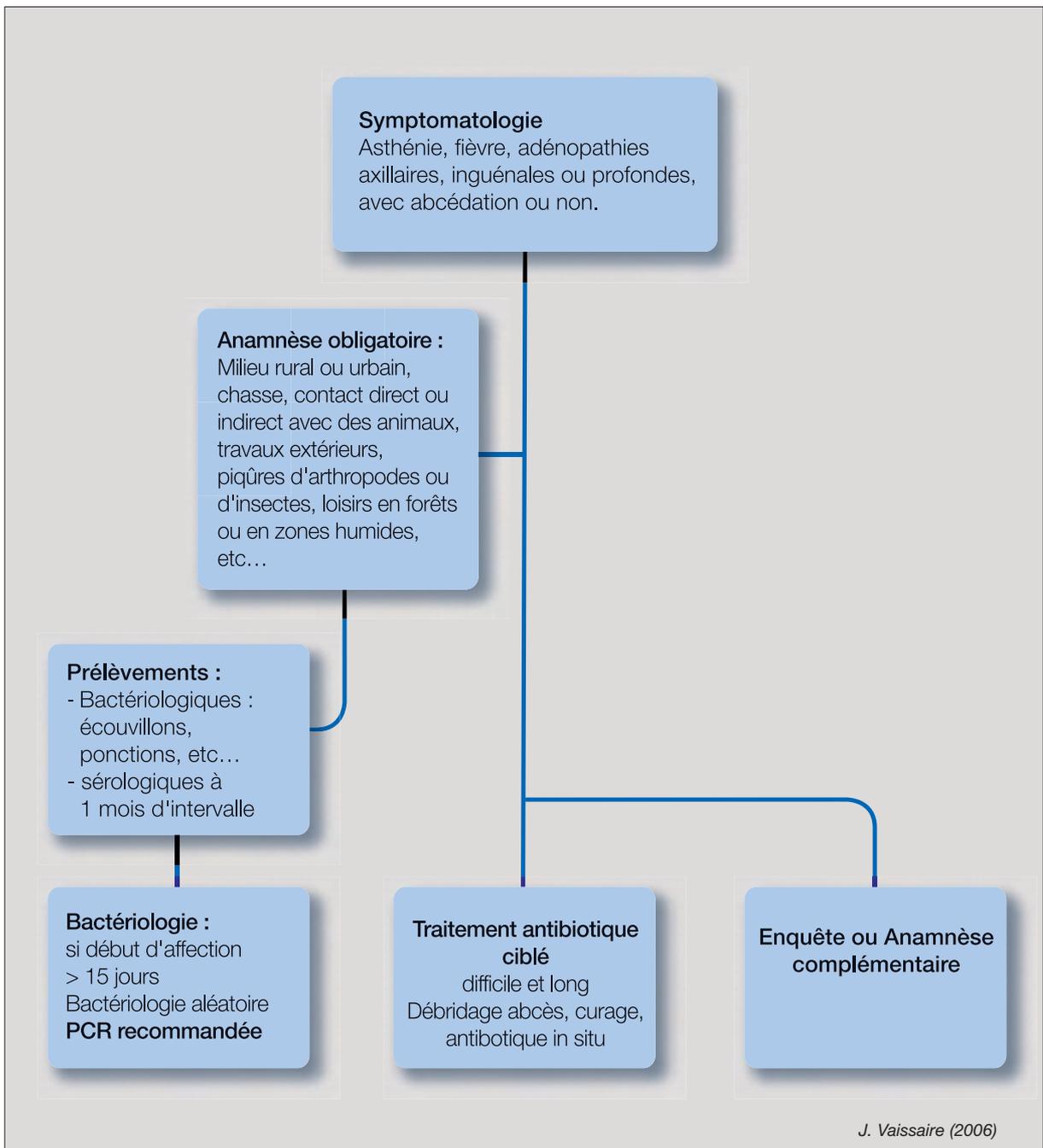


Figure 8 : Arbre décisionnel lors de l'apparition des adénopathies

- Hémogramme

Contrastant avec la sévérité des signes infectieux à la phase d'invasion, la leucocytose excède rarement 10 à 12.000 globules blancs/mm³. De même, la vitesse de sédimentation n'est que modestement augmentée, ainsi que la protéine C réactive qui peut atteindre précocement de 15 à 150 mg/l mais décroît très vite pour revenir quasiment à la normale en moins d'une semaine.

Diagnostic bactériologique

Avertissement : Il s'agit de bactéries entrant dans la classe biologique 2 pour la sous-espèce *holarctica*, mais dans la classe biologique 3 pour la sous-espèce *tularensis*, d'où le respect de règles de prévention simples dès la primoculture en travaillant sous une hotte microbiologique et en s'équipant d'une surblouse, de gants, de charlotte, de lunettes et de masque de protection sans omettre de manipuler, si possible, sous un poste microbiologique de sécurité (PSM II).

Dès la suspicion établie, il est rappelé que le CNR peut mettre en oeuvre diverses approches diagnostiques. Cependant l'envoi de toute souche obéit à des règles strictes (cf annexes pages 52-54).

Adresse du CNR : Laboratoire de Bactériologie et de Virologie, CHU de Grenoble. BP217 - 38043 Grenoble Cédex, Pr Max Maurin, Tél. : 04 76 76 54 79 - Télécopie : 04 76 76 59 12, courriel : mmaurin@chu-grenoble.fr

➡ Prélèvements

- Chez l'homme : la recherche de *F. tularensis* devrait être entreprise dès l'apparition de la lésion cutanée par un écouvillonnage de l'ulcère d'inoculation, par la ponction ou la biopsie ganglionnaire si la maladie est d'évolution récente (moins de 10 à 12 jours à partir desquels les cultures se négativent généralement), les expectorations, un rincage pharyngé en cas de forme pharyngée, le pus de conjonctivite en cas de syndrome de Parinaud ou encore par hémoculture dans les formes pulmonaires et typhoïdiques.

- Chez l'animal, la maladie évoluant le plus souvent sous forme de septicémie notamment chez les rongeurs et lagomorphes, les prélèvements *post-mortem* sont la rate, le foie, les poumons et la tête.

- Traitement des prélèvements: l'analyse bactériologique doit débiter le plus rapidement possible après prélèvement. Si cela n'est pas possible il sera gardé, et acheminé sous froid, de zéro à 4°C, dans les meilleurs délais dans un emballage sécurisé au laboratoire. Les milieux de transport d'Amies au charbon et le Cary Blair ont fait leurs preuves.

➡ **L'examen bactérioscopique direct** de ces produits et prélèvements après coloration de Gram reste illusoire en raison de la taille de ce coccobacille à Gram -, mais il est possible de l'observer moins difficilement après coloration au May Grünwald Giemsa.

➔ **Cultures** : *F. tularensis*, aérobie stricte, ne se développe que sur des milieux enrichis en cystéine. Sa culture est fastidieuse, et les milieux doivent être incubés et gardés au moins 10 jours à 37°C en aérobose, quelquefois plus, cependant les colonies peuvent apparaître en 48 heures. Quelques souches peuvent supporter une atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10 %). Les milieux de culture nécessitent l'adjonction de sang, de glucose, de cystine ou de cystéine, éventuellement du jaune d'œuf. Le pH optimum se situe entre 6,8 et 7,3.

- Les milieux historiquement recommandés sont le milieu de Francis, et celui de Mac Coy et Chapin.

- En pratique, serontensemencés des milieux de type gélose chocolat PVS ou Isovitalex® ou Polyvitex® selon la firme. Les prélèvements serontensemencés le plus rapidement possible après réception, la bactérie étant fragile et ne résistant que peu de temps à température ambiante. En cas de contamination de l'échantillon, la pousse de *Francisella* peut être inhibée par des bactéries de putréfaction telles qu'*Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*.... Pour y pallier, on peut supplémenter les milieux par une pénicilline et de la polymyxine ou une gélose chocolat sélective pour *Neisseria gonorrhoeae*. Il convient de ne pas oublier la possibilité de culture sur le milieu BCYE destiné à la culture de *Legionella*.

- Lors d'hémoculture, on gardera à l'esprit qu'il s'agit d'une bactérie aérobie stricte de croissance lente, d'où un délai d'incubation plus long, de 10 à 15 jours, voire 21 à 25 jours. Cependant, les automates actuels plus rapides conviennent à leur isolement, en de 4 à 6 jours en moyenne dans le flacon aérobie.

- Lors de culture en milieu liquide, on peut utiliser des bouillons tel le Thioglycolate riche en cystéine, ou à défaut le milieu Cœur Cerveille (BHI) ou Trypticase Soja à condition de supplémenter les deux derniers avec 1 % d'Isovitalex® ou de Polyvitex®. La pousse en bouillon est lente et la turbidité produite légère.

- **Aspect cultureux** : lors de sub-culture, *F. tularensis* pousse lentement sur milieu solide, les colonies apparaissant après 48 à 96 heures d'incubation aérobie. Sur la gélose chocolat supplémentée de type Polyvitex®, les colonies apparaissent fines, transparentes en 48h, puis de couleur beige à grisâtre, confluentes et grasses, et de consistance butyreuse caractéristique en 72 heures (**figures 9a, 9b, 9c**).

Il convient d'indiquer l'absence de croissance sur des milieux inappropriés tels que les milieux de Mueller-Hinton non enrichi, ou encore de trypticase soja non enrichi, constituant ainsi un caractère d'orientation diagnostique.

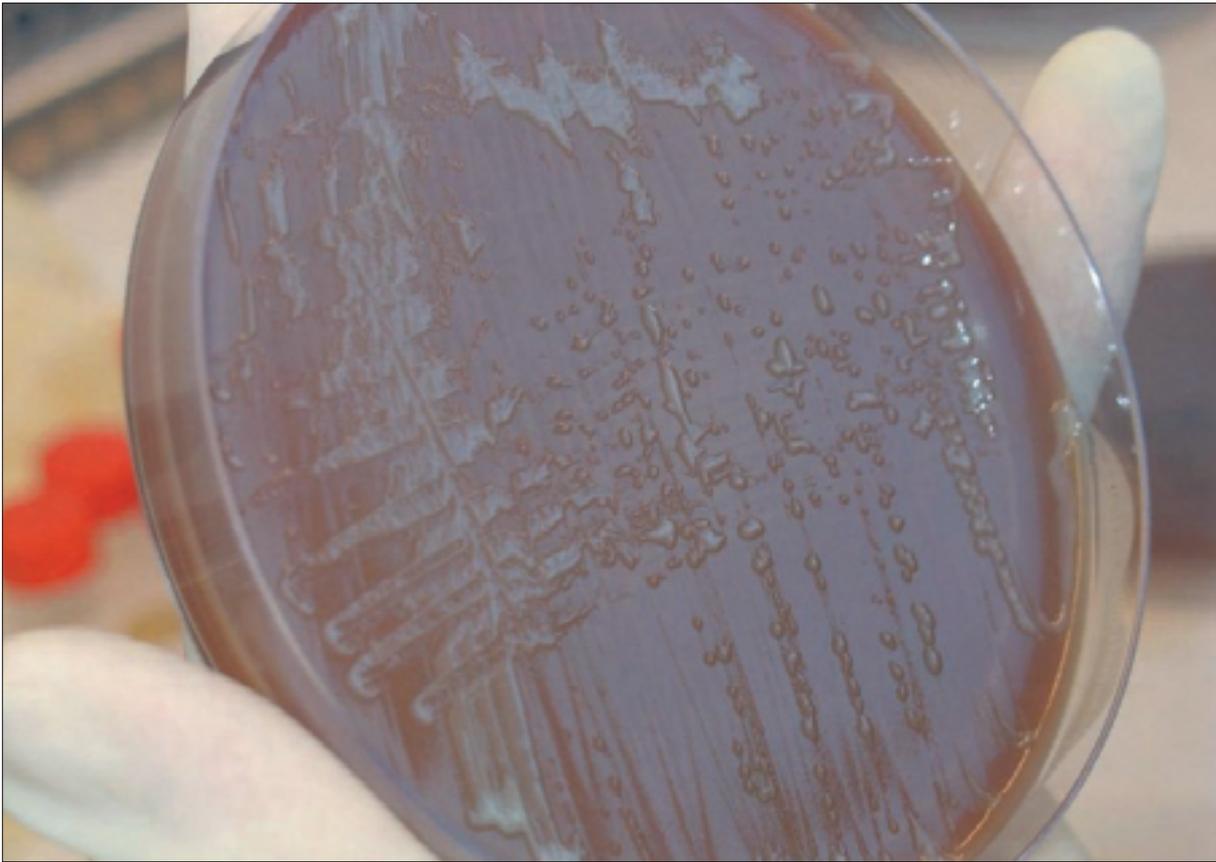


photo : J. Vaissaire

Figure 9a

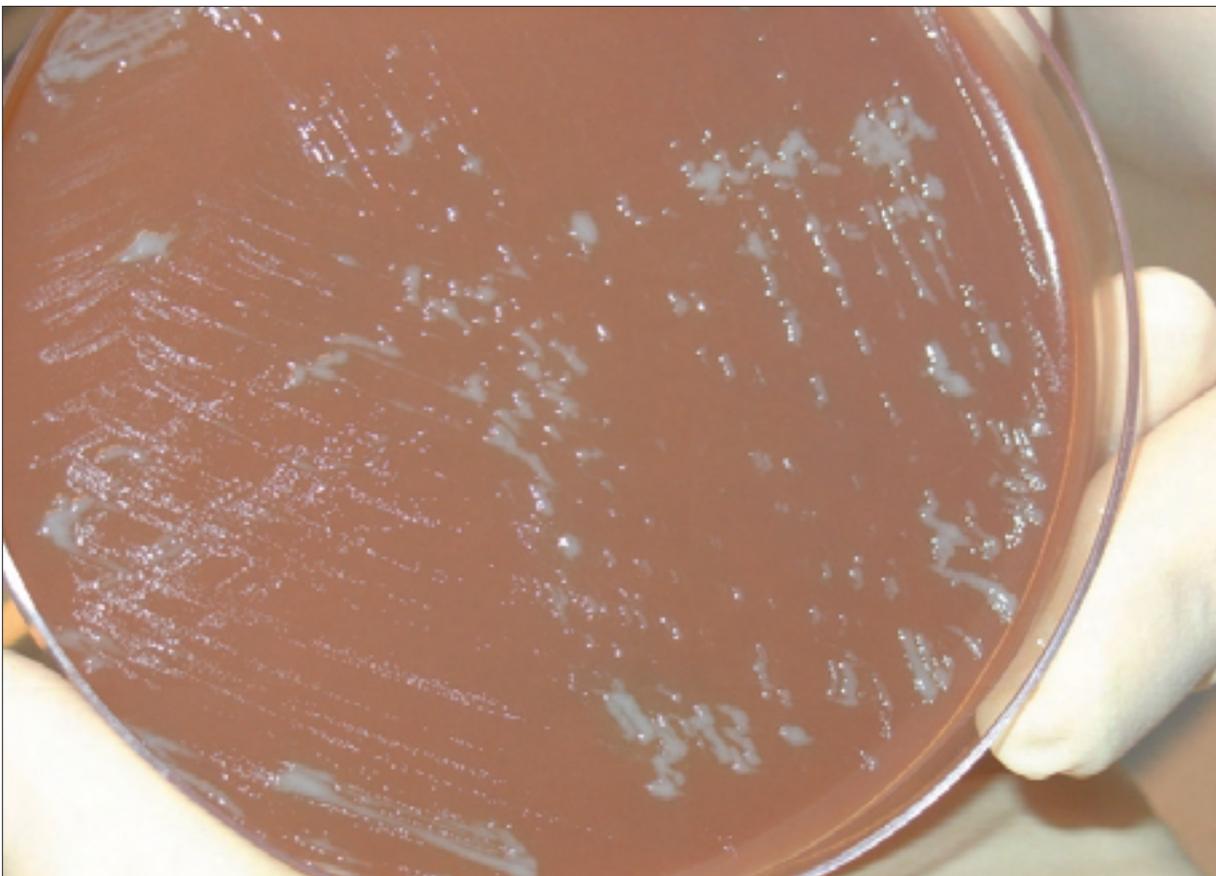


photo : J. Vaissaire

Figure 9b

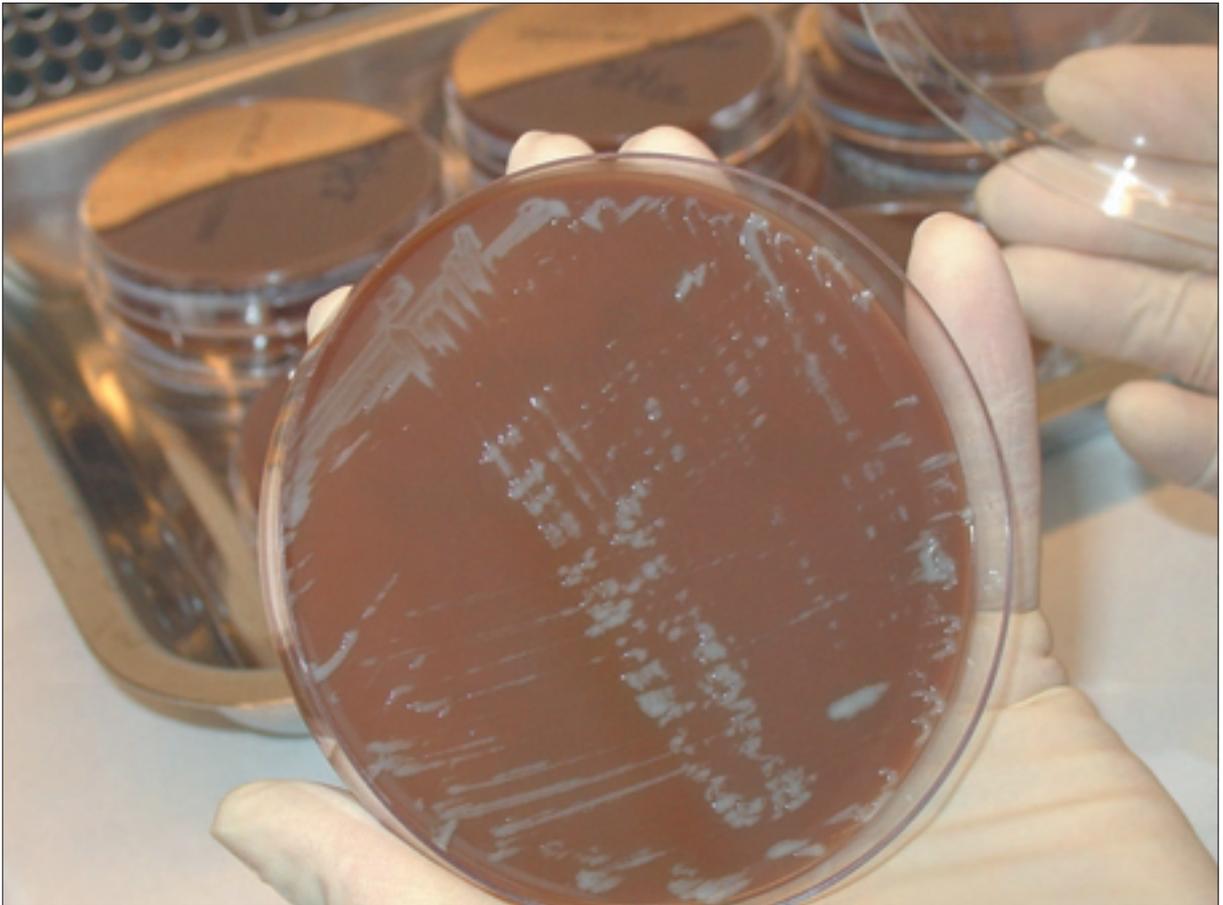


photo : J. Vaissaire

Figure 9c

Figures 9a, 9b et 9c : Aspects cultureux sur des géloses chocolat Polyvitex® (Biorad®) après 48 à 72 h d'incubation à 37°C.

- **La coloration de Gram** à partir de la culture révèle la présence de coccobacilles à Gram-négatif (souvent mal colorés) de très petite taille (0,2–0,5 x 0,7-1 µm), pléomorphes, souvent isolés. *F. tularensis* est plus petite que *Haemophilus influenzae*, ressemble à une *Brucella*, et l'interprétation du Gram, particulièrement dans les bouillons, peut être délicate (figure 10).

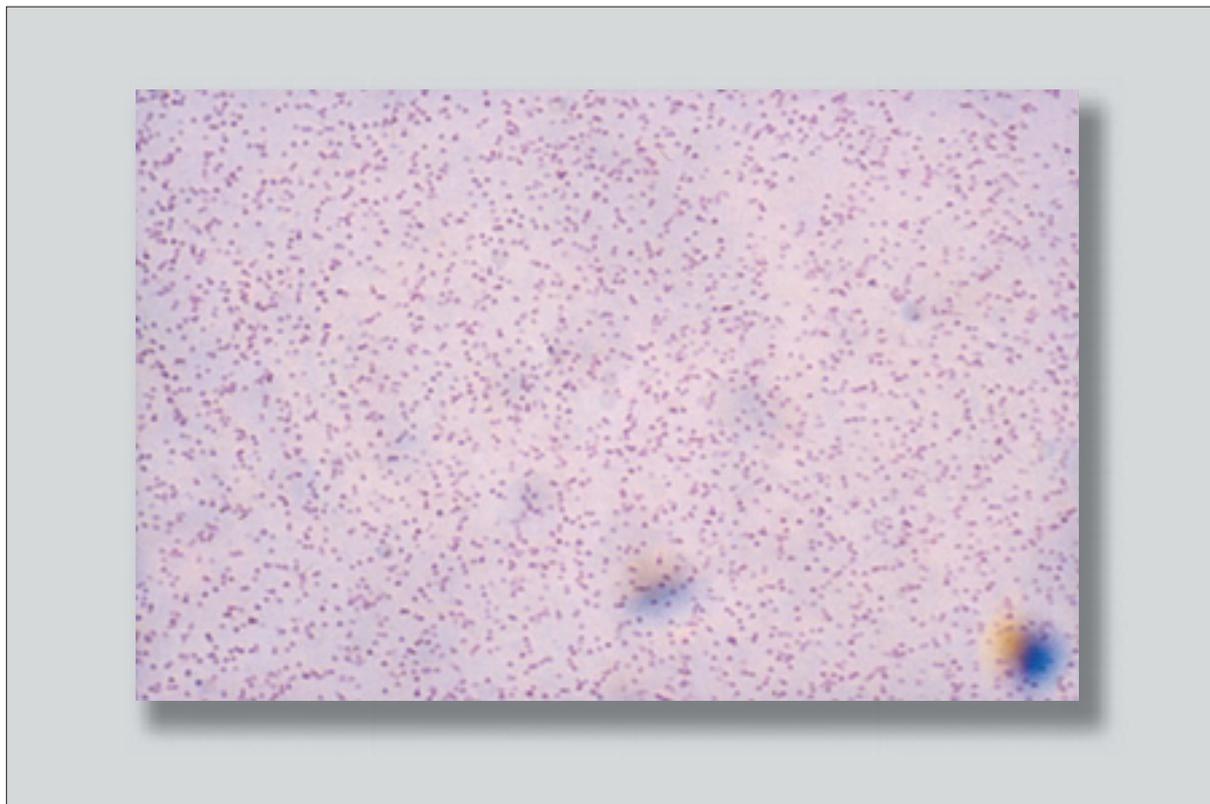


photo : A. Le Coustumier

Figure 10 : *F. tularensis* : coloration de Gram (G X 1000).

➡ **Caractères d'identification :** Les caractères d'orientation vers *F. tularensis* sont l'oxydase négative et la catalase faiblement positive sur lame (à faire en tube). D'autres tests peuvent conforter l'orientation: nitrate réductase négative, uréase négative (contrairement aux *Brucella*), test de satellitisme X, V et X+V négatif sur gélose nutritive (contrairement aux *Haemophilus*). Certaines galeries commerciales peuvent orienter à tort vers des bactéries de type *Haemophilus influenzae* ou *Actinobacillus spp.* Quelques caractères biochimiques peuvent être recherchés en pratique avec l'ensemencement d'une galerie API NH bioMérieux (24 à 48 h d'incubation à 37°C) (figure 11). *F. tularensis* est peu glucidolytique et acidifie sans production de gaz, le glucose, le fructose, le mannose et encore le maltose, mais n'acidifie pas le saccharose (différenciation avec *F. novicida*).



photo : J. Vaissaire

Figure 11 : *F. tularensis* : lecture d'une galerie API NH de BioMérieux® après 48 h d'incubation à 37°C

On notera que les automates d'identification tel Vitek-2® et Phoenix® permettent depuis peu, l'identification de *F. tularensis* en quelques heures.

- Si le laboratoire dispose de l'immun-sérum spécifique (Difco BD), une agglutination en tube ou sur lame renforcera la suspicion.
- Compte tenu de l'incertitude des caractères d'identification, souvent peu marqués, mais aussi de la rareté d'isolement de cette bactérie en France, l'antibiogramme peut constituer une orientation dans l'identification présomptive.
- Cependant les caractères d'orientation de base restent : les exigences culturales, l'aspect des cultures, l'oxydase, la catalase, la coloration de Gram, l'agglutination avec un immun-sérum spécifique. La souche sera transmise pour identification formelle au CNR.

➡ **Antibiogramme, sensibilité aux antibiotiques :**

L'antibiogramme est habituellement pratiqué par diffusion sur une gélose chocolat enrichie et incubée 48 heures à 37°C en aérobiose (figure 12). Le E-test peut être utilisé pour préciser les CMI à certains antibiotiques (figure 13). Il existe d'autres méthodes de détermination (figure 14).

Le phénotype sauvage de cette espèce se caractérise *in vitro* par une résistance naturelle vis-à-vis de la pénicilline G, de l'amoxicilline, des céphalosporines de première, deuxième et troisième génération avec une grande sensibilité vis-à-vis des aminosides (streptomycine, kanamycine, gentamicine), du chloramphénicol, de la tétracycline, de la minocycline, de l'érythromycine (à l'exception des souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar II), de la spiramycine (sensibilité parfois intermédiaire), des streptogramines telle la pristinamycine mais d'une résistance vis-à-vis de la lincomycine. La résistance aux céphalosporines de troisième génération, plutôt inhabituelle chez un "petit bacille à Gram-négatif fastidieux" doit interpeller et faire évoquer *Francisella*.



photo : J. Vaissaire

Figure 12 : Antibiogramme par diffusion sur une gélose Mueller Hinton chocolat Poyvitex® (méthode des disques)

Liste des antibiotiques de gauche à droite et de haut en bas :

rangée 1 : Amoxicilline, Ticarcilline, Pipéracilline, Céfépime

rangée 2 : Céfalotine, Amoxicilline + acide clavulanique, Doxycycline, Pipéracilline + tazobactam

rangée 3 : Céfoxitine, Céfuroxime, Ticarcilline + acide clavulanique, Tétracycline

rangée 4 : Méropénème, Minocycline, Céfotaxime, Streptomycine.



photo : E. Valade - J.C. Paucod (CRSSA)

Figure 13 : Détermination de la CMI par E-test sur un milieu de Mueller-Hinton enrichi (Isovitalex®) après 48 h d'incubation à 37°C

EM, érythromycine ; SM, streptomycine ; IP, imipénème

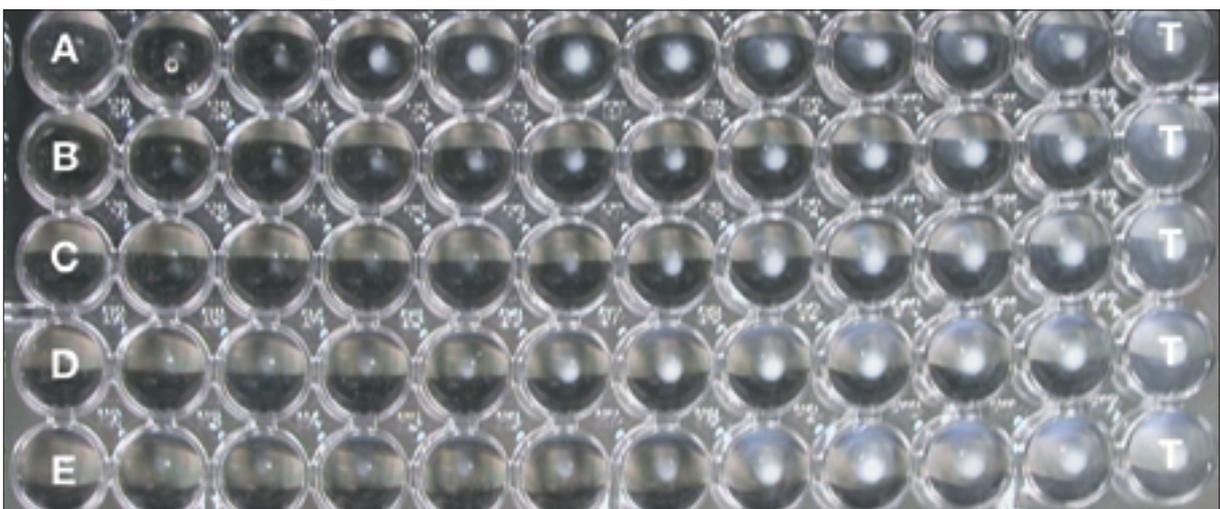


photo : E. Valade - J.C. Paucod (CRSSA)

Figure 14 : Détermination de la CMI de 5 antibiotiques (A-E) par microméthode de dilution en milieu liquide (Mueller-Hinton enrichi en Isovitalex®) : aspect après 48 h d'incubation à 37°C.

T, témoin de croissance

Inoculation à la souris :

Cette épreuve reste maintenant réservée à quelques laboratoires. Un volume de 0,2 à 0,3 ml de broyat obtenu en sérum physiologique est inoculé à la souris par voie sous-cutanée ou intradermique ou déposé sur le dos rasé de l'animal pour les prélèvements souillés, sous hotte PSM II, et au mieux en animalerie protégée. Si le prélèvement est porteur de *Francisella*, la mort de la souris survient en 4 à 10 jours, suivant la virulence de la souche et son état de conservation. Plusieurs lames par apposition d'organes (foie, rate) peuvent être préparées et colorées (Gram, mais surtout MGG -figures 15 et 16). L'isolement se fait par l'ensemencement des organes (foie, rate, cerveau) de la souris après autopsie.

Diagnostic indirect (Sérodiagnostic)

La tularémie est souvent suspectée tardivement chez l'homme suite à l'apparition d'une adénopathie ou encore lors de l'interrogatoire tardif du patient qui peut apporter des précisions sur un éventuel contact avec des animaux ou le souvenir d'une piqûre d'arthropodes ou d'acariens ou lors d'échecs thérapeutiques souvent multiples. Ce diagnostic indirect par séro-agglutination permet la détection de 70 à 90% des cas en France. Sa technique est simple et similaire à celle du sérodiagnostic de Wright utilisé en brucellose. L'antigène est une suspension stabilisée phénolée ou formolée, de *F. tularensis* (Becton Dickinson, Difco USA, Bioveta, Tchéquie). Elle permet un test de dépistage sur lame et la détermination du titre en tube.

Ces antigènes peuvent être utilisés également dans une réaction de microagglutination qui est légèrement plus précoce et sensible, donnant en moyenne des titres 4 fois plus élevés que la macro-agglutination classique.

Les agglutinines (IgM) apparaissent après le 10^{ème} jour après le début de l'affection et atteignent leur titre maximal au bout de deux mois, elles persistent très longtemps, souvent plusieurs années. Cette persistance rend leur utilisation pour le moins délicate pour dater les infections récentes. Les traitements antibiotiques n'influencent pas la courbe des anticorps. En macro-agglutination un titre précoce du 1/40^{ème} est présomptif, surtout en présence de symptômes rapportés ci-dessus. Le diagnostic est confirmé par la séroconversion ou l'accroissement par au moins 4 du titre du sérum tardif 3 semaines à un mois plus tard en phase de convalescence.

Des tests ELISA ont été développés mais ne sont pas commercialisés.

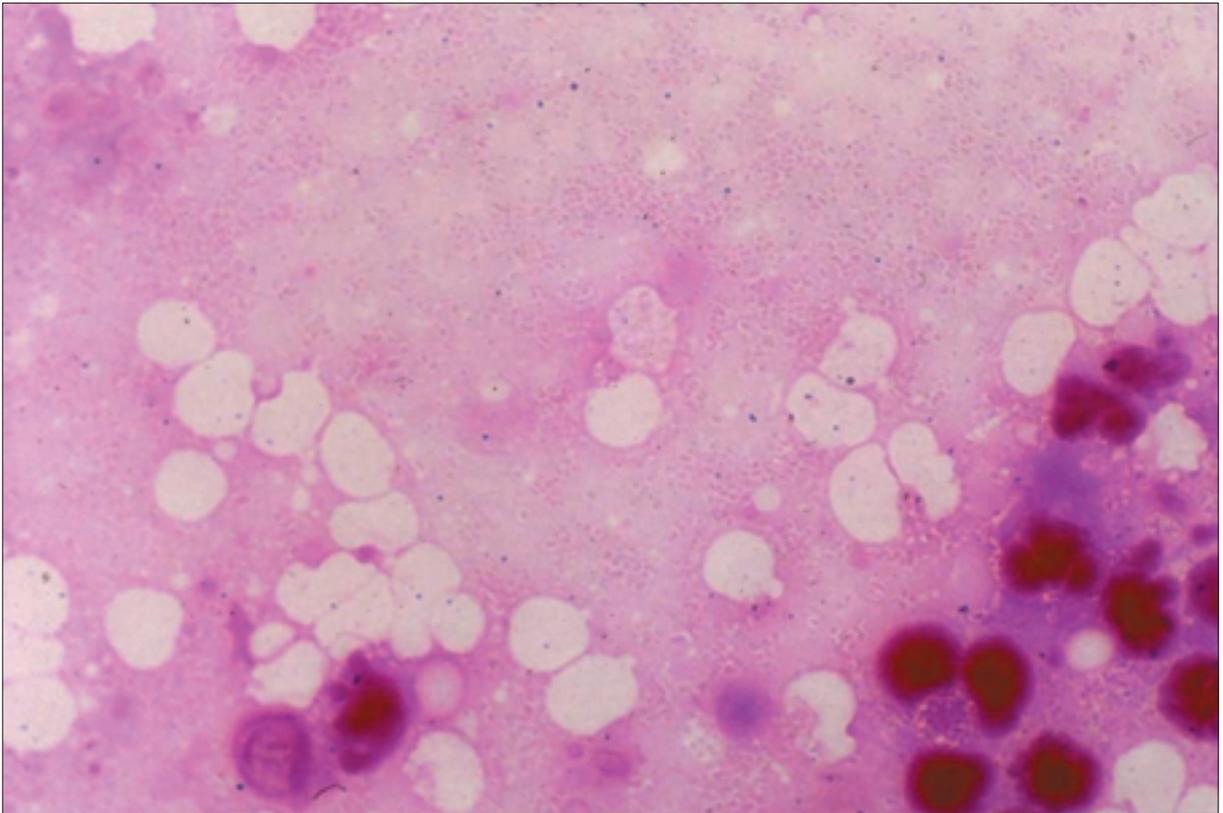


photo : JM. Alonso IP Paris

Figure 15 : Apposition de rate de souris 72 h après l'inoculation percutanée d'une suspension de *Francisella tularensis* après coloration de Gram.

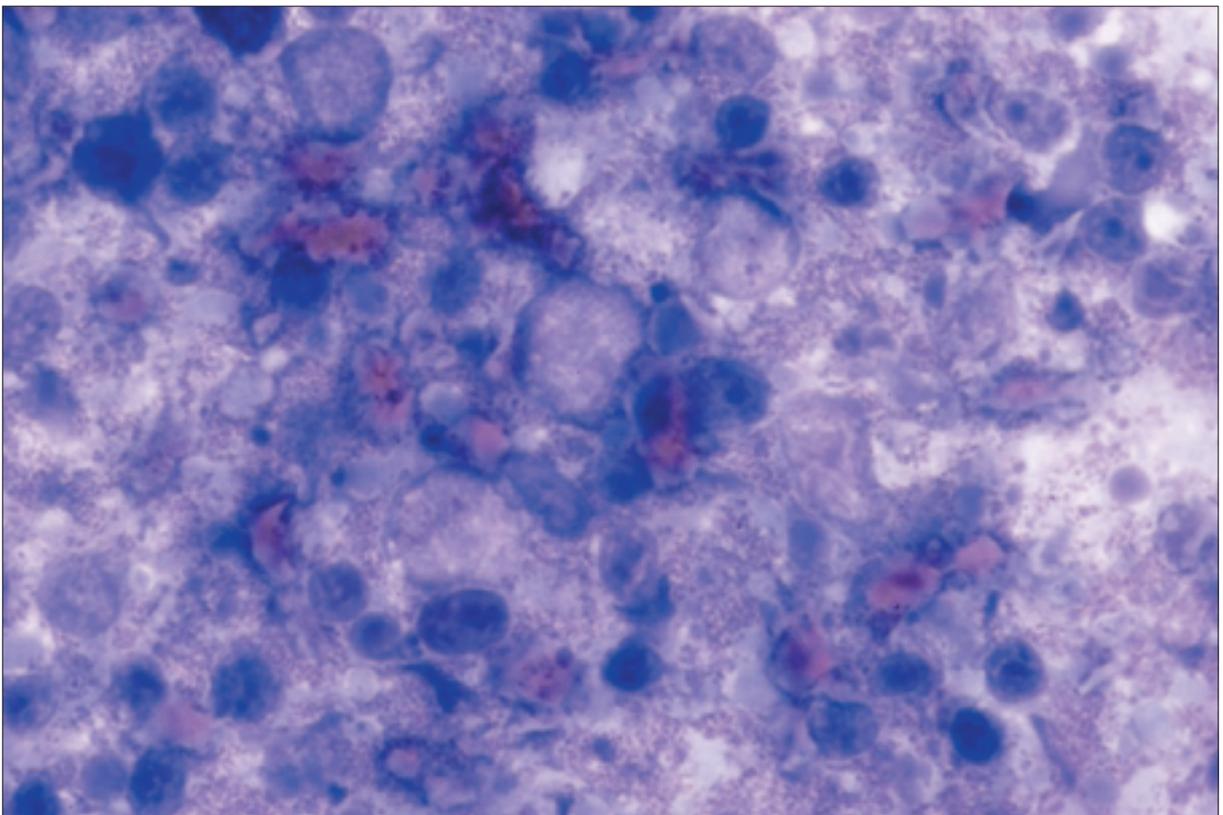


photo : JM. Alonso IP Paris

Figure 16 : Apposition de rate de souris 72 h après l'inoculation percutanée d'une suspension de *Francisella tularensis* après coloration de May Grünwald Giemsa (MGG).

Diagnostic allergique (intradermoréaction)

Ce diagnostic n'a qu'un intérêt anecdotique depuis l'arrêt de la préparation de la tularine (allergène) depuis 1987. La tularine est un autolysat de *F. tularensis* chauffé employé en injection intradermique. Cette réaction d'hypersensibilité est très spécifique et la plus précoce et reste intéressante pour la détection de personnes contaminées dans une large population exposée.

Nouvelles techniques de diagnostic

Amplification génique in vitro (PCR) :

La PCR a été appliquée avec succès à partir d'échantillons biologiques infectés tant chez l'homme que chez les animaux : écouvillonnage d'ulcère, biopsies ganglionnaires, pus, prélèvements d'organes: rate, poumons, foie, peau, moelle osseuse ds os longs. Ces techniques permettent de mettre en évidence des bactéries peu revivifiables ou mortes sur des prélèvements tardifs ou effectués après traitements antibiotiques. Elles sont aussi très utiles sur des échantillons biologiques polycontaminés où les chances d'isoler la bactérie sont minimales (figure 17).

Plusieurs techniques d'amplification de séquences de l'ADN génomique de *F. tularensis* sont utilisées avec succès par amplification de gènes codant pour des protéines ARNr16S (figure 18) ou pour la lipoprotéine de membrane externe 17Kda.

L'amplification des gènes codant pour les ARNr16S , maintenant très utilisée dans les laboratoires, au moins hospitaliers, permet après séquençage de différencier avec certitude *F. tularensis subsp. tularensis* de *F. tularensis subsp.holarctica*. L'analyse rapide de la séquence sur BIBI apporte une grande sécurité au diagnostic (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>)

Il existe plusieurs choix d'amorces pour un diagnostic de certitude en fonction de l'espèce à identifier (tableau 1). Dans cette éventualité, le plus simple consiste à adresser la souche au CNR des *Francisella* (cf annexes pages 52-54).

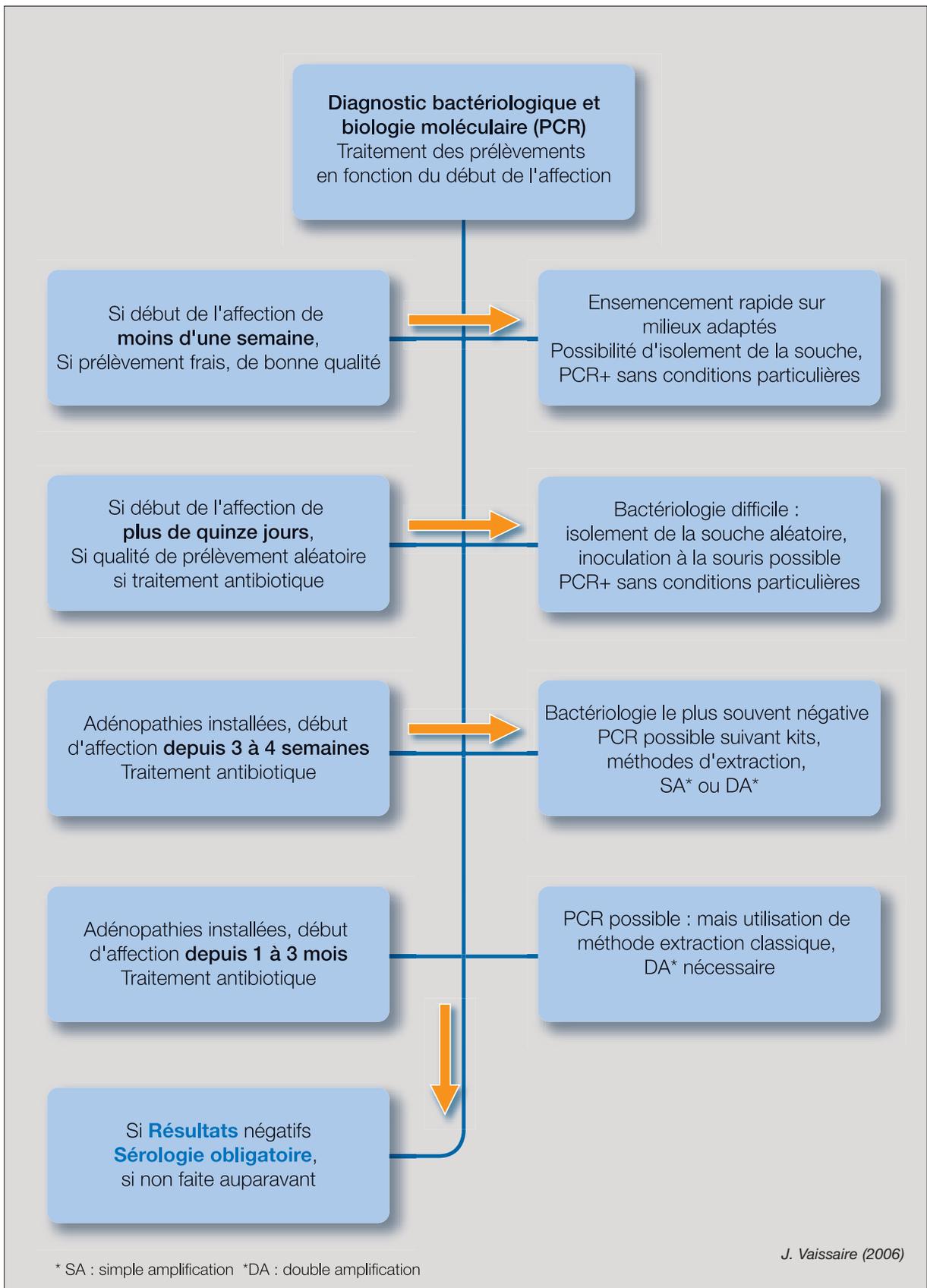


Figure 17 : Arbre décisionnel pour la mise en évidence de l'affection en fonction de l'ancienneté des premiers symptômes

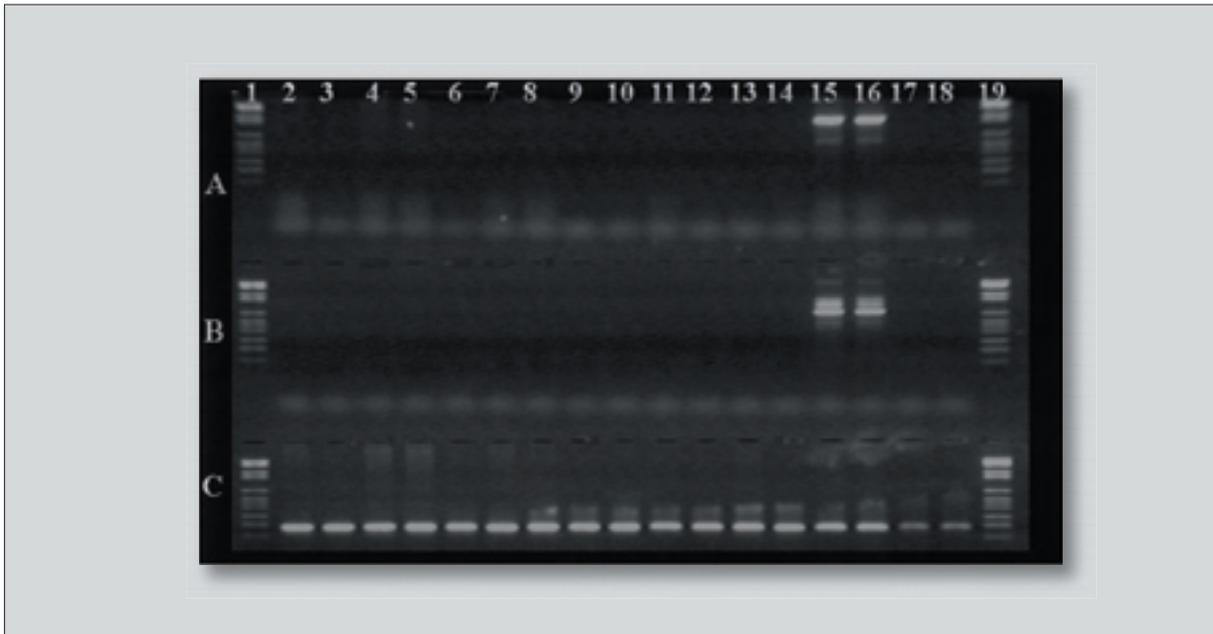


photo : S. Peruchon (AFSSA.Lerpaz)

Figure 18 : PCR : spécificité des amorces pour l'ARNr 16S.

Enfin les techniques de PCR en temps réel ont été plus récemment proposées et seront très utilisées dans un avenir proche (cf références citées).

Parmi les autres techniques proposées (immunofluorescence, immunohistochimie, immunochromatographie et Elisa), elles restent propres à certains domaines (laboratoires

Tableau 1 : Marqueurs chromosomiques permettant la discrimination des genres, espèces et sous-espèces de *Francisella* par PCR.

Marqueur	<i>F. tularensis</i> sous-espèce				<i>novicida</i>	<i>F. philomiragia</i>	
	<i>tularensis</i>	<i>mediasiatica</i>	<i>holarctica</i>	<i>holarctica (Japonica)</i>			
<i>ISF</i>	+	+	+	+	+	+	(THOMAS J. Clin. Microbiol. 2003)
23kDa	+	+	+	+	+	+/-	(GOLOVLIIOV Infect. Imm. 1997)
<i>tul4</i> (17kDa)	+	+	+	+	+	-	(SJOSTEDT Misrob. Tattog. 1992)
<i>fopA</i>	+	+	+	+	+	-	(FULOP Am. J. Trop. Med. Hyg.1996)
<i>RD1</i> (pb)	1523	1453	924	1135	3322	-	(BROEKHUIJSEN J. Clin. Microbiol. 2003)

* pb. taille de l'amplicon exprimé en paire de bases (pb)

(D'après F. Thibault CRSSA. Communication personnelle 2005)

vétérinaires, laboratoires spécialisés). Nous ne ferons que les citer rapidement :

Immunofluorescence et immunohistochimie : *F. tularensis* peut être mise en évidence

par un examen direct au microscope à fluorescence des prélèvements de biopsies, sécrétions, exsudats, de coupes d'organes fixés dans le formol et inclus dans la paraffine en utilisant une technique directe ou indirecte avec des anticorps fluorescents marqués.

Cette méthode est très utilisée dans certains pays du Nord de l'Europe et permet de faire des diagnostics rapides lors d'enquêtes épidémiologiques.

Immunochromatographie et technique Elisa : *F. tularensis* peut être détectée dans des tissus infectés par des méthodes immunologiques utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les lipopolysaccharides de la bactérie et permettent de différencier *F. tularensis subsp. tularensis* de la sous-espèce *holarctica*.

Typage moléculaire

La similitude génétique des sous-espèces de *F. tularensis* rend le typage difficile (99,8 % d'identité pour les gènes 16SrRNA). Diverses techniques ont été proposées. Toutes les méthodes indiquent une très grande homogénéité génétique sans individualiser des sous-espèces. Elles donnent des résultats concordants et suggèrent que les souches originaires du Japon sont distinctes des autres sous-espèces de *Francisella*. Le développement de méthodes plus discriminantes, comme celle de l'amplification de courtes séquences répétées génomiques (VNTRs Variable-number tandem repeats) déjà été utilisées pour d'autres bactéries (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*) donne d'excellents résultats pour *F. tularensis* et permet de tracer épidémiologiquement une souche.

Aspects thérapeutiques, traitements antibiotiques

La maladie doit être traitée le plus rapidement possible dès lors qu'elle est suspectée, surtout s'il s'agit de forme pulmonaire ou typhoïdique.

Le traitement doit être spécifique et n'obéit pas aux traitements donnés classiquement dans les cas d'affections cutanées ou oro-pharyngées. *F. tularensis* est généralement sensible aux fluoroquinolones, aux aminosides tels gentamicine, voire streptomycine, aux tétracyclines, au chloramphénicol. Les traitements utilisés doivent être très précoces et prolongés jusqu'à disparition de la réaction ganglionnaire. Leur durée est classiquement de 10 à 14 jours au moins mais peut durer jusqu'à trois mois. Les principaux antibiotiques sont: la streptomycine (1 à 2 g/ 24h), la gentamicine (5mg/kg/24h), la doxycycline (200 mg/24h), ou encore le chloramphénicol (50-100mg/kg/24h, sans excéder 4g/jour). La gentamicine ou la streptomycine pourra être utilisée localement après ponction ganglionnaire. Le traitement par mise à plat chirurgicale (ganglionnaire) peut être préconisé pour éviter la fistulisation chronique avec persistance d'une suppuration.

Le choix des antibiotiques préconisés à l'heure actuelle (AFSSAPS-plan Biotox) repose sur l'utilisation en première intention d'une fluoroquinolone systémique pour "le traitement prophylactique post-exposition et celui des personnes symptomatiques pouvant recevoir un traitement per os". Il conviendrait de ne pas ignorer une éventuelle résistance par sélection malveillante lors de visées terroristes.

Pour un adulte, le traitement est en première intention basée sur la ciprofloxacine per os (1 g/jour en deux prises) ou ofloxacine per os (800 mg /jour en deux prises) ou lévofloxacine per os (500mg/jour en une prise).

Pour un enfant de moins de 15 ans, le traitement est basé sur la ciprofloxacine per os (20 à 30 mg/kg/jour en 2 prises sans dépasser la posologie adulte de 1g/jour). Eventuellement de la doxycycline peut être prescrite per os (4mg/kg/jour en 2 prises sans dépasser la posologie adulte de 200mg/jour). La durée du traitement est de 14 jours.

Un traitement est proposé pour "les personnes symptomatiques devant recevoir un traitement parentéral" qui est basé sur des perfusions de ces mêmes antibiotiques toutes les 12 heures avec un relais par voie orale suivant l'état du patient et d'une durée de 14 jours.

Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire depuis 2002 ainsi que d'une maladie professionnelle.

[Voir fiche de déclaration ci-contre](#)

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste
Nom :	Nom du clinicien :
Hôpital/service	Hôpital/service
Adresse	Adresse
Téléphone	Téléphone
Télocopie	Télocopie
Signature	



Important : cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie, ...) au médecin inspecteur de la DDASS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.

Initiale du nom : Prénom : _____ Sexe : M F Date de naissance (jj/mm/aaaa) : _____
 Code d'anonymat : _____ (A établir par la DDASS) Date de la notification : _____

Code d'anonymat : _____ (A établir par la DDASS) Date de la notification : _____
 Sexe : M F Année de naissance : _____ Code postal de résidence : _____

Dates de début des symptômes : _____
Forme clinique
 Oropharyngée Oculoganglionnaire Pleuropulmonaire Typhoïdique ou septicémique
 Ulcéranglionnaire Ganglionnaire Pour les deux dernières formes, précisez la localisation : _____
 Evolution En cours Favorable Décès Complications, précisez : _____
 Hospitalisation : oui non Inconnu

Confirmation du diagnostic
 Isolement de *F. tularensis* oui non Non effectué
 Site de prélèvement : _____
 Date du prélèvement positif : _____
 La souche a-t-elle été envoyée au CNR ? oui non

Sérologie
 1^{er} prélèvement 2^{ème} prélèvement
 Méthode : _____ Méthode : _____
 Date _____ Date _____
 Titre : _____ Titre : _____
 En cours Non effectué En cours Non effectué

Tularémie
Critères de notification : Tableau clinique évocateur de tularémie associé à : ◆ Cas confirmé 1. sérologie positive avec un titre supérieur ou égal à 50 ou 2. isolement de <i>F. tularensis</i> à partir de prélèvements cliniques ou 3. amplification génique positive ◆ Cas probable 1. sérologie avec un titre compris entre 20 et 50 ou 2. exposition commune à celle d'un cas confirmé

PCB Site de prélèvements : _____ Date _____ Résultat : _____
 Western Blot Site de prélèvements : _____ Date _____ Résultat : _____

Expositions à risque (dans les 2 semaines précédant les premiers signes de tularémie)
 Profession : _____ (profession des parents si enfant)
 Contact direct avec des animaux (vivants ou morts) ou des produits animaux (manipulation, préparation, ingestion) :
 - Lièvres : Oui Non Inconnu
 - Rongeurs : Oui Non Inconnu Précisez l'espèce : _____
 - Autres : Oui Non Inconnu Si oui, précisez : _____
 Contact direct avec l'eau d'un cours d'eau (ruisseau, rivière, lac ...), d'un réservoir ou d'un puits : Oui Non Inconnu
 Si oui, précisez le nom du cours d'eau ou la localisation du cours d'eau, du réservoir ou du puits : _____
 Contact avec de la terre (jardinage, remblayage...) : Oui Non Inconnu
 Morsures de tiques Oui Non Inconnu
 Piqûres de moustiques ou de taons nombreuses : Oui Non Inconnu
 Loisirs de plein air (promenade, trek, ...) : Oui Non Inconnu
 Voyage à l'étranger dans le mois précédant le début des signes : Oui Non si oui, précisez le pays : _____
 Cas dans l'entourage Oui * Non Inconnu Combien ? _____
 * remplir une fiche pour tous les cas confirmés ou probables

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste	DDASS : signature et tampon
Nom :	Nom du clinicien :	
Hôpital/service	Hôpital/service	
Adresse	Adresse	
Téléphone	Téléphone	
Signature		

Maladie à déclaration obligatoire (Art L 3113-1, R11-1, R11-2, R11-4, D11-7 du Code de la santé publique)
 Information individuelle des personnes - Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisation des informations à l'Institut de veille sanitaire

Tularémie et guerre biologique

Il est évident que compte tenu de sa pathogénicité, des affections graves, de leur durée et de l'état d'asthénie qu'elle entraîne pendant des semaines, *F. tularensis* est une bactérie qui a été étudiée comme agent incapacitant dans le cadre de guerre bactériologique et qui peut être utilisée lors d'actes de terrorisme ou de malveillance. Peu de bactéries sont nécessaires par voie aérienne ou cutanée pour provoquer la maladie et des cas groupés, d'ailleurs observés naturellement sont là pour conforter cette possibilité. D'autre part, des relais naturels pourraient accroître l'effet de tels actes avec la présence d'animaux vecteurs sensibles ou porteurs sains de mœurs aquatiques ou terrestres ainsi que d'arthropodes piqueurs contaminés. Des études concernant de telles utilisations ont été déjà entreprises par divers pays : Japon, Etats-Unis, Union Soviétique, Pays de l'Est. Des cas suspects se sont développés lors de conflits, et l'origine des contaminations n'a jamais été clairement élucidée entre actes de malveillance et pullulation de rongeurs ou des vecteurs, associée à un manque d'hygiène et des contrôles des ressources en eau défectueux ou inexistantes. Un rapport de l'OMS estime que 50 kg de *F. tularensis subsp tularensis*, la plus pathogène, répandus sur une agglomération de 5 millions d'habitants, pourraient entraîner 250 000 cas de maladie avec développement de formes très graves, pulmonaires ou typhoïdiques et environ 20 000 décès. Le coût estimé par le CDC serait de 5,4 milliards de dollars pour 100 000 personnes exposées. Ces estimations justifient que la maladie soit, depuis 2002, à nouveau à déclaration obligatoire (MDO) et pour l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), les scénarii pouvant faire évoquer une utilisation malveillante de *F. tularensis* en France sont les suivants :

- survenue brutale d'un syndrome grippal chez un grand nombre de personnes avec des symptômes de pleuropneumonie ou septicémie dans une proportion importante ;
- des cas de tularémie sur une zone géographique limitée hors du contexte épidémiologique habituel ;
- des cas de tularémie touchant des personnes de tous âges, des deux sexes, et auparavant en bonne santé ;
- des cas de tularémie sans exposition zoonotique ou rurale à risque rapportée ;
- suspicion ou confirmation d'infection à *F. tularensis subsp tularensis*, la sous-espèce la plus virulente et absente du territoire français.

Aspects prophylactiques

Prophylaxie médicale

Chez l'homme, les premières vaccinations utilisant un vaccin vivant atténué datent des années 30. Par la suite, des vaccins tués ont été proposés, mais peu efficaces. La vaccination reste ciblée à des professionnels exposés, mais aucun vaccin n'est disponible actuellement en France. Aussi la prescription rapide d'un antibiotique à titre préventif est impérative lors d'exposition à une source de contamination, surtout par aérosolisation.

Autres mesures prophylactiques

F. tularensis est sensible à la plupart des antiseptiques et désinfectants habituellement utilisés : alcool à 70°, teinture d'iode, eau de Javel. Elle est aussi sensible à la chaleur, étant détruite après 10 minutes à 56°C. Elle disparaît au bout de quelques jours (4 à 6 jours) à partir de 4°C et au-delà. Par contre, elle peut survivre plusieurs mois dans l'eau, de la paille, des grains à une température proche de 0°C, ainsi que dans les cadavres d'animaux maintenus en dessous de 0°C. Chez les tiques, sa conservation peut-être indéfinie avec transmission transovarienne à la descendance et persistance d'un stade au suivant. Les autres mesures conseillées sont donc d'ordre général : la désinfection, la décontamination, la lutte contre les vecteurs, la modification de l'environnement par des mesures appropriées ou des travaux, l'information et l'éducation sanitaire des personnes. Elles peuvent être d'ordre plus particulier : le port de vêtements longs qui protègent dans les secteurs à risque (forêts, proximité de cours d'eau, eaux stagnantes), d'éviter de boire de l'eau de ruisseau dans les aires d'endémie, l'emploi d'insecticides, le port de gants lors du ramassage du gibier, la cuisson correcte et suffisamment longue de la viande d'animaux sauvages.

Il est conseillé :

- le port de protection (masque, vêtements longs) lors de tonte d'herbe dans les zones à risques ;
- d'éviter toute promiscuité importante avec des carnivores domestiques chassant des rongeurs ou des lagomorphes en milieu rural ou semi-urbain ;
- de prendre des précautions lors des manipulations de lièvres, renards, sangliers et petits mammifères de la faune sauvage.

Enfin, les précautions classiques qui obéissent à des procédures strictes dans l'autopsie des cadavres animaux, surtout les prélèvements et la manipulation de cette bactérie en zone isolée, si possible de type P3.

Pour un bactériologiste médical, outre les règles de bonne pratique strictement appliquées, une protection particulière du technicien/ne (surblouse, port de gants, de masque et de lunettes) sera mise en œuvre pour toute suspicion.

Conclusion

La tularémie est une affection endémique dans certaines régions de France, avec des cas humains et animaux, en général, sporadiques. Cette pathologie extrêmement variée dans ses tableaux cliniques ressemble pour certains symptômes à d'autres affections. Elle doit cependant être bien présente dans les diagnostics différentiels que les cliniciens auront à évoquer en présence d'un syndrome fébrile avec fièvre ondulante accompagné d'une asthénie importante. Cette maladie doit faire l'objet d'une recherche systématique, lors de l'apparition de formes ulcéro-ganglionnaires, suite à des activités extérieures. Lorsqu'un syndrome pseudogrippal apparaît ponctuellement chez un individu ou un groupe d'individus après des activités extérieures, après éventuellement des contacts directs ou indirects avec des animaux divers, même de compagnie, il faut penser à la tularémie. Cette orientation diagnostique devra se renforcer encore si la saison n'est pas propice aux pathologies pulmonaires d'origine virale. Les localisations constatées pourront encore mieux orienter une suspicion et un diagnostic si le praticien est aidé par une anamnèse bien conduite. La maladie est vraisemblablement sous-diagnostiquée.

Il est évident que compte tenu de sa pathogénicité, des affections graves, de leur durée et de l'état d'asthénie qu'elle entraîne pendant des semaines, *F. tularensis* est une bactérie qui peut être utilisée lors d'actes de malveillance et de bioterrorisme.

"I know of no other infection of animals communicable to men that can be acquired from source so numerous and so diverse.

In short one can but feel that the status of tularaemia both as a disease in nature and of man, is one of potentiality"

RR Parker

Revue générale

- Bossi, P., D. Garin, A. Guihot, F. Gay, J. M. Crance, T. Debord, B. Autran B, 2006. Bioterrorism: management of major biological agents. *Cell Mol Life Sci.* 63 : 2196-212.
- Eliasson H, Broman T, Forsman M, Back E. Tularemia: current epidemiology and disease management. 2006. *Infect Dis Clin North Am.* 20 : 289-311;
- Ellis, J, P. C. Oyston, M. Green, and R.W. Titball. 2002. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* 15 : 631-46.
- McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. 2006. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 60 : 167-85.
- Vaissaire, J. 2005. La Tularémie. 235-245. In : Th. De Revel. Menace terroriste : approche médicale. Ed. John Libbey Eurotext.
- Vaissaire, J., C. Mendy, C. Le Doujet et A. Le Coustumier. 2005. La tularémie. La maladie et son épidémiologie en France. *Méd. Mal. Inf.* 35 : 273-280.
- Vaissaire, J., C. Mendy, C. Le Doujet, N. Madani, A. Le Coustumier, M.E. Terrier et J.R. Gaillet. 2006. La tularémie : situation en France, problématiques et risques en santé publique. *Bull. Acad. Vét. France.* 159 : 155-162.

Principales références citées

- Barataud, D., V. Siret, M.A. Prat, S. Ansart, A. Le Coustumier, J. Vaissaire, F. Raffi, M. Garré, V. Vaillant, G. Adonias et I. Capek. 2006. Cas groupés de tularémie, Vendée, août 2004. BEH 17 : 117-9.
- Barns, SM, C.C Grow CC, R.T. Okinaka, P. Keim, and C.R. Kuske. 2005. Detection of diverse new Francisella-like bacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol. 71:5494-500.
- Bystrom, M, S.Bocher, A. Magnusson, J. Prag, and A. Johansson. 2005. Tularemia in Denmark: identification of a *Francisella tularensis subsp.holarctica* strain by real-time PCR and high-resolution typing by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol. 43 : 5355-8.
- Dennis, D.T, T.V. Inglesby, D.A. Henderson, J. G. Bartlett, M.S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, A.M. Friedlander, J. Hauer, M. Layton, S.R. Lillibridge, J.E. McDade, M.T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T.M. Perl , P.K. Russell, K. and Tonat; Working Group on Civilian Biodefense. 2001. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 287 : 452-3.
- EuzebyJP. Francisella. Inc : Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire www.bacterio.cict.fr/bacdico/.
- Forsman, M, G. Sandstrom, and A. Sjostedt. 1994. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of Francisella strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. Int J Syst Bacteriol. 44 : 38-46.
- de la Puente-Redondo, V.A., N.G. del Blanco, C.B. Gutierrez-Martin, F.J. Garcia-Pena, and E.F. Rodriguez, Ferri. 2000. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J Clin Microbiol. 38 : 1016-22.
- Farlow, J., K.L. Smith, J. Wong, M. Abrams, M. Lytle, and Keim P. 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol. 39 : 3186-92.
- Friis-Moller, A, L.E.Lemming, N.H. Valerius, and B. Bruun. 2004. Problems in identification of *Francisella philomiragia* associated with fatal bacteremia in a patient with chronic granulomatous disease. J Clin Microbiol. 42 : 1840-2.
- Fujita O, M. Tatsumi, K. Tanabayashi, and A. Yamada. 2006. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis. 59 : 46-51.
- Garcia Del Blanco, N, M.E.Dobson, A.I.Vela, V.A. De La Puente, C.B. Gutierrez, T.L. Hadfield, P. Kuhnert, J. Frey, L. Dominguez, and E. F. Rodriguez. 2002. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 40 : 2964-72.
- Grunow, R, W. Splettstoesser, S. McDonald, C. Otterbein, T. O'Brien, C. Morgan, J. Aldrich, E. Hofer, E. J. Finke , and H. Meyer. 2000. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. Clin Diagn Lab Immunol. 7 : 86-90.

- Johansson, A, J. Farlow, P. Larsson, M. Dukerich, E. Chambers, M. Bystrom, J. Fox, M. Chu, M. Forsman, A. Sjostedt, and P. Keim. 2004. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J Bacteriol. 186 : 5808-18.
- Johansson, A, M. Forsman, and A. Sjostedt. 2004. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. APMIS. 112 : 898-907.
- Maurin, M., N. F. Mersali, and D. Raoult. 2000. Bactericidal activities of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. Antimicrob Agents Chemother. 44 : 3428-31.
- Montejo, M, J. Perez-Irezabal, P. Gonzalez de Zarate, K. Aguirrebengoa, J.M. Vicente, E. Martinez, S. Ibarra, Bereciartua E, and C. Castell. 1998. [Tularemia: report of 16 cases in the Castilla-Leon community]. Rev Clin Esp. 198 : 794-8.
- Peruchon, S., S. Henault, C. Mendy, J. Vaissaire. 2006. Diagnostic de la tularémie par amplification génique in vitro (PCR). Bull. Acad. Vét. France. 159 : 167-70.
- Svensson, K, P. Larsson, D. Johansson, M. Bystrom, M. Forsman, and A. Johansson. 2005. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. J Bacteriol. 187 : 3903-8.
- Thomas R, Johansson A, Neeson B, et al. Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 50-7.
- Vaissaire J, Le Doujet C, Dufrene M. Antibiotypie des souches de *Francisella tularensis*. Bull. Acad. Vét. de France 1997 ; 70 : 287-94.
- Versage, J.L, D.D. Severin, M.C. Chu, and J.M. Petersen. 2003. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol. 41 : 5492-9.

Adresses internet

- <http://www.agmed.sante.gouv.fr/> (taper tularémie à gauche à recherche)
- <http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/biotox/>
- http://www.invs.sante.fr/publications/guides_biotox/index.html
- http://veille-srv.inist.fr/~Synthese_Bioterrorisme/Dossier/dossier.html
- <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ff/francisella.html>
- <http://www.microbes-edu.org/professionnel/prof.html>
- <http://www.bt.cdc.gov/agent/tularemia/>
- <http://www.emea.eu.int/>
- [http:// www.ifrance.com/maladies-a-tiques/](http://www.ifrance.com/maladies-a-tiques/)



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES FRANCISELLA
Département des Agents Infectieux
Laboratoire de Bactériologie - CHU de Grenoble

Dans le cadre de notre activité de CNR, nous assurons gracieusement :

- l'isolement de souches de *Francisella* à partir de prélèvements humains
- l'identification et le typage des souches de *Francisella*
- le diagnostic sérologique de la tularémie
- le diagnostic moléculaire (PCR) de la tularémie

L'envoi de souches de *Francisella* au CNR doit être réalisé dans le cadre de la réglementation spécifique prévue pour les pathogènes hautement contagieux. Vous trouverez les recommandations adéquates dans le document « Procédure d'envoi de souches de *Francisella* au CNR ». Les souches sont à expédier dans les conditions précisées dans ce document à l'adresse suivante :

CNR des *Francisella*
Laboratoire de Bactériologie, CHU de Grenoble,
BP217, 38043 Grenoble, cedex
Tel. 04 76 76 54 79 - Fax. 04 76 76 59 12

Pour toute demande d'information, merci de contacter les personnes suivantes :

- Pr. Max Maurin mmaurin@chu-grenoble.fr
- Dr. Isabelle Pelloux ipelloux@chu-grenoble.fr

Pr. M. Maurin
Responsable du CNR des *Francisella*



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES FRANCISELLA

Procédure d'envoi de souches de *Francisella* au CNR

Dispositions concernant l'application de l'arrêté ministériel du 15 janvier 2004 :

- L'expéditeur demande auprès de l'AFSSAPS (par fax ou mail) deux documents :
 1. Autorisation permanente d'acquisition et mise en œuvre (document obtenu lors de la première demande puis conservé pour les demandes ultérieures)
 2. Autorisation de cession et transport (valable 1 mois et pour une seule fois)

- L'AFSSAPS envoie par courrier au demandeur les deux documents :

Le document "d'Autorisation de cession et de transport" comprend deux feuillets, le premier à conserver par l'expéditeur et le second à remettre au transporteur.

- Transport de la souche :

L'exemplaire du document "d'Autorisation de cession et de transport" est remis par le transporteur au Laboratoire de bactériologie du CHU de Grenoble en même temps que le colis contenant la souche. Le Laboratoire du CHU de Grenoble en fait une copie pour archive et retourne l'original du document à l'AFSSAPS.

Autres exigences réglementaires (transport des matières dangereuses) :

- triple emballage normalisé
- transporteur agréé
- lettre de transport

Notre numéro Afsaps de détention permanente de souches de *Francisella* est :

F-2269CHU12006-6

Pour connaître les dispositions prévues par la réglementation sur le transport des matières dangereuses et obtenir la liste des transporteurs agréés vous pouvez consulter le site :

<http://www.pasteur.fr/sante/clrc/chap/envois/accueil.html>

Contact à l'AFSSAPS

M. Dominique MASSET,
Mme Stéphanie BELARD,
AFSSAPS, DEMEB,
Unité de Veille Toxicologique
143/147 Bd Anatole-France,
93285 Saint-Denis Cedex
Tel. 01 55 87 35 84, Fax. 01 55 87 35 82
dominique.masset@afssaps.sante.fr
stephanie.belard@afssaps.sant.fr

Contact au CNR *Francisella*

Pr. Max MAURIN
Dr. Isabelle PELLOUX
CNR des *Francisella*,
Laboratoire de Bactériologie, CHU de Grenoble,
38043 Grenoble cedex
Tel. 04 76 76 54 79, Fax. 04 76 76 59 12
mmaurin@chu-grenoble.fr
ipelloux@chu-grenoble.fr

Direction de l'Évaluation
des Médicaments et des Produits Biologiques
Unité Veille Toxicologique

Demande d'Autorisation de cession et de transport

Arrêté du 22 septembre 2001 relatif à la mise en œuvre, l'importation, l'exportation, la détention, la cession à titre gratuit ou onéreux, l'acquisition et le transport de certains agents responsables de maladies infectieuses, micro-organismes pathogènes et toxines.

Cession par (titulaire de l'autorisation) :

Nom de la personne physique autorisée, titre :

NOM de la société :

Adresse de la société :

Numéro de l'autorisation de détention :

Acquéreur :

Dr Max MAURIN

CNR Francisella,

Laboratoire de bactériologie, CHU de Grenoble

BP 217, 38043 Grenoble, cedex

Numéro de l'autorisation d'acquisition : ***

Dénomination du produit :

- Souches suspectes d'être du genre *Francisella*

Nature du support :

Quantité (Nb d'unités):

Utilisation prévue : Identification de la souche par le CNR

Transporteur :

NOM de la société :

Adresse de la société :

Mode de transport :

Cette demande ouvre le droit à une autorisation valable pour une seule opération dans un délai de un mois.

Formulaire à retourner à l'Afssaps par fax au 01 55 87 35 82 ou faire la demande de ce formulaire par email à l'adresse suivante : stephanie.belard@afssaps.sante.fr ou dominique.masset@afssaps.sante.fr

***Bartonella* et Bartonelloses**

G. Arlet

CHAPITRE II

Introduction

Les *Bartonella*, dénommées en l'honneur de Barton Alberto Leopoldo, microbiologiste argentin travaillant au Pérou, constituent un groupe bactérien en plein développement (plus de 20 espèces) grâce aux approches moléculaires dont le séquençage. Ce genre a subi un profond remaniement taxonomique, ainsi certaines d'entre elles étaient connues depuis de nombreuses décennies sous d'autres noms comme "*Rickettsia*", "*Rochalimea*" ou encore "*Grahamella*".....

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=773>

Ces bactéries ont, pour réservoir, diverses espèces animales, souvent porteurs asymptomatiques. Leur importance en clinique humaine est très variable selon l'espèce et en France, deux espèces sont principalement incriminées : *B. henselae* et *B. quintana*.

Actuellement, ce genre comprend au moins une vingtaine espèces ([tableau 1, figure 1](#)) dont 7 seulement sont reconnues actuellement comme pathogènes pour l'homme ([tableau 1](#)).

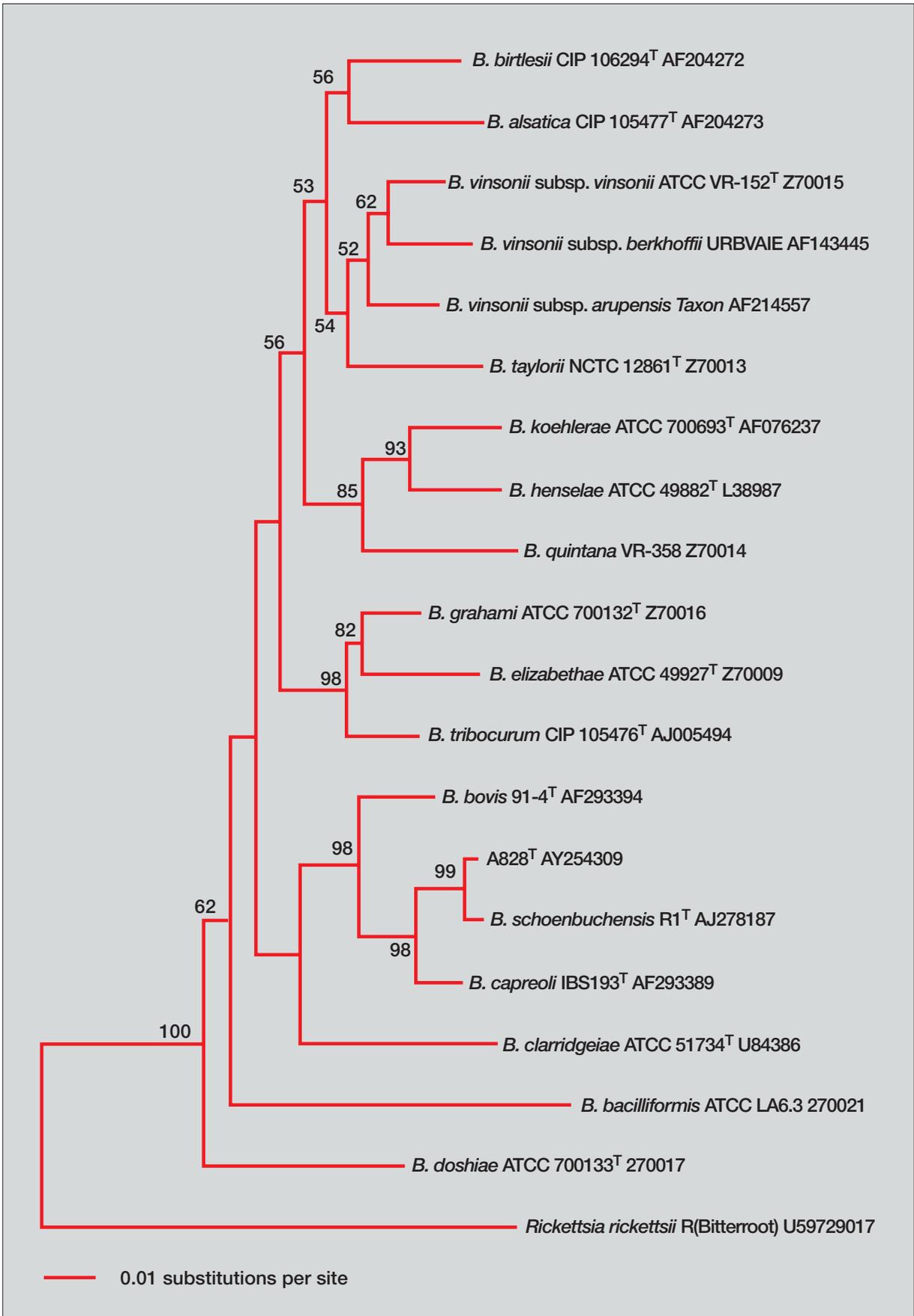


Figure 1 : Phylogénie des Bartonelles basée sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S méthode de "Neighbor-Joining" après analyse sur BIBI. (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr>)

Tableau 1 : Pouvoir pathogène et épidémiologie des différentes espèces de *Bartonella*

<i>Espèce</i>	<i>Pouvoir pathogène chez l'homme</i>	<i>Réservoir animal</i>	<i>Pouvoir pathogène chez l'animal</i>	<i>Vecteur de transmission</i>	<i>Année</i>
<i>B. bacilliformis</i>	fièvre de Oroya verruca peruana	?		phlébotome	1968
<i>B. quintana</i>	fièvre des tranchées angiomatose bacillaire, pélioïse, endocardite, adénopathie chronique	non		pou du corps	1961
<i>B. henselae</i>	maladie des griffes du chat angiomatose bacillaire, pélioïse, endocardite	chat	bactériémie asymptomatique	puces	1992
<i>B. elizabethae</i>	endocardite, neurorétinite	rat			1993
<i>B. clarridgeiae</i>	maladie des griffes du chat	chat	bactériémie asymptomatique endocardite chez le chien		1996
<i>B. vinsonii ssp. vinsonii</i>		campagnol			1946
<i>B. vinsonii ssp. berkhoffii</i>	endocardite	coyote	endocardite chez le chien		1996
<i>B. vinsonii ssp. arupensis</i>	endocardite		rongeurs		1999
<i>B. koehlerae</i>	endocardite	chat			1999
<i>B. alsatica</i>	endocardite	lapins			1999

Tableau 1 (suite) : Pouvoir pathogène et épidémiologie des différentes espèces de *Bartonella*

<i>Espèce</i>	<i>Pouvoir pathogène chez l'homme</i>	<i>Réservoir animal</i>	<i>Pouvoir pathogène chez l'animal</i>	<i>Vecteur de transmission</i>	<i>Année</i>
<i>B. tribocorum</i>	non	rongeurs			1998
<i>B. doshiae</i>	non	rongeurs			1995
<i>B. grahamii</i>	neurorétinite & occlusion de l'artère rétinienne	rongeurs			1995
<i>B. birtlesii</i>	non	rongeurs			2000
<i>B. taylorii</i>	non	rongeurs			1995
<i>B. schoenbuchensis</i>		daims			2001
<i>B. rattimassiliensis</i>		rat			2004
<i>B. phoceensis</i>		rat			2004
<i>B. talpae</i>		rongeurs, taupes			1995
<i>B. peromysci</i>		rongeurs			1995
<i>B. chomelii</i>		bovins			2004
<i>B. capreoli</i>		mouton			2002
<i>B. bovis</i>		bovins			2002
<i>B. washoensis</i>	endocardite	rongeurs	endocardite chez le chien		1995

➔ *B. bacilliformis* est responsable de la maladie de Carrion, transmise par un phlébotome (*Lutzomyia verrucarum*) et qui sévit de manière endémique dans les Andes péruviennes (Huarcaya) entre 500 et 3000 mètres d'altitude. Cette maladie regroupe deux entités cliniques, la verruga peruana et la fièvre de Oroya. La verruga peruana, se présente comme une papule ou un nodule angiomateux cutané. Elle est connue depuis très longtemps, car des lésions de ce type ont été observées sur des statuettes datant de l'ère précolombienne. La fièvre de Oroya se présentant comme une anémie hémolytique fébrile est connue depuis la fin du 19^{ème} siècle, période à laquelle de très nombreux ouvriers venant de la plaine côtière pour construire une ligne de chemin de fer dans les Andes de Lima à Oroya, contractèrent la maladie et beaucoup en moururent. La presque totalité des hématies sont parasitées. La mortalité de cette infection variait de 40 à 80 %, elle est plus faible de nos jours, de l'ordre de 20-25 %. L'unicité infectieuse de ces deux pathologies fut prouvée par Daniel A. Carrion, un étudiant en médecine qui, après s'être inoculé un broyat de verruga peruana, développa la fièvre de Oroya et en mourut.

Cette maladie persiste de nos jours et son épidémiologie a évolué, touchant plus volontiers les enfants (Huarcaya) ; on a décrit cette maladie également en Equateur et en Colombie.

➔ En revanche *B. quintana* est connue en France depuis la guerre de 14-18 où sous le nom de *Rickettsia quintana*, elle sévit chez des soldats au front vivant dans les tranchées, provoquant une fièvre récurrente de 5 jours (quintane). Elle est vraisemblablement transmise par les poux du corps. Après un changement de nom (*Rochalimaea*) dans les années 60, elle n'acquit son identité définitive qu'en 1993 (comme *B. henselae*, et *B. elizabethae*) grâce aux approches moléculaires. Actuellement, elle est reconnue, par exemple en France, comme responsable de la fièvre des tranchées (fièvre quintane), de septicémies et d'endocardites au sein d'une population défavorisée (SDF par exemple), présentant un alcoolisme chronique, d'angiomatose bacillaire chez les patients sidéens et d'adénopathie chronique. Le terme de fièvre des tranchées urbaine (urban trench fever) est souvent employé.

➔ *B. henselae*, (anciennement *Rochalimaea henselae*) fut initialement décrite dans les années 90 comme étant responsable d'angiomatose bacillaire et de péliose viscérale (hépatique, splénique, cérébrale et pulmonaire) chez les patients infectés par le VIH. Puis sur des arguments sérologiques et épidémiologiques, son rôle fut ensuite évoqué dans la maladie des griffes du chat (MGC). La mise en évidence de son ADN d'abord dans l'antigène servant au diagnostic (IDR), puis dans des ganglions de patients suspects de MGC, ensuite son isolement du sang de chat et enfin, peu après de ganglions chez d'autres patients ont confirmé son rôle majeur. Celui de *Afipia felis* paraît être, à l'heure actuelle, comme nul. Elle a également été isolée lors de septicémie et d'endocardite chez des sujets, immunodéprimés ou non, le plus souvent en contact fréquent avec des chats.

- D'autres espèces ont été décrites de manière très occasionnelle chez l'homme. *B. clarridgeiae* a été incriminé dans quelques cas de MGC, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. alsatica*, *B. vinsoni* subsp. *berkhoffii* et *B. vinsoni* subsp. *arupensis* dans des endocardites. Globalement, chez l'homme, les bartonelles sont responsables de plus de 25% des endocardites à hémocultures négatives en France, mais loin derrière *Coxiella burnetii* (48%).

Aspects cliniques des infections à *B. henselae*

La maladie des griffes du chat (MGC)

Son diagnostic clinique repose classiquement sur l'association de trois critères sur les quatre suivants (postulat de Koch) : 1/ contact (griffures ou morsures) avec un chat, 2/ adénopathie loco-régionale, 3/ intra-dermo réaction positive et 4/ aspects anatomopathologiques évocateurs. Actuellement, la présence d'anticorps à un titre significatif permet de remplacer le troisième critère. La [figure 2](#) précise les fréquences des localisations ganglionnaires. Selon les séries, les lésions papuleuses de départ sont retrouvées dans un quart à plus de 90 % des cas. Cette variabilité est vraisemblablement due au soin apporté à la recherche de ces lésions et au délai séparant la griffure et la consultation du praticien. Après une incubation de 5 à 50 jours (2 à 3 semaines en général), apparaît une adénopathie souvent volumineuse dans un contexte peu ou non fébrile (température supérieure à 39° C dans 9 % des cas), parfois accompagnée d'un malaise général et de céphalées. L'adénopathie est plus souvent localisée au membre supérieur, voire au niveau du cou, notamment chez les enfants ([figure 3](#)). Une localisation inguinale peut faire évoquer une maladie sexuellement transmise. Cette adénopathie évolue pour son propre compte en plusieurs semaines, voire plusieurs mois, soit vers la régression, soit vers la suppuration et la fistulisation. Une extension aux autres ganglions du même territoire peut s'observer chez certains patients, immunodéprimés, ou diabétiques.

Sur le plan épidémiologique, l'incidence est estimée entre 9 et 10 cas pour 100.000 habitants aux USA, soit 24.000 cas par an avec 10 % d'hospitalisation pour un coût annuel d'environ 12 milliards de dollars. Les enfants sont le plus concernés par cette pathologie, car ils jouent le plus avec les chats. L'interrogatoire de ces enfants ne retrouve pas toujours cette notion de contact avec un chat. En effet, ils ont tendance à cacher ce contact car ils ont peur que l'on fasse du mal à leur animal de compagnie ou à celui des amis. 60% des cas ont lieu entre septembre et janvier.

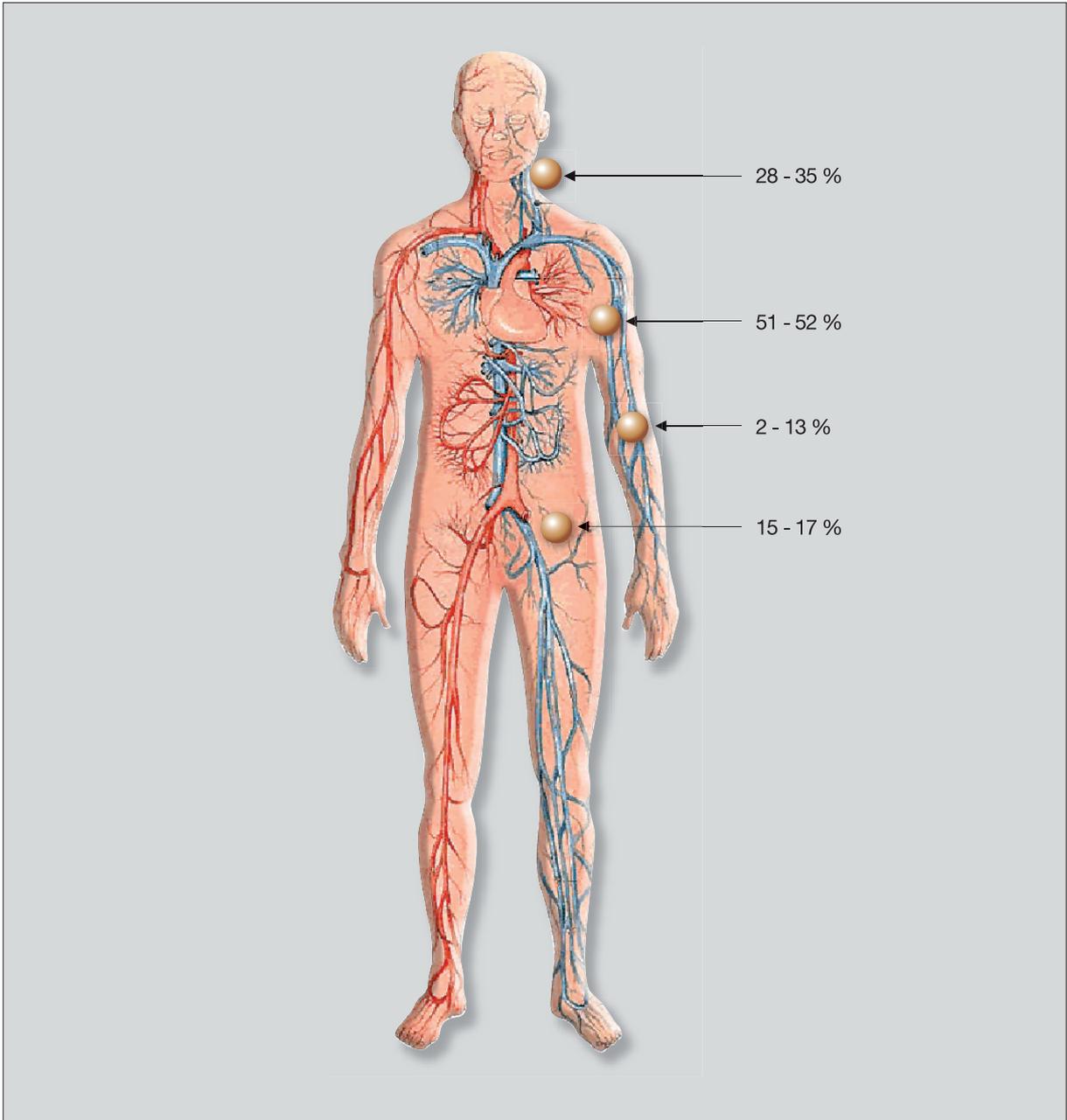


Figure 2 : Localisation des adénopathies dans la maladie des griffes du chat

Formes cliniques inhabituelles de la MGC

- Le syndrome oculo-glandulaire de Parinaud est la forme la plus fréquente de la MGC qui se manifeste par une conjonctivite unilatérale avec une adénopathie pré-auriculaire (figure 3). Les lésions cutané-muqueuses ne sont pratiquement jamais retrouvées. Ce syndrome guérit sans séquelles en plusieurs mois.

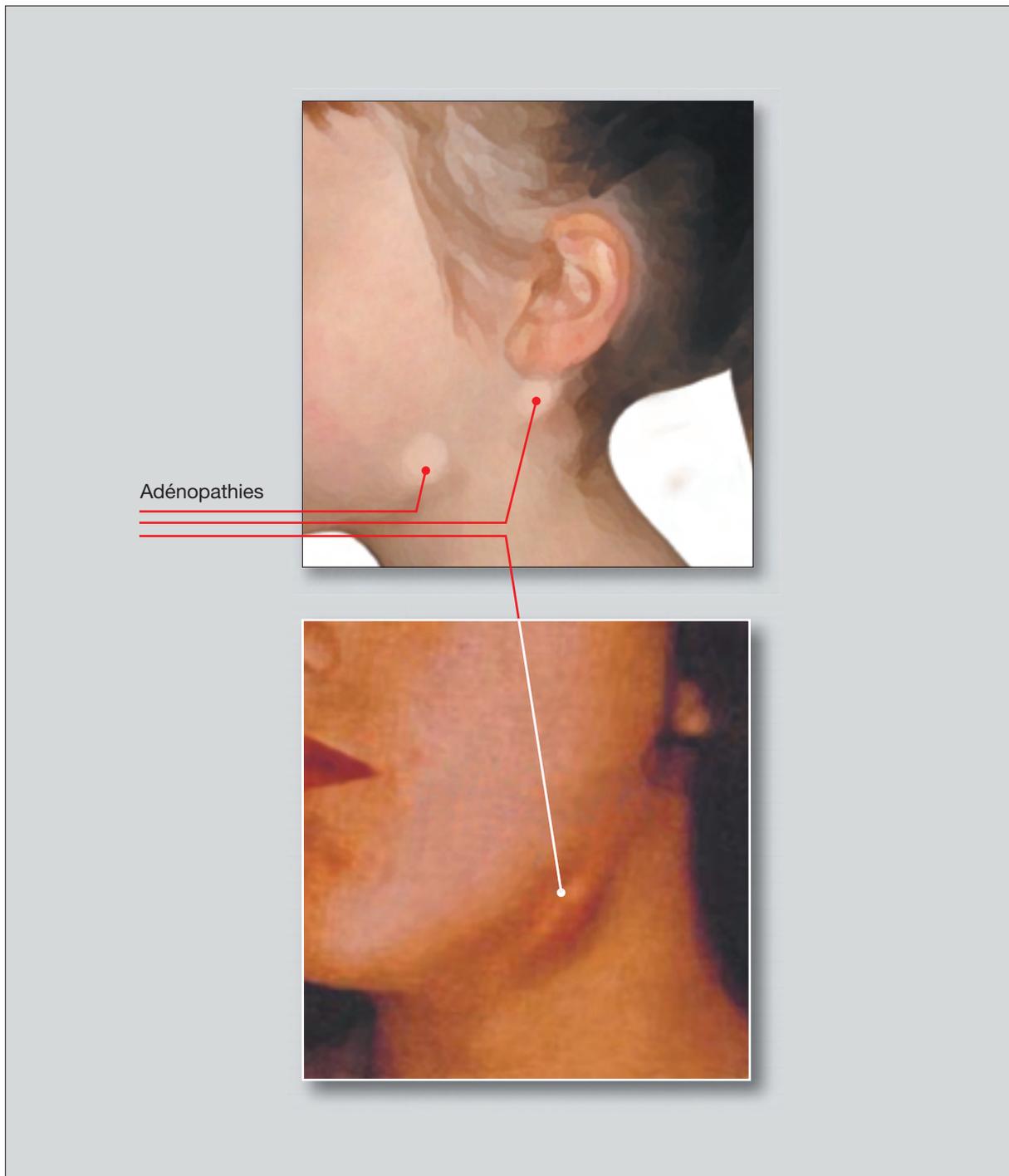


Figure 3 : Exemples d'adénopathies

Les formes neurologiques.

Rapportées autrefois sur des contextes épidémiologiques et sur l'intradermo-réaction, elles sont actuellement documentées sur des arguments sérologiques et touchent plus volontiers les enfants entre 7 et 12 ans. Des encéphalopathies avec fièvre, convulsions et coma, des atteintes des nerfs centraux et périphériques, des méningites ont été décrites. L'évolution est toujours favorable, même si elle dure longtemps (<1 an).

Les formes viscérales

Elles sont également plus fréquentes chez l'enfant. La forme la plus fréquente est une hépatomégalie et/ou splénomégalie fébrile avec de multiples granulomes (figure 4) dans les deux organes. Ces deux dernières formes représentent plus du quart des infections à *B. henselae* nécessitant l'hospitalisation.

Les localisations oculaires sont très variées touchant tous les compartiments de l'œil : uvéite, infection de la vitrée, rétinite, décollement de rétine, occlusion artériolaire.

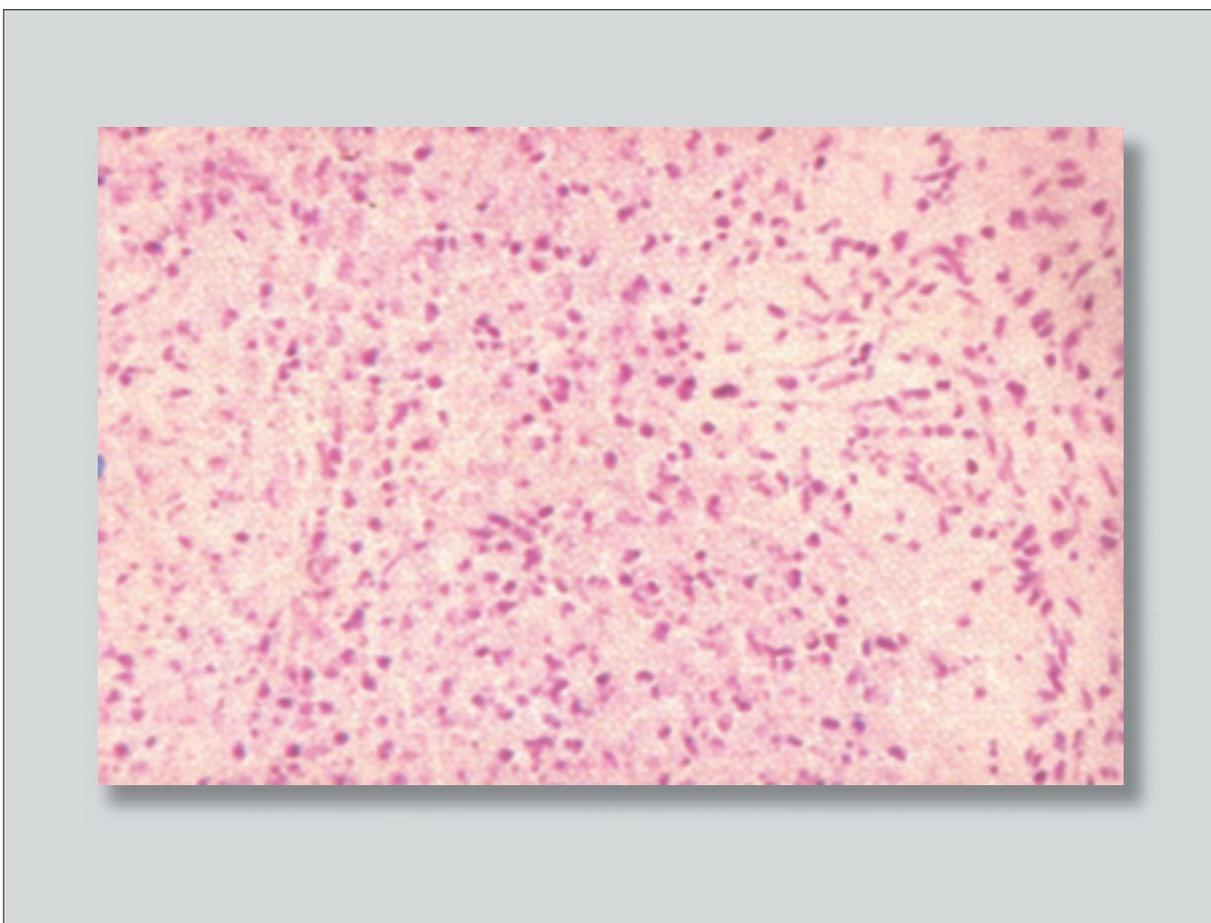


Figure 4 : Granulome hépatique

Les formes observées chez les patients immuno-déprimés.

Ce sont surtout les patients infectés par le VIH qui présentent des infections particulières comme l'angiomatose bacillaire, la péliose hépatique et des fièvres avec bactériémies. Les patients traités par des immunosuppresseurs peuvent également être atteints. Les lésions de l'angiomatose bacillaire se présentent comme des papules de couleur violacée ou de nodules (figures 5 et 6). Unique ou multiples, friables et hémorragiques, elles peuvent faire évoquer d'autres pathologies comme le sarcome de Kaposi ou l'hémangiome épithélioïde. Des lésions à type de lyse osseuse en regard des lésions cutanées sont parfois observées. La péliose hépatique est l'atteinte tissulaire profonde la plus fréquente se présentant comme une fièvre avec nausées (voire des vomissements), une hépatomégalie avec des phosphatases alcalines élevées et d'autres localisations de pélioses parenchymateuses, spléniques, pulmonaires, cérébrales, médullaires ont été également rapportées. Une fièvre persistante avec bactériémie est également une forme clinique de présentation chez le patient immunodéprimé ; dans cette situation, rien ne permet d'évoquer *a priori* le diagnostic d'infection à *B. henselae*.



photo : Dr. Gorin I.

Figure 5 : Angiomatose bacillaire chez un sidéen.

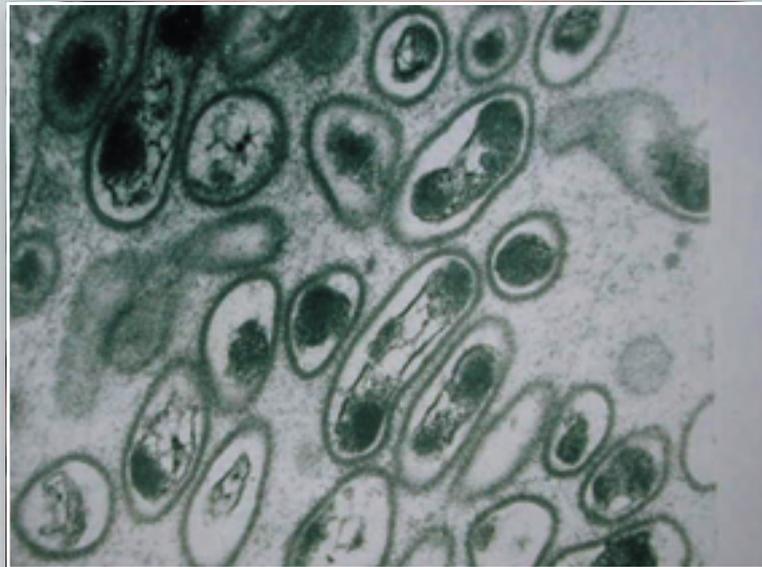


photo : Dr. Gorin I.

Figure 6 : Angiomatose bacillaire : mise en évidence d'éléments bactériens par microscopie électronique

Epidémiologie

Que ce soit dans la MGC ou dans les formes viscérales et disséminées (angiomatose bacillaire, péliose hépatique et splénique), la notion d'un contact avec un chat est fréquemment retrouvée. Les cas de MGC touchent surtout les enfants de moins de 10 ans possédant des chatons de moins d'un an, infestés par des puces et qui ont été griffés ou mordus. La lésion d'inoculation est retrouvée 7 fois sur 10. Dans une étude réalisée en Californie, près de 40% des chats présentent une bactériémie asymptomatique à *B. henselae* avec plus 1000 cfu/ml dans la moitié des cas. C'étaient essentiellement des chats errants, jeunes et porteurs de puces. Dans la région de Nancy, 54% des chats errants testés étaient bactériémiques avec l'isolement d'une nouvelle espèce dans un tiers des cas, *B. clarridgeiae*. Dans les autres pays d'Europe, la prévalence de la bactériémie varie entre 11 et 22 % des chats. Ces différences observées sont le fait du recrutement plus ou moins important en chats errants ou domestiques. Dans une étude portant sur 14 patients ayant fait une MGC, 85 % des

chats appartenant à ces patients étaient bactériémiques et 75 % avaient 2 ans ou moins. Le plus important résultat de ce travail concernait la durée de cette septicémie qui durait plusieurs mois, voire près d'une année dans certains cas. La transmission entre chats est le fait des puces (*Ctenocephalides felis*). De plus, *B. henselae* est capable de survivre et même de se multiplier dans le tube digestif des puces. Une des hypothèses de transmission à l'homme (figure 7) pourrait être la suivante : la puce, après son repas de sang (de 10 µl à 15 µl en moyenne), laisse ses déjections dans le pelage du chat avant de se réfugier dans les poils des tapis ou des moquettes. Le chat, couvert de puces, se gratte et fait sa toilette contaminant ainsi ses griffes et sa bouche avec ces déjections contenant *B. henselae*. L'ADN de *B. henselae* a été mis en évidence dans les déjections de puces recueillies dans les poils d'un chat bactériémique appartenant à un enfant ayant fait une MGC. Ce mode de transmission pourrait expliquer le syndrome oculo-ganglionnaire de Parinaud pour lequel il n'est pas fait mention de griffures, le patient s'inoculant directement la bactérie dans la conjonctive en se frottant l'oeil après avoir caressé son chat. Il est intéressant de rappeler que cette espèce de *Bartonella* a été identifiée chez des chats français décédés il y a plus de 600 ans !

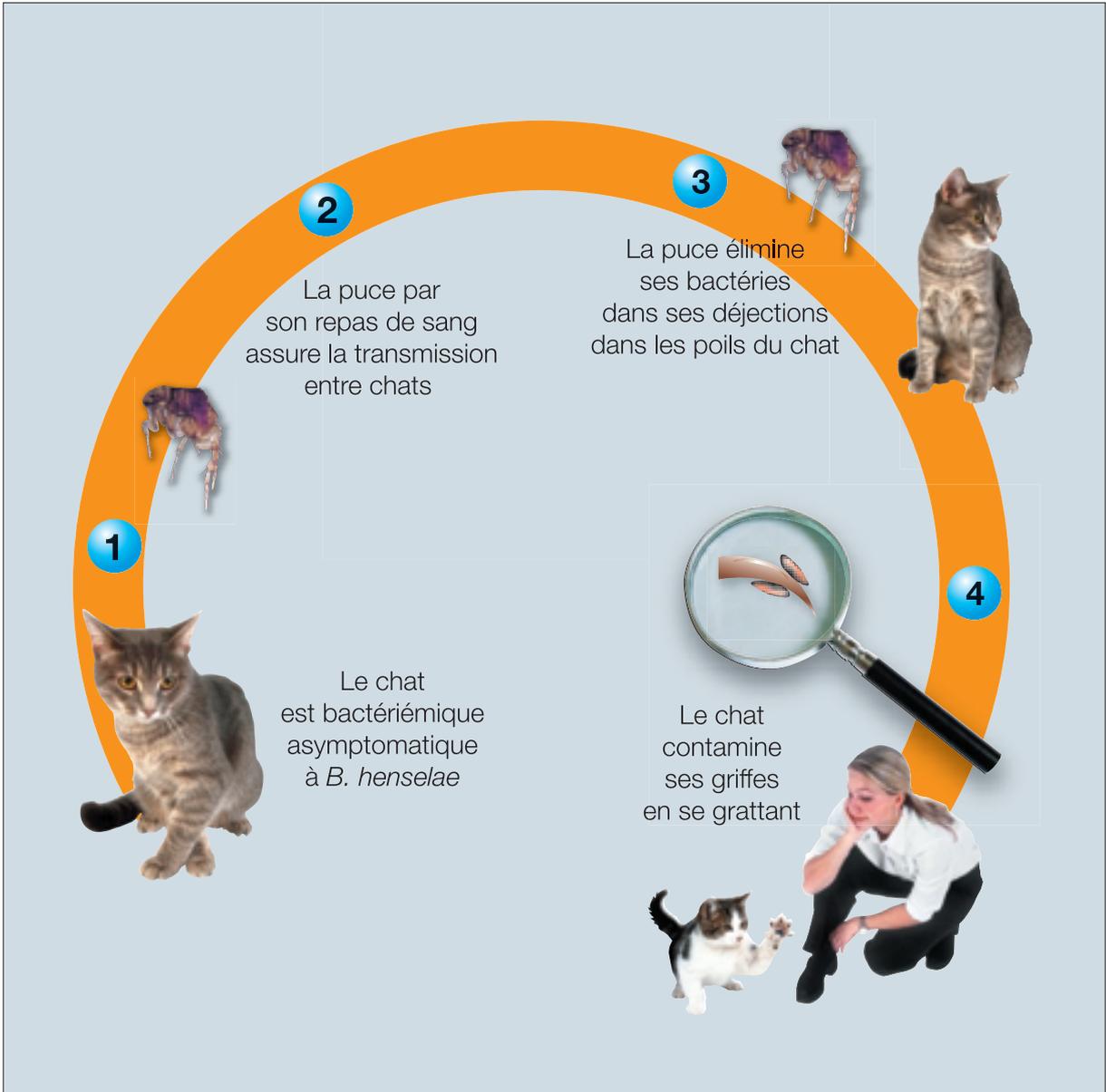


Figure 7 : Cycle naturel de la transmission de la maladie des griffes du chat à l'homme

Aspects cliniques des infections à *B. quintana*

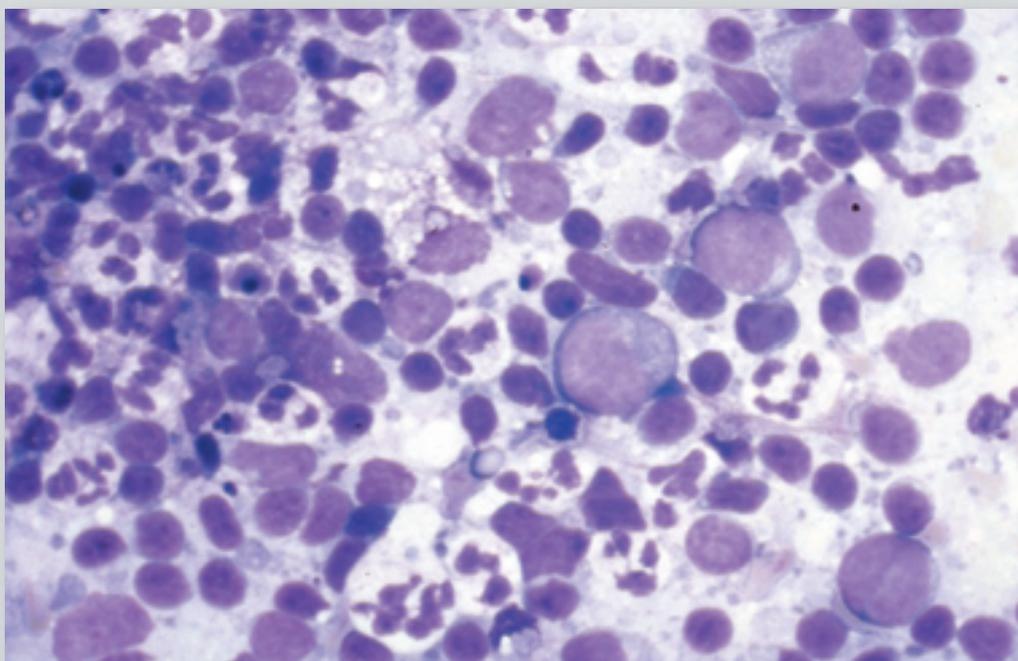
B. quintana au génome "plus léger" par rapport à celui de *B. henselae* est un pathogène strict de l'homme transmis par les poux du corps. La première maladie due à cette bactérie est la fièvre des tranchées décrite en 1915, lors de la première guerre mondiale. Cette bactérie a ré-émergé à l'occasion de l'épidémie de VIH comme agent responsable d'angiomatose bacillaire, et parmi la population SDF aux Etats-Unis et en Europe, provoquant des bactériémies chroniques et des endocardites. Elle a également été isolée d'adénopathies chroniques.

La transmission inter-humaine de la fièvre des tranchées se fait par l'intermédiaire des poux (*Pediculus humanus*) qui hébergent *B. quintana* dans leur tube digestif et l'éliminent dans leurs déjections, l'homme s'infectant en se grattant ou se griffant. Il a été démontré la présence de *B. quintana* dans les poux de SDF et également dans ceux de plusieurs soldats de Napoléon lors de la retraite de la campagne de Russie.

La découverte plus récente de cette espèce chez le chat suggère que l'épidémiologie pourrait être autre que celle acceptée.

Histopathologie et physiopathologie

Dans les ganglions de MGC, trois stades évolutifs sont décrits. Tout débute par une hyperplasie lymphoïde banale sans infiltration de polynucléaires. Des granulomes se forment ensuite, bordés de cellules épithélioïdes avec quelques cellules géantes (figure 8). Ces lésions évoluent vers la formation de grandes zones nécrotiques contenant du matériel acidophile, entourées de cellules réticulaires épithélioïdes organisées en palissade circulaire. L'étude de ces lésions en microscopie électronique a mis en évidence des bactéries adjacentes aux parois des vaisseaux et pouvant entraîner une déformation de la lumière vasculaire. Les lésions de l'angiomatose bacillaire se caractérisent par une prolifération des cellules endothéliales et une néovascularisation parfois associée à un infiltrat inflammatoire mixte avec des foyers de nécrose. Comme dans les ganglions de la MGC, les bactéries se retrouvent directement au contact de ces vaisseaux. Cette proximité n'est pas le fait du hasard puisque ces bactéries sont exigeantes en hémine pour pouvoir se développer.



Dr. M.T. Daniel Hôpital Saint Louis

Figure 8 : Cytologie ganglionnaire

Chez le chat bactériémique, des bactéries ont été trouvées à l'intérieur des hématies (sans formation de vacuole intracellulaire) dont la paroi est parfois incurvée en regard de la bactérie. *B. bacilliformis* est l'espèce qui a été la mieux étudiée; elle est capable de pénétrer à l'intérieur de plusieurs types de cellules, hématies, cellules endothéliales, fibroblastes, et cellules de l'épithélium laryngé. Comme *B. henselae*, *B. bacilliformis* se retrouve directement dans le cytoplasme des hématies, sans vacuole. Le mécanisme de pénétration dans les érythrocytes semble particulier et nécessite la conjonction de trois éléments de virulence : une protéine extra cellulaire responsable de la déformation de la paroi cellulaire (deformin), des flagelles et de trois gènes *ctpA*, *ialA* et *ialB* nécessaires à l'invasion. Seuls ces trois gènes ont été mis en évidence chez *B. henselae* comme chez *B. quintana*. Chez ces deux espèces, des pili permettraient l'adhésion aux cellules épithéliales. Le processus d'invasion des cellules endothéliales est lent (environ 24 heures) est nécessite la formation d'agrégats bactériens. Cette étape préalable est indispensable pour l'induction de l'angiogénèse. Celle-ci, prolifération des cellules endothéliales, a été observée pour *B. bacilliformis*, *B. henselae*, puis *B. quintana*. Les bactéries vivantes comme des extraits libres de bactéries sont capables d'induire cette prolifération. Deux mécanismes indépendants sont responsables de cette angiogénèse : le premier en déclenchant directement cette prolifération et en inhibant l'apoptose des cellules endothéliales, le second indirectement par l'intermédiaire de macrophages infectés qui libèrent du VEGF (vascular endothelial growth factor) et de l'interleukine-1 β (IL-1 β) qui potentialise l'effet du VEGF. L'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales serait le fait d'un facteur soluble. Un système de sécrétion de type IV (*virB4*) est impliqué dans l'invasion, dans l'activation proinflammatoire et dans cette protection antiapoptotique des cellules endothéliales.

Si l'on compare les infections à *B. bacilliformis* et celle à *B. henselae* et *B. quintana*, la fièvre de Oroya, la maladie des griffes du chat et la fièvre quintane correspondent vraisemblablement aux primo-infections alors que la verruga peruana, l'angiomatose bacillaire ou la péliose parenchymateuse sont probablement la manifestation de la résurgence de la bactérie, indiquant bien le fait que ces bactéries sont capables de persister plusieurs années dans l'organisme. Le fait que des patients VIH positifs présentant une angiomatose bacillaire à *B. henselae* avaient des anticorps spécifiques plusieurs années auparavant confirme cette hypothèse.

Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique des infections à *Bartonella* s'est considérablement développé ces dernières années. Les techniques diagnostiques de ces infections reposent soit sur l'isolement des bactéries, soit leur mise en évidence par immunofluorescence directe ou par les techniques moléculaires (PCR), soit enfin par détection d'anticorps dans le sérum. La stratégie diagnostique sera fonction du contexte clinique (cf plus loin) :

Culture

La culture de ces bactéries est fastidieuse, au moins 10 à 15 jours dans des conditions d'incubation particulières bien que possibles à partir des ganglions, de la peau ou des tissus profonds, voire du sang.

Dans cette éventualité, il est préférable d'utiliser le système Isolator® de centrifugation-lyse ou plus encore des tubes, de préférence en plastique et contenant de l'EDTA, car ils supporteront mieux la congélation à -80°C (qui augmente le nombre de bactéries retrouvées en culture) avant de procéder au repiquage ([figure 9](#)). La détection de ces

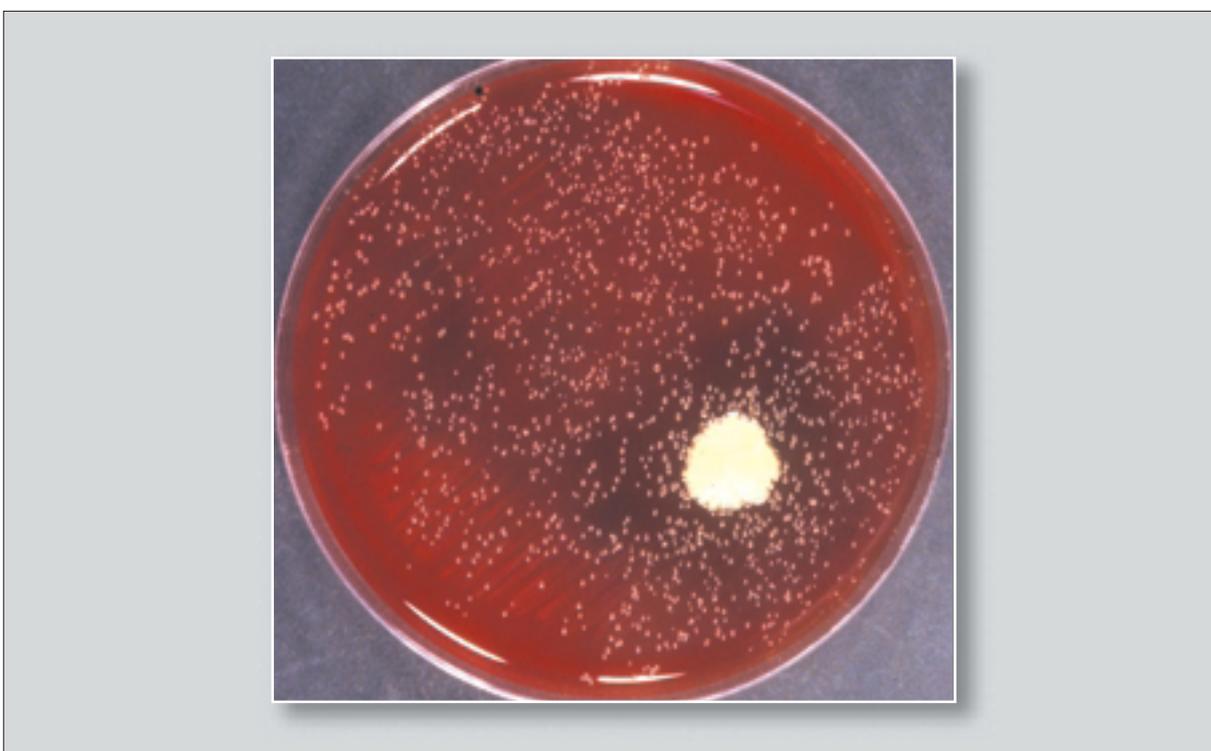


Figure 9 : Isolement : colonies de *Bartonella henselae* isolées sur gélose cœur - cerveau au sang de lapin frais après 13 jours d'incubation à 37°C.

bactéries à partir de milieux d'hémoculture d'origine commerciale n'a pu être faite, sauf au prix d'une incubation anormalement prolongée. Une coloration à l'acridine orange d'un frottis réalisé à partir de l'hémoculture sensibilise en visualisant ces bactéries et incite au repiquage ultérieur sur les milieux appropriés.

La culture à partir d'autres prélèvements et notamment des ganglions est beaucoup moins rentable, car au stade de ganglion inflammatoire ou purulent, celle-ci est souvent inhibée par les molécules toxiques présentes dans ce ganglion. A partir des lésions d'angiomatose, cela est également possible, mais la contamination des milieux par la flore cutanée à croissance beaucoup plus rapide (Staphylocoques à coagulase négative, corynébactéries) peut gêner cette culture.

L'isolement de *B. henselae* peut se faire soit sur milieux gélosés soit sur culture cellulaire. Les milieux gélosés doivent être des milieux enrichis au sang frais et de préparation récente (le sang de lapin semble le plus performant, et celui de cheval convient mieux que celui de mouton). L'incubation doit se faire de manière prolongée, au moins 4 semaines, à 35-37°C sous 5% de CO₂ (figure 10). Ces conditions

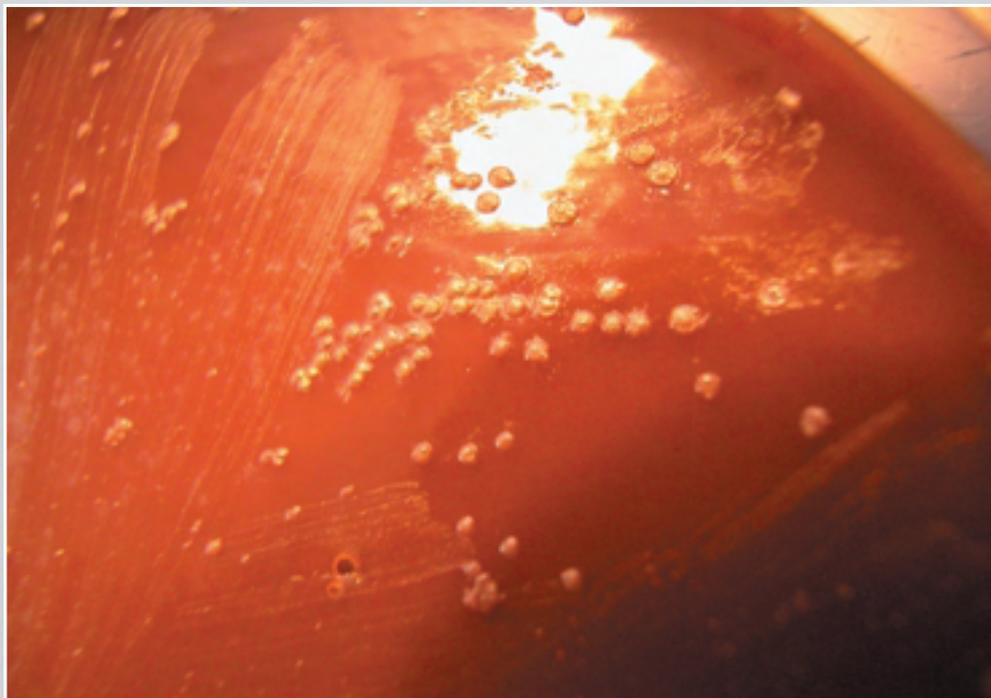


photo : UMF BIPAR/HJ Boulois

Figure 10 : Culture de *B. henselae* sur une gélose cœur - cerveau au sang de lapin frais après trois semaines de culture à 37°C sous 5% de CO₂.

inhabituelles nécessitent l'utilisation de sachet individuel pour éviter la dessiccation des milieux de culture. Les colonies sont d'abord petites, blanchâtres, de tailles irrégulières (< 1mm) parfois adhérentes et glissant sur la gélose devant la pipette Pasteur. Les cellules utilisées pour l'isolement sur cultures cellulaires sont des lignées de cellules endothéliales humaines (ECV 304) L'incubation sera également longue.

Les Bartonella se caractérisent comme des bacilles à Gram-négatif (**figure 11**), parfois légèrement incurvés, de 1 à 1,2 µm de longueur sur 0,5 à 0,6 µm de diamètre, le plus souvent immobiles. La **figure 12** (page 78) illustre un aspect morphologique des Bartonella intracellulaires facultatifs après culture cellulaire (VERO) et révélation par immunofluorescence indirecte.

L'identification de la bactérie, très pauvre en activités métaboliques, peut être obtenue soit en utilisant des anticorps spécifiques de souris en immunofluorescence directe soit par analyse de la composition en acide gras soit enfin de préférence par les méthodes moléculaires (cf diagnostic moléculaire).

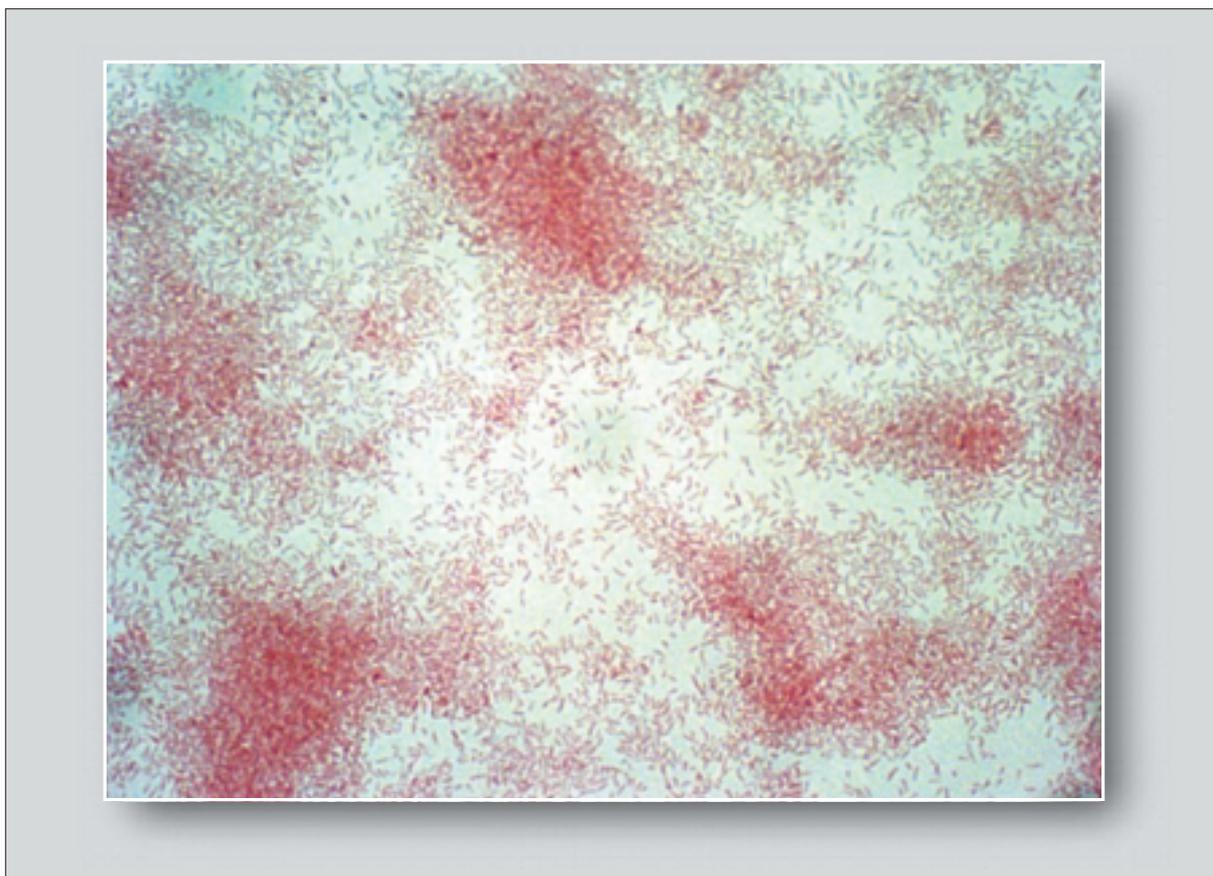


photo : UMR BIPAR/HJ Boulouis

Figure 11 : *Bartonella henselae* : coloration de Gram (G X 1000).

Diagnostic moléculaire

Plusieurs méthodes de PCR ont été et sont utilisées de plus en plus fréquemment pour le diagnostic des infections à *Bartonella*. Différentes cibles sont utilisées : l'ARN 16S, l'espace intergénique 16S-23S (ITS), et certains gènes spécifiques (tableau 2, figure 13). Lors du choix de l'ARN 16S comme cible, deux stratégies sont possibles, soit l'utilisation d'amorces universelles soit celle d'amorces spécifiques des bartonelles. La première

Tableau 2 : Bartonella : choix d'amorces pour le diagnostic par amplification génique (PCR)

Cible	Gène	Espèce	Amorces
ARN16S	ARNr	Toutes les <i>bartonelles</i>	p93E 5'-CCGCACAAGCGGTGGAGCA-3' p13B 5'-AGGCCCGGGAACGTATTAC-3'
ITS	16S-23S	Toutes les <i>bartonelles</i>	QHVE1 5'-TTCAGATGATGATCCCAAGC-3' QHVE4 5'-AACATGTCTGAATATATCTTC-3'
Protéine de choc thermique	htrA	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>	CAT-1 5'-GATCAATTGGTTTGAAG(G/A)GAGGCT-3' CAT-2 5'-TCACATCACCAGG(A/G)CGTATTC-3'
Citrate synthétase	gltA	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>	BhCS.781p 5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3' BhCS.1137 5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3'
Protéine de choc thermique	groEL	Toutes les <i>bartonelles</i>	BbHS233.p 5'-CGTGAAGTTGCCTCAAAAACC-3' BbHS1630.n 5'-AATCCATTCCGCCCATTC-3'
Enzyme de la voie de synthèse de la Riboflavine	ribC	Toutes les <i>bartonelles</i>	BARTON-1 5'-TAACCGATATTGGTTGTGTTGAAG BARTON-2 5'-TAAAGCTAGAAAGTCTGGCAACATAACG
	ribC	<i>B. henselae</i>	PBH-L1 5'-GATATCGGTTGTGTTGAAGA-3' PBH-R1 5'-AATAAAAGGTATAAAACGCT-3'
	ribC	<i>B. quintana</i>	PBH-L1 5'-GATATCGGTTGTGTTGAAGA-3' PBQ-R1 5'-AAAGGGCGTGAATTTTG-3'
RNA polymérase	rpoB	Toutes les <i>bartonelles</i>	1400F 5'-CGCATTGGCTTACTTCGTATG-3' 2300R 5'-GTAGACTGATTAGAACGCTG-3'
Protéine de division cellulaire	ftzS	Toutes les <i>bartonelles</i>	BaftsZF 5'-GCTAATCGTATTTCGCGAAGAA-3' BaftsZR 5'-GCTGGTATTTCCAAYTGATCT-3'
	ftzS	Toutes les <i>bartonelles</i>	FTS1p 5'-GCCTTCTCATCCTCAACTT-3' FTS2p 5'-CAGCCTCTTACGATGTG-3'

stratégie impose un séquençage du produit amplifié. Parmi les autres gènes cibles, certains permettent la caractérisation d'une seule espèce comme le gène *htrA* pour *B. henselae* contrairement au gène *gltA* codant pour la citrate synthétase (*B. henselae*, *B. quintana*). D'autres gènes cibles sont utilisés et permettent plutôt à la caractérisation phylogénétique d'espèces nouvellement identifiées (*B. bovis*, par exemple). [Le tableau 2](#) précise les amorces utilisées dans le diagnostic et la caractérisation des bartonelles.

Taille du produit de PCR	Température d'hybridation en °C	But	Méthode d'analyse
460 pb	55	Diagnostic	Restriction Séquençage
642 pb	52	Phylogénie	Séquençage
414 pb	50	Diagnostic	Restriction Séquençage
379 pb	48	Identification	Restriction Séquençage
1368 pb	56	Identification Phylogénie	Séquençage
588/585 pb Phylogénie	51 Séquençage	Diagnostic/identification	Restriction
393 pb	55	Diagnostic	
386 pb	60	Diagnostic	
825 pb	53	Diagnostic/identification Phylogénie	Restriction Séquençage
885 pb	56	Identification	Séquençage
1015 pb	56	Diagnostic/identification	Séquençage

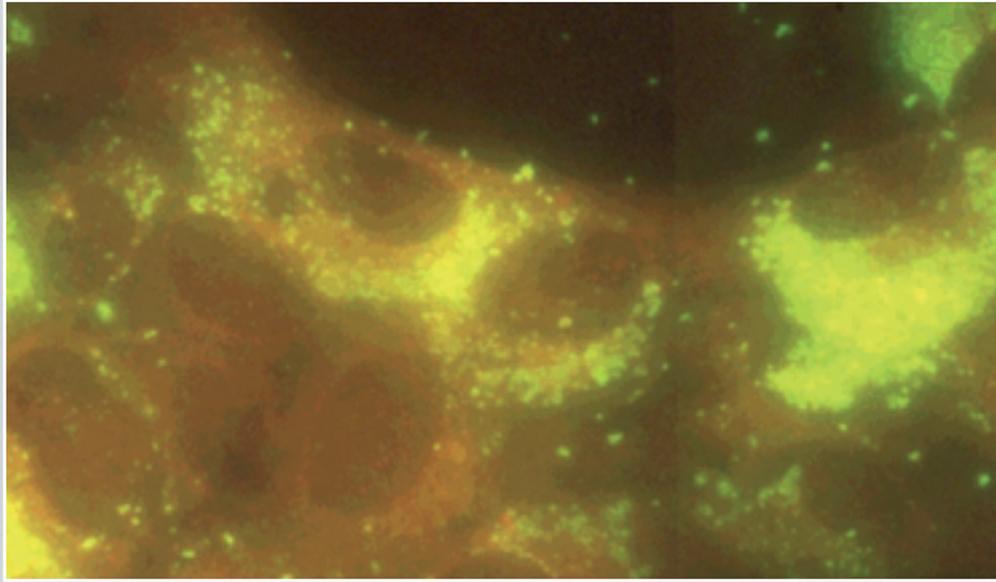


photo : UMR BIPAR/HJ Boulouis

Figure 12 : Mise en évidence de *B. henselae* par immunofluorescence.



- A. Ganglion positif à *B. henselae*
- B. Colonie de *B. quintana* isolée du sang chez un patient VIH
- C. Lésion d'angiomatose bacillaire du même patient
- D et G. Marqueur de poids moléculaire (100 pb)
- E et F. Témoin positif (E : *B. henselae* F : *B. quintana*)
- H. Témoin négatif

photo : Alet G.

Figure 13 : Diagnostic par amplification génique (PCR)

Diagnostic sérologique

La méthode d'immunofluorescence indirecte est la méthode de référence pour les infections à *B. henselae* et *B. quintana*. Les antigènes peuvent être préparés par soi-même et il est préférable de les préparer sur culture cellulaire (cellules VERO ou sur lignée endothéliales humaines).

On peut utiliser les lames proposées par Focus Diagnostics® distribuées en France par Eurobio®. Les antigènes préparés sur cellules VERO servent à la détection des IgG et ceux préparés sur milieu gélosé, à la détection des IgM. Les deux antigènes, *B. henselae* et *B. quintana* sont présents côte à côte sur 2 puits jointifs (figure 14a). La lecture au microscope inverse l'ordre de la lecture (figure 14b). En général, un titre $\geq 1/64$ est considéré comme positif en IgG et un titre $\geq 1/20$ est considéré comme positif en IgM. La lecture est facile. Les réactions sont croisées pour les 2 antigènes, mais les titres observés pour l'espèce en cause sont supérieurs d'une à deux dilutions.

La séroprévalence des anticorps anti *B. henselae* est de l'ordre de 4 à 6 % dans la population générale.

La spécificité est $> 95\%$ pour un titre $\geq 1/128$ en IgG. Il faut savoir que cette technique présente une sensibilité dans la MGC variant entre 85 et 95 % selon les études. Des IgM sont mises en évidence environ dans 40 % des cas. La durée de la réponse IgM n'est pas encore bien déterminée. L'absence d'IgM peut s'expliquer par le délai observé entre la griffure et la constitution de l'adénopathie amenant à la consultation du praticien. Une réponse sérologique négative ou à la limite de la positivité ne permet pas d'écarter le diagnostic de MGC, soit que le patient soit un mauvais répondeur, soit que l'infection soit liée à une autre espèce de *Bartonella*. Dans ces cas, un deuxième sérum, prélevé deux semaines, après permettra de mettre en évidence l'ascension du titre des anticorps. Dans les endocardites, les titres observés sont très souvent supérieurs à 1/1024 et ce résultat signe l'infection.

Si l'on suspecte une infection liée à une autre *Bartonella*, il faut procéder à un Western-Blot avec des absorptions avec les différents antigènes utilisés pour caractériser l'espèce en cause. Cette technique est le fait de laboratoires spécialisés tel l'Unité des Rickettsies aussi CNR à la Faculté de Médecine de Marseille (Pr. Raoult D.).

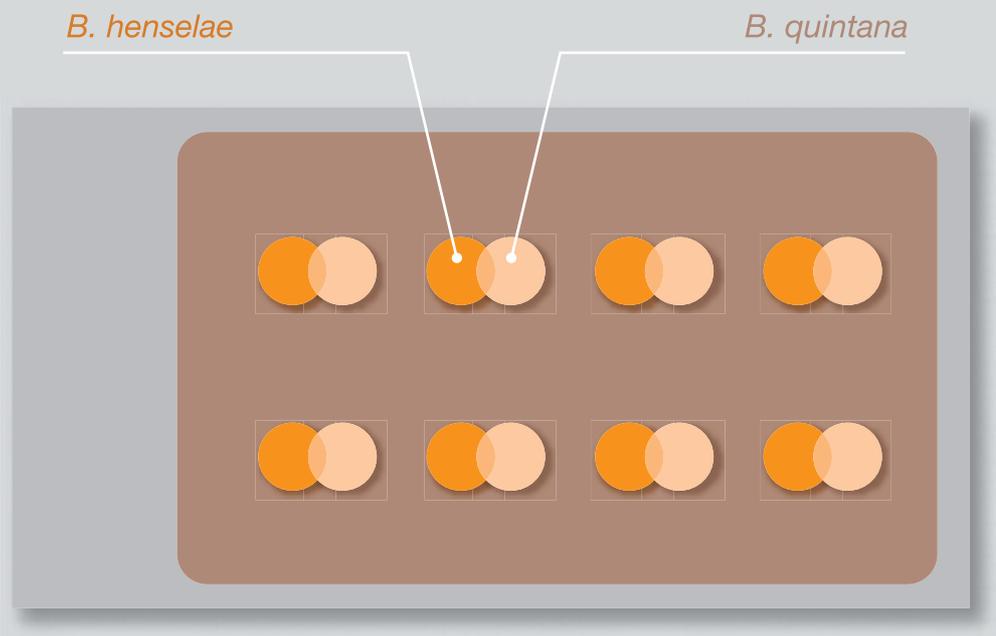


Figure 14 a

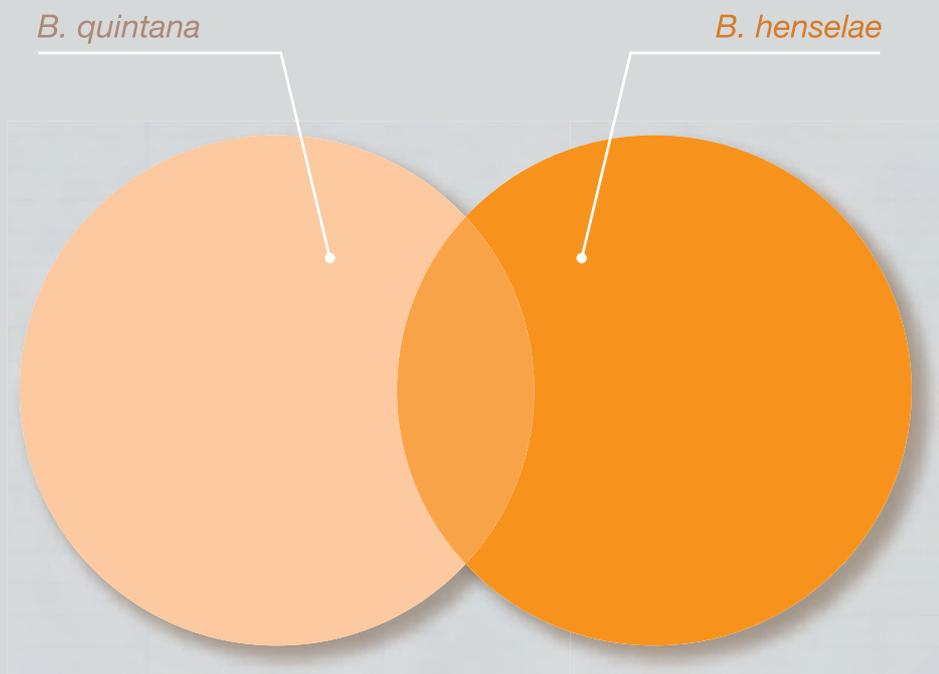


Figure 14 b

Des réactions croisées ont été décrites avec *Chlamydia*, et quelques faux positifs ont été décrits lors d'infections à Cytomegalovirus, au virus de l'hépatite B, à VIH, et à *Coxiella burnetii*.

La sérologie est un bon moyen diagnostique des localisations oculaires, mais la PCR et quelquefois la culture peuvent être réalisées avec succès.

Diagnostic anatomopathologique : cf page 71 (*Histopathologie et physiopathologie*)

La stratégie diagnostique

Elle est différente selon la présentation clinique ([tableau 3](#)).

Devant une MGC classique avec un contexte épidémiologique évocateur, la clinique reste prépondérante mais une recherche des anticorps peut être pratiquée en premier lieu. Le résultat de la cyto-ponction ganglionnaire préalable peut également orienter le clinicien et faire pratiquer une sérologie.

La mise en évidence de l'ADN de la bactérie par PCR est une autre méthode de diagnostic. Elle peut être effectuée à partir de la cyto-ponction ou d'une biopsie éventuelle pratiquée à visée diagnostique. La rentabilité de cette technique est bonne, malgré quelques faux négatifs (<5%), probablement dus soit à une insuffisance de matériel, soit à la clairance des bactéries des ganglions en voie de guérison, soit enfin à un jeu d'amorces inappropriées.

Tableau 3 : Diagnostic biologique des infections humaines à *B. henselae* et *B. quintana*.

Tableau clinique	Sérologie	PCR	Isolement	
			Tissus	Sang
MGC classique	+++	+++ (ganglion)	+/-	-
Septicémie	++	-	-	++
Endocardite	+++	+++ (valve)	+	++
Angiomatose bacillaire (VIH+)	+/-	+++ (lésion cutanée)	+/-	++

- Devant une angiomatose bacillaire ou une suspicion de bactériémie ou d'endocardite, il faut tenter d'isoler la bactérie à partir du sang. Si on dispose de biopsies cutanées ou de tissus profonds, la PCR est une méthode très rentable. La sérologie donne également d'excellents résultats, sauf peut-être en cas d'angiomatose où les titres observés ne sont pas toujours contributifs, la primo-infection pouvant dater de plusieurs années auparavant. Des infections ont été documentées (adénopathies chroniques) avec isolement de *B. quintana*, en l'absence d'anticorps détectables.

Tableau 4 : *B. henselae* et *B. quintana* : CMI (mg/L) de divers antibiotiques en milieu gélosé.

Antibiotique	<i>B. henselae</i>	<i>B. quintana</i>
Bêta-lactamines		
Pénicilline	0,03-0,06	8-16
Amoxicilline	0,06-0,12	0,03-0,06
Céfalotine	8-16	8-16
Céfotaxime	0,12-0,25	0,12-0,25
Ceftriaxone	0,12-0,25	0,12-0,25
Imipénème	0,5	0,25-1
Aminosides		
Gentamicine	0,12-0,25	0,12-2
Amikacine	2,4	4-8
Macrolides		
Erythromycine	0,06-0,25	0,06-0,12
Roxithromycine	0,015-0,03	0,015-0,06
Clarithromycine	0,006-0,03	0,006-0,03
Azithromycine	0,006-0,015	0,006-0,03
Télithromycine	0,003	0,003
Tetracyclines		
Doxycycline	0,12	0,06-0,25
Fluoroquinolones		
Ciprofloxacine	0,25-1	0,5-2
Lévofloxacine	0,25-2	0,25-2
Sparfloxacine	0,06	0,006-0,12
Moxifloxacine	0,12-1	0,12-1
Gatifloxacine	0,06-0,5	0,06-0,5
Gémifloxacine	0,06-0,5	0,06-0,5
Rifampicine	0,03-0,06	0,06-0,25
Cotrimoxazole (TMP-SXT)	1/5	0,25/1,25-1/5

Sensibilité aux antibiotiques et traitement des infections humaines

Sensibilité aux antibiotiques *in vitro*

En pratique courante, le biologiste, s'il parvient à isoler la bactérie du sang ou de ganglions peut réaliser un antibiogramme en utilisant la méthode du E-test. Cette détermination est fastidieuse, car la bactérie pousse lentement. Il faut utiliser une gélose chocolat enrichie de type "Polyvitex®". L'inoculum sera une suspension bactérienne calibrée à 5 McFarland. Les antibiotiques à tester sont l'azithromycine, la clarithromycine, la ciprofloxacine, la moxifloxacine, la lévofloxacine, la gentamicine et la rifampicine. L'incubation sera faite en atmosphère humide avec 5% de CO² et la lecture sera réalisée entre 3 et 5 jours.

Les bases scientifiques du traitement sont peu nombreuses. En milieux gélosés, les deux espèces, *B. henselae* et *B. quintana*, sont très sensibles aux pénicillines (pénicilline G, ampicilline, uréidopénicillines) (tableau 4). L'activité des céphalosporines est variable, mauvaise pour celles de première génération, moyenne pour celles de deuxième (céfuroxime), bonne pour celles de troisième génération (ceftriaxone, céfotaxime). L'activité des aminosides semble bonne (streptomycine et kanamycine exceptées), la gentamicine montre la meilleure activité. Parmi les macrolides, les nouvelles molécules comme l'azithromycine, la clarithromycine et la télithromycine ont la meilleure activité. Tétracyclines, rifampicine et cotrimoxazole ont une très bonne activité inhibitrice.

Concernant les fluoroquinolones, la ciprofloxacine a une activité correcte. Les nouvelles molécules comme la sparfloxacine, la gatifloxacine, la gémifloxacine et moxifloxacine ont une meilleure activité.

En culture cellulaire, une seule étude a démontré une très grande activité bactéricide mais uniquement avec les aminosides dont la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine. La rifampicine s'est également montrée bactéricide. Les autres familles ou groupes comme les macrolides, les tétracyclines, les fluoroquinolones, et certaines céphalosporines de troisième génération se sont montrées beaucoup moins

bactéricides *in vitro*. L'activité bactéricide importante de la gentamicine ne s'exerce pas en intracellulaire, mais lorsque ces bactéries sortent des cellules pour en infecter d'autres.

- De ces travaux, il faut retenir la non efficacité clinique des bêta-lactamines (ceftriaxone peut-être exceptée) malgré leur bonne activité *in vitro* et l'activité très bactéricide de la gentamicine et de la rifampicine. A l'heure actuelle, les recommandations selon la situation clinique sont les suivantes (tableau 5).

Tableau 5 : Recommandations pour le traitement des infections à *B. henselae* et *B. quintana*.

Maladie	Molécule, association	Adulte : posologie et durée	Enfant : posologie et durée
Maladie des griffes du chat (MGC)	Pas de recommandations		
MGC avec lymphadénopathies extensives	Azythromycine	1 x 500 mg à J1 1 x 250 mg de J2 à J5	10 mg/kg à J1 5 mg/kg de J2 à J5
Rétinite	Doxycycline (D) & Rifampicine (R)	D : 2 x 100 mg 4 à 6 semaines R : 2 x 300 mg 4 à 6 semaines	
Fièvre des tranchées	Doxycycline (D) & Gentamicine (G)	D 1 x 200mg pour 4 semaines G 1 x 3 mg/kg pour 2 semaines	
Angiomatose bacillaire	Erythromycine (E) ou Doxycycline (D)	E : 4 x 500 mg pour ≥ 3 mois D : 2 x 100 mg pour ≥ 3 mois	E : 40 mg/kg pour ≥ 3 mois
Endocardite documentée	Doxycycline (D) & Gentamicine (G)	D : 2 x 100 mg pour 6 semaines G : 1 x 3 mg/kg pour 2 semaines	
Endocardite suspectée	Ceftriaxone (C) et/ou Doxycycline (D) & Gentamicine (G)	C : 2 x 1g pour 6 semaines D : 2 x 100 mg pour 6 semaines G : 1 x 3 mg/kg pour 2 semaines	

Références citées

- Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005, 36, 383-410.
- Boulouis HJ, Chomel B. [*Bartonellosis*: emerging infection]. *Rev Prat.* 2004, 54, 1982-1986.
- Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12, 389-394.
- Chomel BB, Boulouis HJ. [Zoonotic diseases caused by bacteria of the genus *Bartonella* genus: new reservoirs ? New vectors?] *Bull Acad Natl Med.* 2005, 189, 465-477.
- Dehio C. *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol.* 2005, 3, 621-631.
- Dehio C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2004, 58, 365-390.
- Dorbecker C, Sander A, Oberle K, Schulin-Casonato T. In vitro susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Aug 17.
- Foucault C, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12, 217-223.
- Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J Med Microbiol.* 2002, 51, 915-923.
- Hansmann Y, DeMartino S, Piemont Y, Meyer N, Mariet P, Heller R, Christmann D, Jaulhac B. Diagnosis of cat scratch disease with detection of *Bartonella henselae* by PCR: a study of patients with lymph node enlargement. *J Clin Microbiol.* 2005, 43, 3800-3806.
- Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine.* 2005, 84, 162-173.
- Houpikian P, Raoult D. Diagnostic methods current best practices and guidelines for identification of difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002, 16, 377-392.
- Huarcaya E, Maguina C, Torres R, Rupay J, Fuentes L. Bartonellosis (Carrion's Disease) in the pediatric population of Peru: an overview and update. *Braz J Infect Dis.* 2004, 8, 331-339.
- Lamps LW, Scott MA. Cat-scratch disease: historic, clinical, and pathologic perspectives. *Am J Clin Pathol.* 2004, 121 Suppl: S71-80.
- La Scola B and Didier Raoult. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from Human Samples: a 5-Year Experience (1993 to 1998). *Journal of Clinical Microbiology*, June 1999, p. 1899-1905, Vol. 37, No. 6
- Musso D, Drancourt M, Raoult D. Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on *Bartonella (Rochalimaea) henselae*. *J Antimicrob Chemother* 1995, 36, 101-108.

Ormerod LD, Dailey JP. Ocular manifestations of cat-scratch disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 1999 Jun;10(3):209-216.

Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier PE, Ardagna Y, Drancourt M, Signoli M, La VD, Macia Y, Aboudharam G. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J Infect Dis*. 2006;193, 112-120.

Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, 48, 1921-1933.

Rovero C, Greub G, Lepidi H, Casalta JP, Habib G, Collart F, Raoult D. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2005, 43, 163-167.

Adresses de sites

www.microbes-edu.org/etudiant/bartonella/bartonella.html

www.microbes-edu.org/professionnel/diag/bartonella.html

http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Autres_bartonella.html

http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Bartonella_quintana.html

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bartonella.html>

<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no03/05-0931.htm>

<http://www.pitt.edu/~super1/lecture/lec8711/index.htm>

***Tropheryma whipplei* et maladie de Whipple**

F. Fenollar

CHAPITRE III

Introduction et historique

La maladie de Whipple et *Tropheryma whipplei* fournissent un bon exemple de l'apport des technologies modernes à la connaissance médicale. La maladie de Whipple est une maladie chronique, décrite pour la première fois en 1907 (108). *T. whipplei*, la bactérie responsable de cette maladie, a pu être cultivée pour la première fois un siècle plus tard, en 2000. Ce succès a permis d'optimiser la compréhension et la prise en charge de cette maladie.

Durant le 20^{ème} siècle, les connaissances concernant la maladie de Whipple se sont accumulées lentement comme en témoignent les éléments du [tableau 1](#) (8,13,79,81,110). A l'aube du 21^{ème} siècle, 2 éléments majeurs, l'amplification moléculaire de l'ARN 16S ribosomique par PCR et la culture cellulaire de la bactérie responsable ont contribué à des avancées substantielles de notre compréhension de cette maladie, longtemps demeurée mystérieuse (85,91,91,109). L'obtention de la première souche de la bactérie en culture (85) a permis notamment de séquencer son génome entier (7,86), d'étudier sa sensibilité aux antibiotiques (9,10) et de la nommer de manière définitive *T. whipplei* (52). Au départ, la bactérie avait été nommée *Tropheryma whippellii*, du Grec trophi (nourriture) et eryma (barrière), due à la malabsorption digestive observée (91).

La maladie de Whipple est connue principalement pour être responsable de troubles digestifs associés à des arthralgies (24,36,62,72). En réalité, *T. whipplei* peut être responsable d'une symptomatologie clinique très variée et absolument pas spécifique (68,104). Le diagnostic de la maladie a reposé pendant de nombreuses années sur l'examen anatomo-pathologique de biopsies de tissus affectés par la coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS). L'évolution spontanée de la maladie est longue, marquée par des épisodes de rémission et de rechute pouvant évoluer jusqu'à la mort en absence de traitement antibiotique adapté (24,36,62,72).

<http://www.WhipplesDisease.net/index.html>

Tableau 1 : Dates clés concernant la maladie de Whipple et *Tropheryma whipplei*

Date	Personne/Référence	Avancées
1907	Whipple/(108)	Première description de la maladie
1947	Oliver-Pascual <i>et al.</i> /(79)	Premier diagnostic avant le décès du patient
1949	Black-Schaffer/(8)	Développement de la coloration au PAS pour le diagnostic
1952	Paulley/(81)	Premier cas rapporté montrant l'efficacité d'un traitement antibiotique
1961	Chears et Ashworth/(13) Yardley et Hendrix(110)	Microscopie électronique montrant la présence de bactéries dans les macrophages
1991	Wilson <i>et al.</i> /(109)	Séquence partielle de l'ARN 16S ribosomique d'une bactérie jusque là inconnue
1992	Relman <i>et al.</i> /(91)	Confirmation de la séquence de l'ARN 16S ribosomique Premier nom de la bactérie : <i>Tropheryma whippellii</i>
2000	Raoult <i>et al.</i> /(85)	Première culture du bacille responsable de la maladie de Whipple
2001	La Scola <i>et al.</i> /(52)	Première caractérisation phénotypique du bacille de Whipple ; nouveau nom: <i>Tropheryma whipplei</i>
2003	Bentley <i>et al.</i> /(7) Raoult <i>et al.</i> /(86)	Séquençage complet de 2 génomes provenant de 2 différentes souches de <i>T. whipplei</i>

L'agent causal : *Tropheryma whipplei*

L'étiologie de la maladie de Whipple est restée obscure pendant de nombreuses années. Lors de la description initiale de la maladie, Whipple, un pathologiste américain, avait rapporté la présence de microorganismes en forme de bâtonnets de 2 µm de long, présents principalement dans les macrophages (108). Cependant, il n'avait réalisé aucun lien entre la maladie et un possible agent étiologique (108). De plus, il a considéré à cette époque que la maladie était liée à un trouble du métabolisme des graisses. Cette dernière a été alors nommée "lipodystrophie intestinale". En 1960, une première observation par microscopie électronique de structures ressemblant à des bactéries à partir de prélèvements de patients a été effectuée (15). Cette bactérie présentait une morphologie qui n'était pas typique non seulement des bactéries à gram positif, mais aussi des bactéries à gram négatif (20).

En 1991, Wilson et ses collaborateurs ont pu débiter le séquençage d'une portion de l'ADN 16S ribosomique de la bactérie après amplification génique par PCR réalisée sur une biopsie duodénale d'un patient atteint de maladie de Whipple (109). Ces résultats furent complétés et confirmés un an après par Relman et ses collaborateurs (91). Cette séquence correspondait à une bactérie non caractérisée auparavant se situant dans le phylum des Actinomycètes, i. e. des bactéries de structure à Gram positif à haut GC% parmi d'autres bactéries retrouvées principalement dans l'environnement (**figure 1**) (61,91).

En effet, *T. whipplei* semble être présente dans l'environnement. Toutefois, pour le moment, ni la source, ni le mode de transmission de cette bactérie sont clairement établis. Des études reposant sur l'amplification génique par PCR ont mis en évidence l'ADN de cette bactérie dans des eaux de drainage (63), ainsi que dans des selles

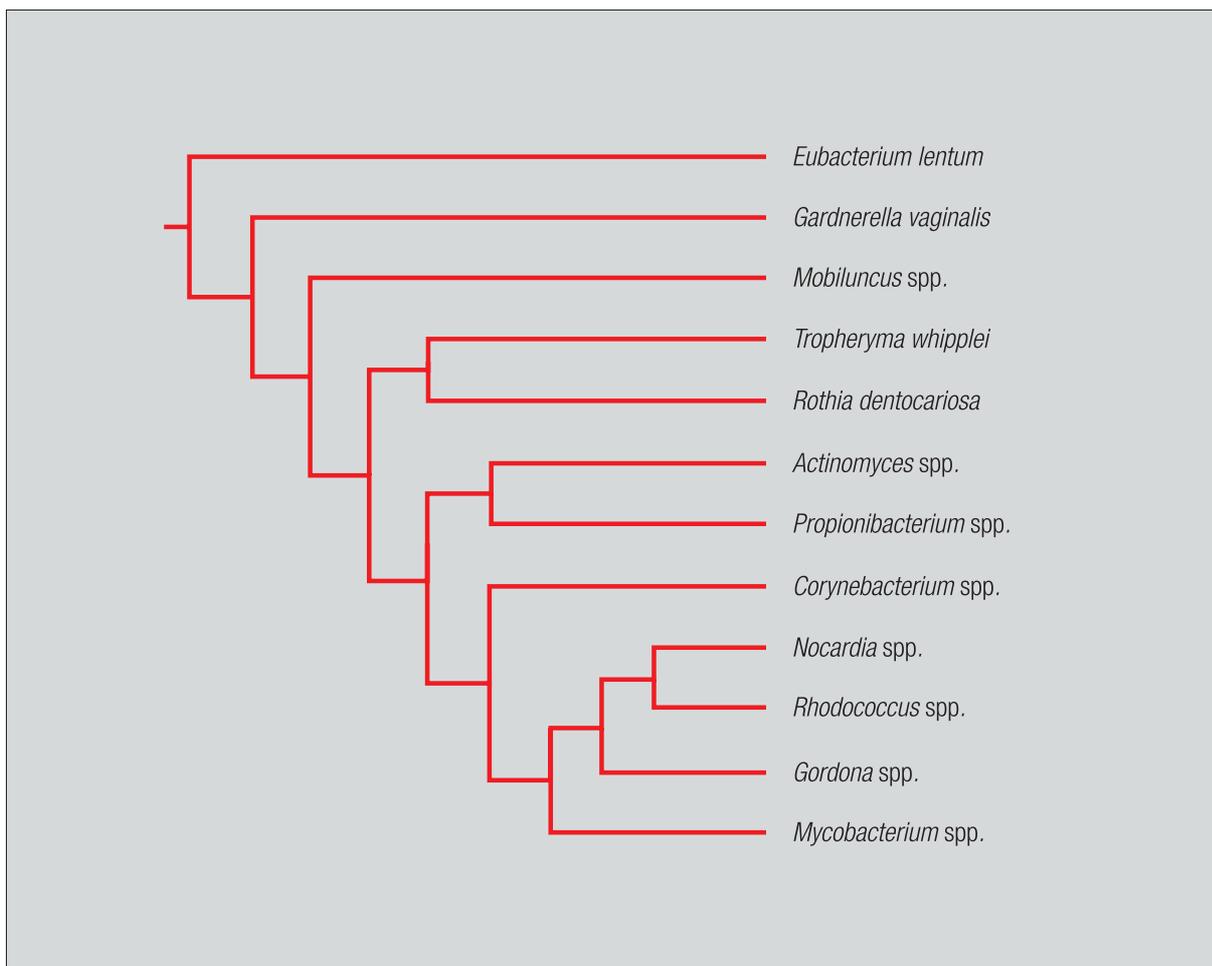


Figure 1 : Phylogénie de *Tropheryma whipplei* basée sur l'analyse de l'ARN16S ribosomique, classant la bactérie parmi les bactéries à Gram positif à haut GC%. (Arbre construit selon la méthode de Neighbor-Joining).

humaines de sujets sains (45). Une possible association entre la maladie de Whipple et la giardiose a aussi été rapportée (33). *Giardia lamblia* étant présent dans l'environnement, il est possible que les 2 microorganismes occupent la même niche écologique (33). Actuellement, l'hypothèse la plus plausible serait que *T. whipplei* soit acquis par voie féco-orale (36).

T. whipplei a été isolée pour la première fois par culture cellulaire grâce à des fibroblastes humains pulmonaires (85). En appliquant cette méthode (figure 2), 18 nouveaux isolats (7 provenant de liquide céphalo-rachidien, 4 d'échantillons sanguins, 2 de valves cardiaques, 2 de ganglions, 1 d'une biopsie duodénale, 1 de liquide synovial, et 1 de muscle squelettique) ont pu être ainsi obtenus (7,30,64). En se basant sur l'analyse génomique, un milieu de culture axénique (i. e. ne comprenant pas de cellules de mammifères) a été mis au point grâce à l'ajout de tous les acides aminés

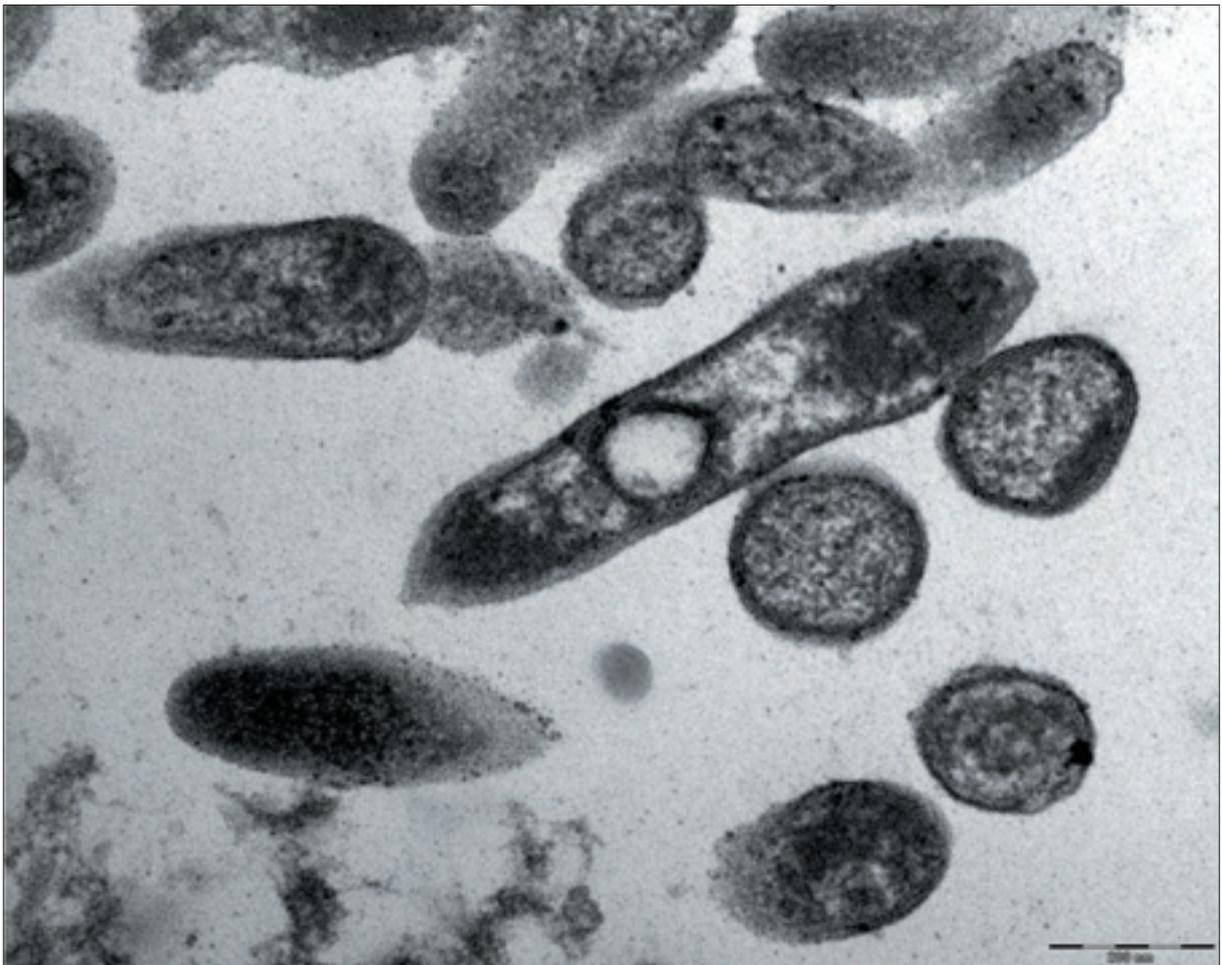


Figure 2 : Image de *T. whipplei* obtenue par microscopie électronique en transmission (Taille de la barre: 200 nm).

manquants (92). En appliquant cette technique, 2 souches de *T. whipplei* provenant de liquide céphalo-rachidien, 2 d'échantillon sanguin, 1 de liquide synovial, 1 de ganglion, 1 de valve cardiaque et 1 de muscle squelettique ont été établies en parallèle des mêmes isolats obtenus en culture cellulaire. Enfin, une souche de *T. whipplei* a été isolée en culture axénique à partir d'un prélèvement de selles d'une patiente présentant une rechute de maladie de Whipple (89).

Les génomes complets de 2 différentes souches de *T. whipplei* ont été séquencés (7,86). La bactérie possède un très petit chromosome circulaire (inférieur à 1Mbase), comme cela a déjà été décrit pour d'autres bactéries intracellulaires. L'analyse du génome complet a révélé que les voies de biosynthèse de 16 acides aminés étaient manquantes ou incomplètes chez *T. whipplei*. Ces données laissent donc suspecter la nécessité d'obtenir des nutriments provenant de l'extérieur pour que la bactérie puisse se développer. Enfin, des recombinaisons de régions codant pour les protéines de surfaces ont aussi été détectées. Ces recombinaisons pourraient être associées à une possible production d'une très grande variété de protéines membranaires. Ces dernières pourraient ainsi permettre à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte (7).

Pour en savoir plus :

<http://www.bacterio.cict.fr/t/tropheryma.html>

<http://www.genome.org/cgi/content/full/13/8/1800/FIG1>

http://bips.u-strasbg.fr/fr/Products/Databases/Prokaryote_Genomes.php

Aspects physiopathologiques

Une des principales hypothèses concernant la physiopathologie de la maladie de Whipple est que tout le monde est exposé à *T. whipplei*; seules certaines personnes présentant des facteurs immunologiques prédisposants et non définis actuellement, développeront la maladie (69). Des facteurs génétiques ont été aussi suggérés du fait de la prédominance de la maladie chez les hommes mais aussi de la grande fréquence de l'antigène HLA-B27 parmi les patients. Cependant, aucune association réelle n'a été démontrée actuellement. De plus, ces hypothèses ne font pas l'unanimité (24).

La principale caractéristique histologique de la maladie de Whipple est l'infiltration massive des tissus infectés par les macrophages (55). Après un traitement efficace, les bactéries disparaissent, mais les macrophages persistent. Des études effectuées sur des sujets sains ont montré que *T. whipplei* se multiplie dans les macrophages mais pas dans les monocytes (18). Par contre, les bactéries se multiplient à la fois dans les monocytes et les macrophages chez les patients atteints de maladie de Whipple (18). La réplication de *T. whipplei* dans les macrophages est aussi associée à l'apoptose (18). Il semblerait que l'apoptose des macrophages soit cruciale pour la dissémination des bactéries. L'apoptose des macrophages est aussi corrélée à l'expression de l'interleukine 16 (IL-16) (27). De plus, les anticorps neutralisant l'IL-16 inhibent la croissance de la bactérie dans les macrophages (18). Enfin, les taux sériques d'IL-16 et des marqueurs d'apoptose sont corrélés à l'activité de la maladie de Whipple. Leurs taux redeviennent normaux lors d'une réponse favorable au traitement (18).

La réponse humorale ne semble pas impliquée dans la maladie de Whipple (69). Par contre, diverses études ont montré un dysfonctionnement des macrophages dans la maladie. En effet, bien que la phagocytose des bactéries par les macrophages se déroulent normalement, ces derniers sont incapables de dégrader la bactérie efficacement (19). Ce phénomène semblerait lié à un défaut de production de l'interleukine 12 (IL-12) par les monocytes/macrophages des patients atteints de maladie de Whipple (67). La diminution de production d'IL-12 pourrait conduire à une diminution de production d'interféron gamma par les cellules T et par conséquent, à un défaut d'activation des macrophages. La diminution de la production en IL-12 pourrait prévenir alors le développement d'une réaction immunitaire efficace de type Th1 et favoriser une orientation vers une réponse Th2.

Aspects épidémiologiques et cliniques

La maladie de Whipple est considérée comme rare. Cependant, aucune estimation valide de la fréquence de cette maladie n'est actuellement disponible. Jusqu'à présent, environ 1,000 cas de maladie de Whipple ont été rapportés dans la littérature (19). La maladie est de répartition mondiale. Elle est observée le plus fréquemment chez des hommes caucasiens d'âge moyen, mais les femmes et les enfants peuvent être aussi atteints (19).

La maladie de Whipple est caractérisée par 2 phases : la phase prodromale et la phase d'état. Les prodromes sont marqués par des signes cliniques divers, associés le plus souvent à des douleurs articulaires. La phase d'état est marquée par des signes classiques tels que l'amaigrissement et/ou la diarrhée, éventuellement accompagnées par d'autres manifestations, qui peuvent être très diverses puisque pratiquement tous les organes peuvent être atteints lors de la maladie de Whipple (84).

Le délai entre ces 2 phases a été estimé, en moyenne, à 6 ans. Les traitements immunosuppresseurs, dont notamment la corticothérapie, sont associés à une progression clinique plus rapide de la maladie (42,59). Les signes et symptômes classiques de la maladie de Whipple sont absents dans environ 15% des cas (72,104). En pratique, le diagnostic de la maladie de Whipple peut être suspecté devant un grand nombre de manifestations cliniques. En effet, les diagnostics différentiels de la maladie de Whipple sont très variés, incluant un large spectre de maladies dont les maladies inflammatoires rhumatismales, les maladies associées à une malabsorption digestive liée à une atteinte diffuse de l'intestin grêle (maladie cœliaque, sarcoïdose, lymphome), la maladie d'Addison, les connectivites ainsi qu'une variété de maladies neurologiques.

Les principaux signes et symptômes de maladie de Whipple sont présentés dans le [tableau 2](#) (14,19,28,38,49,66,104). Il est très important de souligner que même en l'absence de signes classiques de maladie de Whipple, des lésions histologiques typiques peuvent être observées au niveau des biopsies de l'intestin grêle par la coloration au PAS.

Actuellement, différents tableaux cliniques peuvent être rattachés à une infection causée par *T. whipplei*: la maladie de Whipple classique caractérisée par des lésions histologiques de l'intestin grêle associées à diverses manifestations cliniques,

Tableau 2 : Principales manifestations cliniques chez les patients atteints de maladie de Whipple.

Manifestations classiques
Diarrhée
Arthralgies
Amaigrissement
Douleurs abdominales
Polyadénopathie
Fièvre isolée
Tableau clinique ressemblant à la sarcoïdose
Manifestations neurologiques
Ralentissement psychomoteur pouvant évoluer jusqu'à la démence
Paralysies oculaires
Myoclonies
Mouvements anormaux des globes oculaires
Manifestations ophtalmologiques
Uvéite
Manifestations cardiovasculaires
Endocardite à hémoculture négative
Péricardite
Myocardite

l'endocardite à hémoculture négative et l'infection neurologique isolée dues à *T. whipplei*. En l'absence de traitement adapté, la maladie de Whipple est *a priori* fatale. De plus, malgré la prescription d'une antibiothérapie spécifique, des rechutes ont été rapportées dans 2 à 33% des cas. Ces rechutes surviennent après un délai moyen de 5 ans, après l'arrêt de l'antibiothérapie. Ces rechutes atteignent notamment le système nerveux central et sont de mauvais pronostic (48).

Maladie de Whipple classique

L'atteinte articulaire est observée chez 65 à 90% des patients présentant une maladie de Whipple classique (38,66,84,104). En effet, la plupart des patients atteints de maladie de Whipple rapportent une longue histoire de douleurs articulaires intermittentes (38,49,84,104). Un tableau de polyarthrite chronique séronégative est moins fréquemment observé et peut être confondu avec une polyarthrite rhumatoïde (84). Beaucoup plus rarement, des tableaux de spondylarthropathie, d'ostéoarthropathie hypertrophique et d'infection de prothèse du genou ont été rapportés chez des patients atteints de maladie de Whipple classique (39). Enfin, des myalgies et des crampes musculaires peuvent aussi être présentes (19).

La manifestation digestive la plus fréquemment observée dans la maladie de Whipple classique est l'amaigrissement, le plus souvent associé à une diarrhée chronique (19,38,66,104). Des saignements digestifs occultes sont parfois présents chez 20 à 30% des patients ainsi que des douleurs abdominales. Une hépatomégalie et/ou une splénomégalie peuvent aussi être observés (19). Enfin, la présence d'une ascite a été rapportée parmi 5% des patients environ (19).

Une atteinte neurologique a été rapportée chez 6 à 63% des patients atteints de maladie de Whipple classique (19,42,57). Les signes cliniques liés à cette atteinte neurologique sont très divers (42,57). Les ralentissements psychomoteurs sont les plus fréquemment rapportés. Ils seraient présents chez environ 71% des patients présentant une atteinte neurologique. Ils peuvent évoluer jusqu'à la démence (57). Un tableau dépressif ainsi que des variations de l'humeur et des changements de la personnalité sont observés chez environ la moitié des patients avec une atteinte neurologique. Environ la moitié des patients avec une atteinte neurologique présente aussi une paralysie oculaire (57). Des mouvements musculaires anormaux, à type de myoclonies, sont observés parmi un quart des patients présentant une atteinte neurologique. Une atteinte hypothalamique pouvant être mise en évidence par une polydipsie, une hyperphagie, une perturbation de la libido, et/ou une altération du cycle du sommeil est aussi décrite. Enfin, des mouvements anormaux des muscles oculaires, nommés myorhythmies oculo-facio-squelettiques ou oculo-masticatoires, sont considérés par certains comme caractéristiques de la maladie de Whipple mais ils sont très rarement observés (57).

Le pronostic des patients présentant une atteinte neurologique est mauvais (97). Enfin, il est très important de souligner qu'une atteinte neurologique asymptomatique chez les patients atteints de maladie de Whipple classique a été mise en évidence grâce à la détection de l'ADN de la bactérie par PCR dans le liquide céphalo-rachidien (105).

Une atteinte oculaire (en ne tenant pas compte de la paralysie oculaire) survient dans environ 11% des maladies de Whipple classique (19,21,66). L'uvéite est la manifestation oculaire la plus fréquemment observée.

Une atteinte cardiaque a été aussi rapportée parmi 17 à 55% des patients atteints de maladie de Whipple classique (34,104). Les 3 feuillets cardiaques (péricarde, myocarde et/ou endocarde) peuvent être atteints. La péricardite est décrite chez un peu plus de la moitié des patients atteints de maladie de Whipple classique (66). La myocardite survient moins fréquemment, responsable parfois de choc cardiogénique ou de mort subite.

Une atteinte pulmonaire est décrite chez environ 30 à 40% des patients avec une maladie de Whipple classique (19). Un épanchement pleural, des infiltrations pulmonaires et/ou des adénopathies médiastinales granulomateuses étaient notamment décrits dans les premiers cas rapportés de maladie de Whipple classique (19).

Neuf % des patients avec une maladie de Whipple classique présentent des granulomes épithélioïdes giganto-cellulaires non-caséeux, localisés le plus souvent au niveau des ganglions (19). L'atteinte des ganglions abdominaux, plus particulièrement mésentériques, n'est pas si rare alors que les adénopathies périphériques sont moins fréquemment observées. Diverses manifestations cutanées sont décrites dans la maladie de Whipple classique, telles qu'une mélanodermie (fréquemment observée auparavant, quand le diagnostic de la maladie était tardif), un érythème noueux, des nodules sous-cutanés, ainsi qu'un purpura (19,73). Une atteinte rénale est rarement observée, survenant le plus souvent tardivement dans l'évolution de la maladie (19). D'autres manifestations telles qu'une hypothyroïdie, une épидидymite et/ou une orchite ont été occasionnellement rapportés dans la maladie de Whipple classique (17,19,103).

L'endocardite

En 1997, le rôle de *T. whipplei* comme agent responsable d'endocardite à hémoculture négative a été mis en évidence lors de la réalisation de PCR ciblant l'ARN 16S ribosomique suivi de réaction de séquençage sur des valves cardiaques de patients suspects d'endocardite (44). Actuellement, 17 cas d'endocardites à hémoculture négative à *T. whipplei* ont été rapportés dans la littérature (1,22,41,46,54,77,93,95,100). Cette entité survient typiquement chez des sujets masculins de 60 ans environ, ne présentant pas d'antécédents cardiologiques particuliers (notamment absence d'atteinte des valves cardiaques). L'insuffisance cardiaque et les embolies artérielles sont les manifestations cardio-vasculaires, les plus fréquemment décrites. Les douleurs articulaires sont les signes extra-cardiaques les plus fréquemment rapportés par les patients. Ces douleurs précèdent de quelques années le diagnostic d'endocardite (46). Enfin, il faut souligner que le plus souvent les patients ne présentent pas de fièvre (46). De plus, les hémocultures réalisées sur les flacons d'hémoculture classiques restent stériles. Ce faisceau d'argument souligne pourquoi le diagnostic de cette entité reste encore difficile pour le moment (87). Actuellement, le diagnostic d'endocardite à *T. whipplei* repose le plus souvent sur l'analyse par PCR de valves cardiaques. A noter, l'analyse par PCR effectuée sur les biopsies de l'intestin grêle a été positive pour un des 17 patients avec une endocardite à hémoculture négative (46).

Infection neurologique isolée

Les manifestations neurologiques peuvent être observées dans 3 situations : (1) une rechute neurologique d'une maladie de Whipple classique traitée auparavant, (2) des signes neurologiques associés à une maladie de Whipple classique, (3) une infection neurologique isolée due à *T. whipplei* sans signe histologique d'atteinte digestive. Jusqu'à présent, trente-deux cas de patients présentant une infection neurologique isolée ont été décrits dans la littérature (2,16,19,42,53,56-58,71,73,80,82,83,98,105). Il est à noter que l'infection neurologique isolée atteint plus de femmes et de jeunes patients par rapport à la maladie de Whipple classique (42). Parmi les 32 patients décrits dans la littérature, 19 avaient des signes systémiques tels que de la fièvre (10 patients), amaigrissement (8), douleur articulaire (7), et adénopathies périphériques (2). Les signes neurologiques les plus fréquemment rapportés parmi ces patients sont les

ralentissements psychomoteurs et la paralysie oculaire. Le pronostic de l'infection neurologique isolée à *T. whipplei* est mauvais avec un taux de mortalité de 33.5%. Enfin, les résultats des PCR effectués sur des biopsies de l'intestin grêle étaient positifs chez 4 des 32 patients.

Autres présentations

Des cas d'arthrites (11,29,78), de spondylodiscites (107) et d'uvéites (94) sans aucune évidence d'atteinte digestive clinique et histologique sont aussi décrits. Le diagnostic a pu être effectué chez ces patients grâce à l'analyse du liquide synovial, de biopsie synoviale (11,29,78), de ponction-biopsie de disque intervertébral (107) ou d'humeur aqueuse (94).

Pour en savoir plus :

<http://www.emedicine.com/med/topic2409.htm>

<http://www.uveitis.org/medical/articles/case/whip.html>

Porteurs asymptomatiques

Il existe une controverse concernant la prévalence de *T. whipplei* dans les biopsies duodénales, la salive, les selles et le sang de sujets sains (68). La détection de l'ADN de *T. whipplei* par PCR chez des gens ne présentant pas de maladie de Whipple a été rapportée dans un certain nombre d'études. D'une part, une étude portant sur l'analyse de prélèvements sanguins de 174 donneurs de sang, apparemment sains, a retrouvé un échantillon positif par PCR (74). D'autre part, l'ADN de *T. whipplei* a été aussi mis en évidence dans la salive de 19% (26) et 35% (101) de sujets sains dans 2 autres études. Enfin, l'ADN de *T. whipplei* a aussi été mis en évidence par PCR dans des biopsies duodénales de personnes sans maladie de Whipple (5% des personnes étudiées), dans du liquide gastrique (12%) et des selles (11%) (25,26,60). Cependant, 2 autres équipes (31,65), y compris la notre, n'ont pas mis en évidence l'ADN de *T. whipplei* dans des biopsies duodénales de sujets sains. En réalité, dans de très rares cas, nous avons mis en évidence l'ADN de *T. whipplei* par PCR dans la salive (0,6%) et les selles (4%) de patients avec un diagnostic exclu de maladie de Whipple.

Diagnostic biologique

http://ifr48.free.fr/recherche/domaine_expertise/medecin/diag_whippleM.htm

Echantillons à prélever en cas de suspicion

En cas de suspicion de maladie de Whipple, des prélèvements sanguins, de selles et de salives ainsi que du liquide céphalo-rachidien (LCR) peuvent être facilement obtenus pour effectuer une PCR. Des biopsies de l'intestin grêle doivent être réalisées même en absence de signes digestifs cliniques. En fonction de la symptomatologie, d'autres biopsies peuvent être effectuées pour coloration au PAS, immunohistochimie et PCR. Enfin, si le diagnostic final de maladie de Whipple est réalisé, un échantillon de LCR devra systématiquement être prélevé pour PCR car une atteinte neurologique asymptomatique a été décrite lors de la maladie de Whipple (105). Les prélèvements à effectuer en fonction du contexte clinique sont résumés dans le [tableau 3](#).

Tableau 3 : Prélèvements à effectuer en cas de suspicion de maladie de Whipple en fonction du contexte clinique.

Prélèvements	Whipple classique	Endocardite	Atteinte neurologique
Salive	S *	S	S
Selles	S	S	S
Sang	S	S	S
Liquide céphalo-rachidien	si diagnostic de Whipple certain	si diagnostic de Whipple certain	S
Biopsie duodénale	S	S	S
Valve cardiaque	PN **	2	2
Adénopathie, biopsie synoviale	2 ***	2	2
Biopsie cérébrale	PN	PN	Examen de 3ème intention

S pour systématique ; ** PN pour pas nécessaire ; *** 2 , examen de seconde intention

Diagnostic non spécifique

Bilan sanguin

L'hémogramme peut montrer une anémie microcytaire hypochrome de manière relativement fréquente (24,36). La présence d'une hyperleucocytose est moins fréquemment décrite (24,36). Une thrombocytopénie ou une thrombocytose peuvent être parfois observées (24,36). La présence d'une hyperéosinophilie a été aussi rapportée (34). Le bilan inflammatoire peut montrer une élévation de la vitesse de sédimentation et de la protéine C-réactive (24,36). Le bilan sanguin peut aussi mettre en évidence des signes de malabsorption digestive tels qu'une hypoalbuminémie, une hypocholestérolémie, des carences vitaminiques (B12, D, K et acide folique), un taux diminué de β -carotène et une hypocalcémie (36).

Diagnostic par microscopie électronique

La microscopie électronique permet de détecter la membrane trilamellaire de la paroi cellulaire de *T. whipplei* dans les prélèvements de patients (36). Cette technique nécessite un appareillage spécifique et une certaine expertise dans la détection de *T. whipplei* (figure 2). Elle n'est donc pas réalisée en routine.

Diagnostic histologique par coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS)

Pendant de nombreuses années, la coloration au PAS a été le seul outil diagnostique de la maladie de Whipple. Cette coloration permet de mettre en évidence des inclusions magenta à l'intérieur des macrophages de la lamina propria de biopsies de l'intestin grêle (figure 3A). Plusieurs échantillons de biopsie doivent être analysés, car les lésions sont focales et dispersées. D'autres tissus peuvent être prélevés en fonction des manifestations cliniques et colorés à la coloration au PAS (24,36,68). Pendant longtemps, cette coloration a été considérée comme pathognomonique de la maladie de Whipple. Cependant, il est clairement établi maintenant que ces inclusions PAS-positives ne sont pas spécifiques de cette maladie (36,68). En effet, par exemple, de telles inclusions peuvent être aussi observées chez des patients présentant une infection à *Mycobacterium avium-intracellulare* (36,102). La coloration de Ziehl-Nielsen, qui est positive pour les patients infectés par cette espèce et négative pour ceux atteints de maladie de Whipple. Lors d'infections fongiques, d'infections à

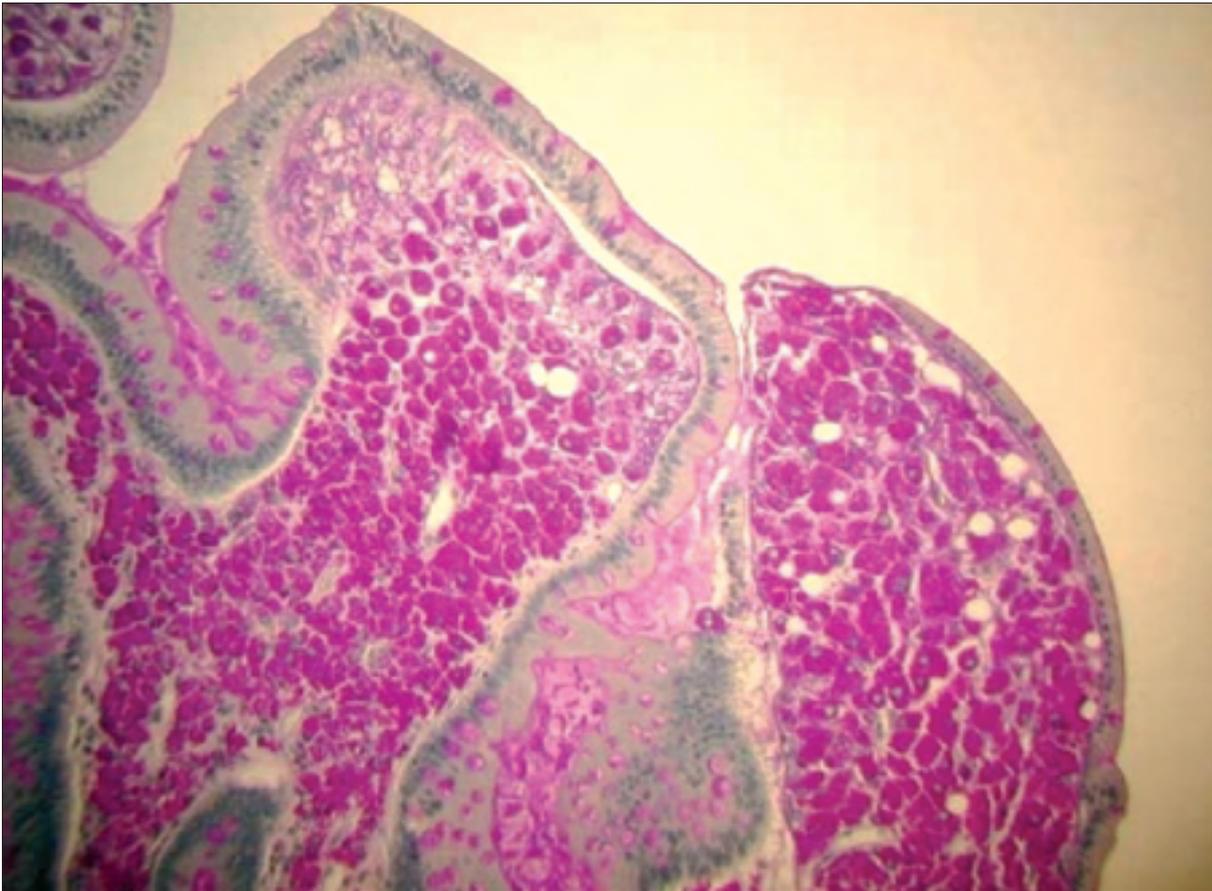


photo : Lepidi H.

Figure 3A : Biopsie duodénale avec des macrophages PAS-positif dans la lamina propria. Les zones positives sont celles colorées en magenta (coloration au PAS, grossissement X100).

Rhodococcus equi, *Bacillus cereus* ou encore *Corynebacterium* spp., des faux-positifs à la coloration au PAS peuvent être observés (19,47,50,72,106). Les biopsies de l'intestin grêle de patients souffrant de melanosisme coli, d'histiocytose ou de macroglobulinémie, ainsi que les biopsies coliques de patients atteints de maladie de Crohn peuvent également être confondues, dans de rares cas, avec celles d'une maladie de Whipple (19,68). La présence de granulomes épithélioïdes géantocellulaires non caséux (PAS-négatives dans 40% des cas) peuvent être observés dans les tissus lymphatiques, le tractus gastro-intestinal, la moelle osseuse, le rein, la synovie, le foie et/ou le poumon (24,36,68).

Diagnostic spécifique

Diagnostic direct par immunohistochimie

L'immunohistochimie a récemment rejoint l'arsenal des outils diagnostiques de la maladie de Whipple (55). En effet, grâce à l'obtention de la première souche de *T. whipplei*, des anticorps dirigés contre cette bactérie ont pu être synthétisés à partir de souris et lapin. Ces anticorps dirigés spécifiquement contre *T. whipplei* permettent de détecter la bactérie dans différents types de tissus, l'humeur aqueuse de l'œil ainsi que les monocytes sanguins (figures 3B et 3C) (6,21,23,55,85,90). L'avantage de cette technique est qu'elle permet de visualiser directement les bactéries dans les prélèvements de patients. Elle offre, de plus, une sensibilité et une spécificité supérieures à la coloration au PAS. Enfin, cette technique peut être utilisée rétrospectivement sur des échantillons fixés par du formol ou de l'alcool (6,23). La principale limite de cet outil diagnostique est la non commercialisation de ces anticorps.

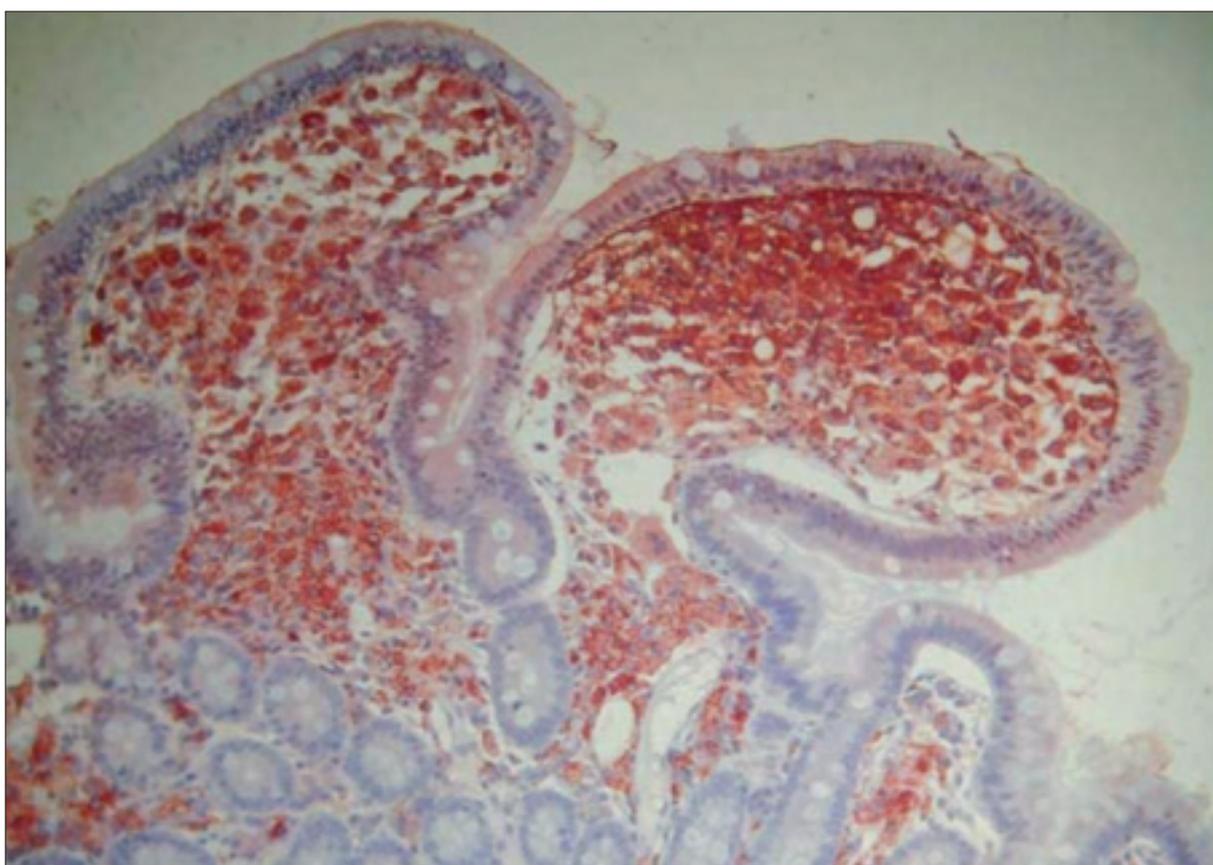


photo : Lepidif H.

Figure 3B : Mise en évidence de *T. whipplei* par immunohistochimie dans une biopsie duodénale. Les zones positives sont celles colorées en marron (anticorps polyclonal de lapin anti-*T. whipplei* utilisé à la dilution de 1:2000, grossissement X100).

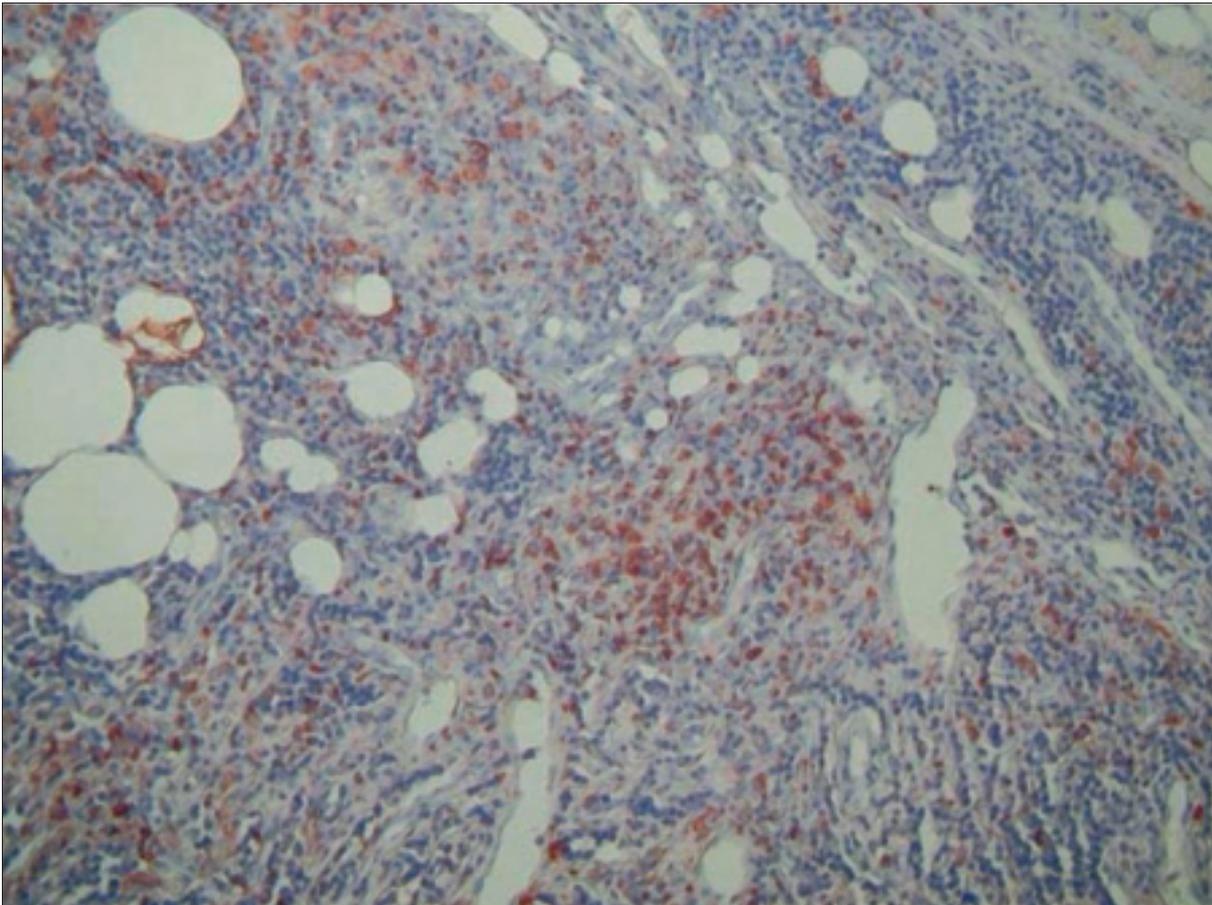


photo : Lepidi H.

Figure 3C : Mise en évidence de *T. whipplei* par immunohistochimie dans un ganglion. Les zones positives sont celles colorées en marron (anticorps polyclonal de lapin anti-*T. whipplei* utilisé à la dilution de 1:2000, grossissement x 100).

Diagnostic direct par biologie moléculaire

T. whipplei peut être aussi mis en évidence par PCR sur des échantillons provenant d'une grande variété de tissus et de liquides de ponction (35). Comme pour tous les tests basés sur la PCR, il est capital de vérifier l'absence de contamination des échantillons d'ADN et d'inclure des contrôles positif et négatif afin de valider le test. Au début, des tests PCR ciblant la séquence de l'ARN 16S ribosomique et la région intergénique 16S-23S de *T. whipplei* étaient utilisés (24,91).

Plus récemment, une PCR quantitative en temps réel ciblant cette région intergénique a été développée (31). La PCR quantitative en temps réel offre divers avantages dont la réduction du temps de l'analyse ainsi que la diminution des risques de contamination. En se basant sur l'analyse du génome, une nouvelle PCR quantitative en temps réel ciblant des séquences répétées de *T. whipplei* a été mise au point.

Pour un choix d'amorces : <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Whipple.html>

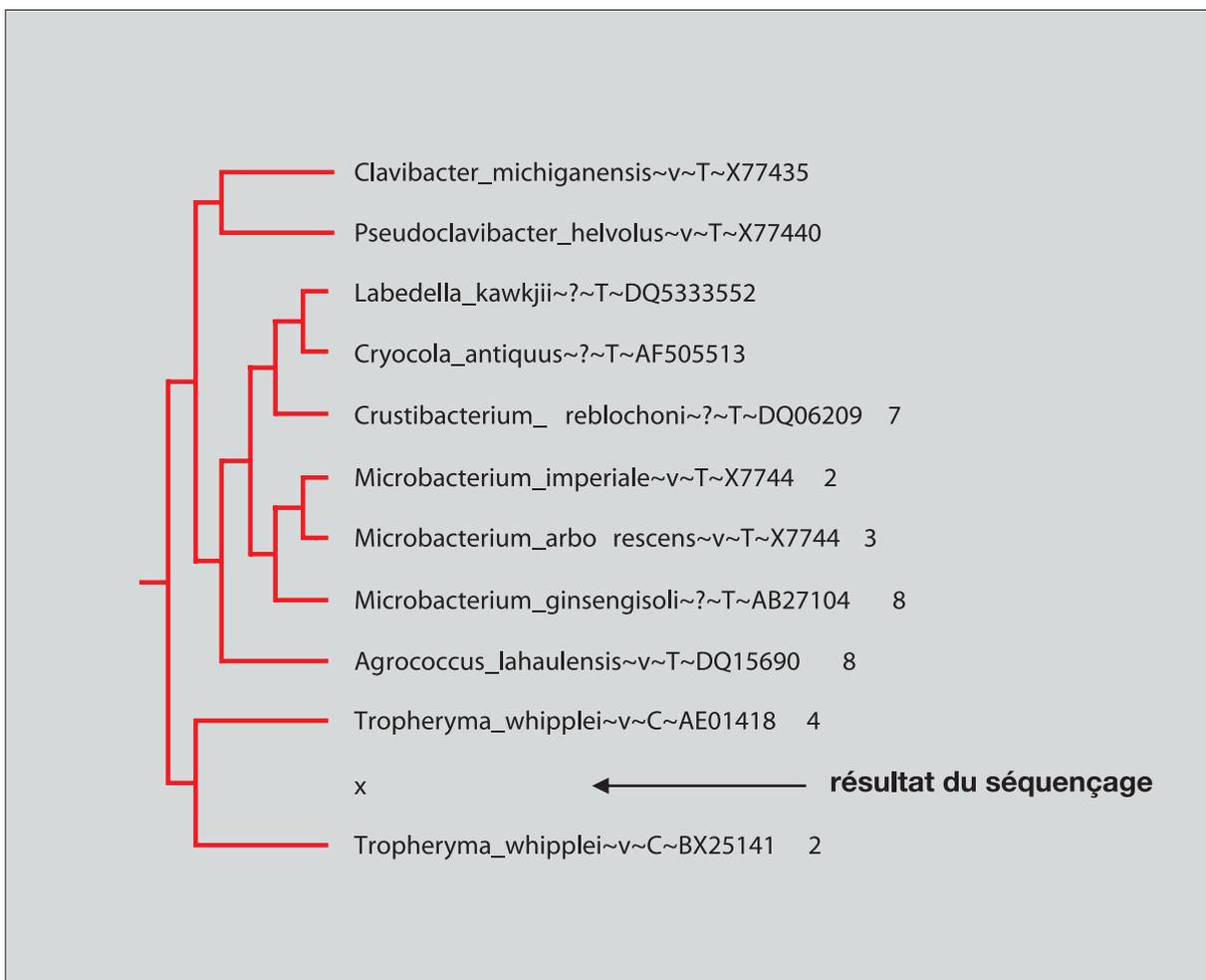


Figure 4 : Exemple d'identification moléculaire après séquençage de l'ADNr 16S et analyse sur BIBI (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>)

Cette dernière a permis d'accroître la sensibilité de la PCR sans en altérer sa spécificité (32). Quand un produit d'amplification est détecté, l'identification de *T. whipplei* doit être confirmée soit par séquençage (figure 4), soit par hybridation avec des sondes d'hybridation fluorescente. Les discordances entre laboratoires observées lors des analyses effectuées par PCR laissent penser que tous les résultats obtenus avec des PCR "fait-maison" doivent être interprétés avec attention. En effet, le nombre important de PCR positives observées parmi les sujets sans maladie de Whipple a été principalement obtenu grâce à des techniques de PCR nichées ou semi-nichées avec un risque important de contamination (3,4,25,26,60). Cependant, il est aussi important de souligner qu'il ne faut pas ignorer un test PCR positif comme le laisse suggérer la mort d'un patient chez qui une PCR était positive sur un liquide de ponction articulaire mais pour qui les biopsies duodénales étaient négatives par la coloration au PAS (76).

Devant les résultats de la biopsie duodénale, le diagnostic de la maladie de Whipple a été exclu chez ce patient, mais l'autopsie a permis de confirmer plus tard le diagnostic de maladie de Whipple.

Diagnostic direct par culture

La culture de *T. whipplei* à partir de différents types d'échantillons peut être réalisée par culture cellulaire (figure 5) et par culture sur milieu axénique supplémenté en acides aminés (21,30,52,64,85,90). Toutefois, ces techniques ne sont pas accessibles en routine.

Pour en savoir plus :

<http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/contents/v188n6.html>

<http://www.WhipplesDisease.net/Bacterium/Growth/growth.html>

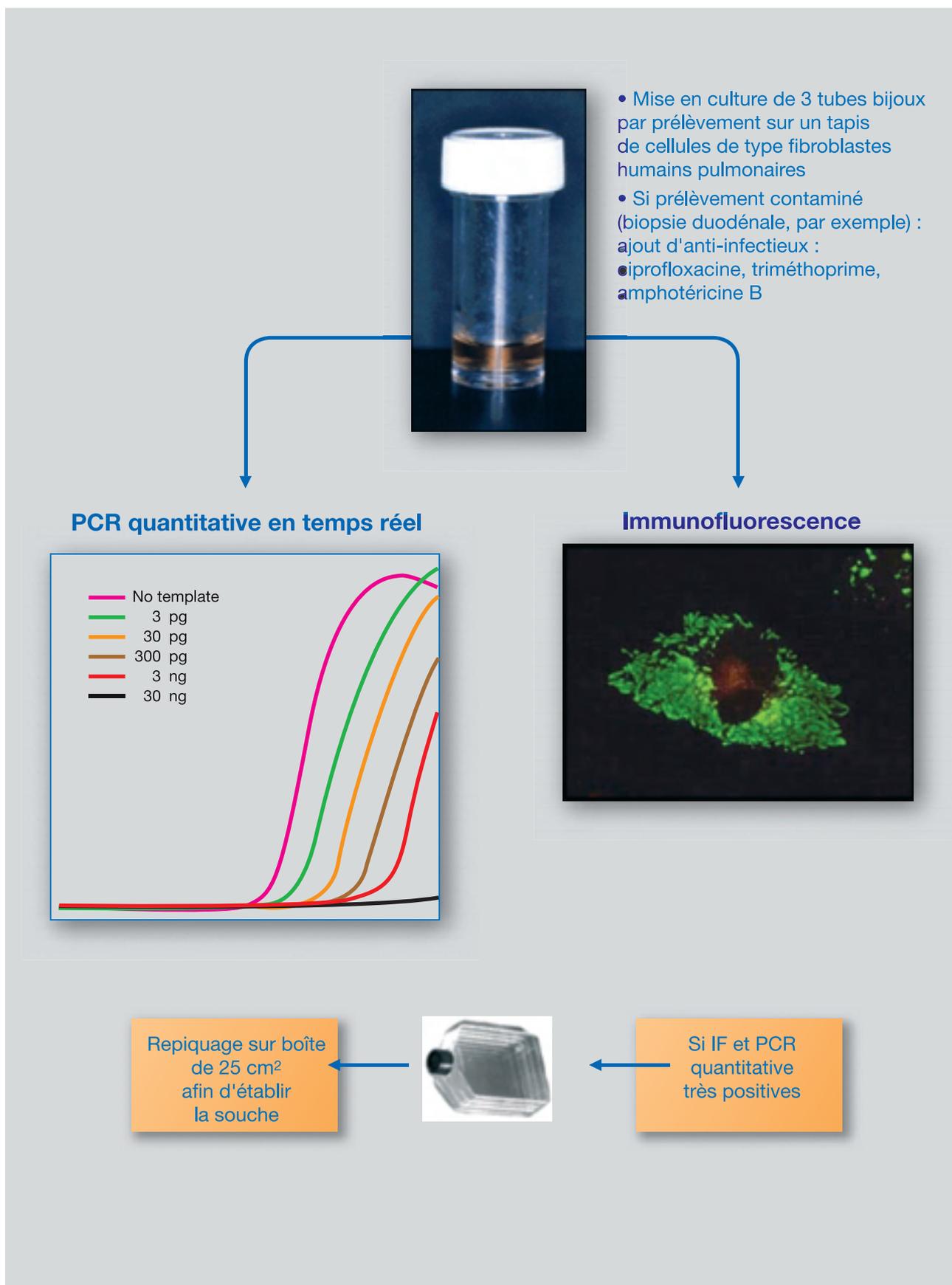


Figure 5 : Stratégie de culture cellulaire de *Tropheryma whippelii* à partir de prélèvements de patients.

Diagnostic indirect par sérologie

Le diagnostic sérologique reste pour le moment au stade expérimental. En effet, les premiers travaux réalisés montrent une faible spécificité des techniques (75,88). Des travaux récents ont permis de mettre en évidence de nouveaux candidats antigéniques potentiels (51).

Notre stratégie pour diagnostiquer la maladie de Whipple, à partir des résultats de la coloration au PAS et la PCR, techniques devant être effectuées systématiquement en parallèle, est montré dans la [figure 6](#).

Notes de la figure 6

1 : Si la coloration au PAS de la biopsie de l'intestin grêle est positive, mais pas la PCR (chez un patient n'ayant pas reçu d'antibiotique), il est impératif de confirmer le diagnostic par une autre approche. Dans cet objectif, il peut être utile d'effectuer une immunohistochimie avec un anticorps spécifiquement dirigé contre *T. whipplei*. Si l'immunohistochimie est positive, un diagnostic certain de maladie de Whipple est établi. Si l'examen immunohistochimique n'est pas réalisable, il est nécessaire d'analyser d'autres prélèvements qui seront choisis en fonction de la présentation clinique du patient.

2 : Si la PCR sur la biopsie de l'intestin grêle est positive mais pas la coloration au PAS, il est nécessaire de confirmer le résultat sur le même échantillon en utilisant une autre cible moléculaire pour la PCR ou d'analyser d'autres prélèvements qui seront choisis en fonction de la présentation clinique du patient.

3 : Quand un diagnostic définitif de maladie de Whipple est établi, et même en absence de signes neurologiques, le liquide céphalo-rachidien doit être systématiquement analysé par PCR.

4 : Dans ce cas, il faut songer à tester des échantillons tels que la salive, les selles, et/ou le sang. La présence d'une PCR positive à partir d'un de ces échantillons en association avec un autre type de prélèvement positif peut être utile pour confirmer le diagnostic de maladie de Whipple.

Aspects thérapeutiques

La maladie de Whipple était fatale avant l'utilisation des antibiotiques. A l'heure actuelle, les recommandations publiées dans la littérature ne reposent toujours pas sur des essais thérapeutiques ou des données concernant la sensibilité aux antibiotiques de la bactérie. Les tétracyclines ont longtemps été prescrites en première intention, mais la fréquence des récurrences, notamment neurologiques, après ce régime antibiotique étaient élevés (28 % en moyenne) (38,48,104). Ainsi, la prise en charge thérapeutique de la maladie de Whipple a été ré-orientée vers des antibiotiques capables de traverser la barrière hémato-méningée. Actuellement, le traitement recommandé est l'administration orale de triméthoprim (160 mg) et sulfaméthoxazole (800 mg), 2 fois par jour pendant 1 à 2 ans, précédée habituellement de l'administration parentérale de streptomycine (1 g par jour) associé à la pénicilline G (1.2 millions unités par jour) ou de ceftriaxone (2 g par jour) pendant 2 semaines. Des échecs thérapeutiques, ainsi que des récurrences, ont été aussi observés avec cette approche thérapeutique (5,37,38,40,48,97,104). L'interféron gamma a été proposé dans le traitement des récurrences, avec un succès d'au moins 1 an après son arrêt (96).

Les sensibilités aux antibiotiques de *T. whipplei* ont été testées à la fois en culture cellulaire et en milieu axénique (9,10). Ces travaux montrent que la doxycycline, le sulfaméthoxazole, la pénicilline G, l'amoxicilline, les macrolides, les kétolides, les aminoglycosides, la rifampicine, la teicoplanine, et le chloramphénicol sont efficaces (9,10). La vancomycine est active en milieu axénique, mais elle l'est un peu moins en culture cellulaire avec une CMI de 10 mg/L. Les céphalosporines (y compris la ceftriaxone), la colimycine et les fluoroquinolones ne sont pas actives en culture cellulaire. Toutefois, la ceftriaxone est active en culture axénique. Des variabilités de sensibilité à l'imipénème sont observées. Comme prédit par l'analyse du génome, le triméthoprim n'est pas efficace in vitro (9,12). En effet, la bactérie ne possède pas de séquence codant pour la dihydrofolate réductase, ni même pour des homologues proches ou distants, or le triméthoprim agit par inhibition compétitive de cette enzyme (12).

Il a été récemment montré que l'acidification des vacuoles macrophagiques jouait un rôle critique dans la survie de *T. whipplei* dans les phagosomes. En effet, les agents, qui augmentent le pH intravacuolaire, diminuent la viabilité des bactéries (43). En se basant sur cette observation, l'efficacité de la doxycycline couplée à un agent alcalinisant, l'hydroxychloroquine a été testé in vitro. Cette association s'est montrée efficace et elle

est jusqu'à présent la seule qui soit bactéricide in vitro vis-à-vis de *T. whipplei* (10,43). Cette approche nécessite maintenant d'être confirmée en clinique.

En se basant sur ces travaux précédents (43), nous suggérons donc l'utilisation d'un régime de doxycycline (200 mg par jour) et d'hydroxychloroquine (200 mg 3 fois par jour) pour éradiquer les organismes intracellulaires dans la maladie de Whipple sans atteinte neurologique. Cette absence d'atteinte neurologique doit être déterminée par une PCR négative sur le LCR et/ou l'absence des signes neurologiques. En cas d'atteinte neurologique, nous suggérons d'ajouter du sulfaméthoxazole-triméthoprime à forte posologie ou de la sulfadiazine au régime antibiotique détaillé ci-dessus. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de marqueur valable pour déterminer la durée du traitement de la maladie de Whipple. Par analogie à d'autres infections chroniques (70,99), il semble raisonnable d'utiliser ce régime pour au moins 12 à 18 mois. Des essais cliniques sont nécessaires maintenant pour confirmer notre nouvelle approche thérapeutique. En conclusion, il n'existe pas de techniques pour effectuer un antibiogramme en routine.

Références

1. Aiouaz, H., M. Celard, M. Puget, F. Vandenesch, A. Mercusot, F. Fenollar, F. Delahaye, J. F. Obadia, J. Tebib, and H. Rousset. 2005. Whipple's disease endocarditis: report of 5 cases and review of the literature. *Rev Med Interne* 26:784-790.
2. Akar, Z., N. Tanriover, S. Tuzgen, B. Canbaz, H. Erman, B. Oz, and C. Kaday. 2002. Intracerebral Whipple disease: unusual location and bone destruction. *J Neurosurg* 97:988-991.
3. Amsler, L., P. Bauernfeind, C. Nigg, R. C. Maibach, R. Steffen, and M. Altwegg. 2003. Prevalence of *Tropheryma whipplei* DNA in patients with various gastrointestinal diseases and in healthy controls. *Infection* 31:81-85.
4. Apfalter, P., U. Reischl, and M. R. Hammerschlag. 2005. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results ? *J.Clin Microbiol.* 43:5835-5841.
5. Bai, J. C., E. E. Crosetti, E. C. Maurino, C. A. Martinez, A. Sambuelli, and L. A. Boerr. 1991. Short-term antibiotic treatment in Whipple's disease. *J Clin Gastroenterol* 13:303-307.
6. Baisden, B. L., H. Lepidi, D. Raoult, P. Argani, J. H. Yardley, and J. S. Dumler. 2002. Diagnosis of Whipple disease by immunohistochemical analysis. A sensitive and specific method for the detection of *Tropheryma whipplei* (the Whipple Bacillus) in paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* 118:742-748.
7. Bentley, S. D., M. Maiwald, L. D. Murphy, M. J. Pallen, C. A. Yeats, L. G. Dover, Nobertczak, H.T., G. S. Besra, M. A. Quail, D. E. Harris, A. von Herbay, A. Goble, S. Rutter, R. Squares, S. Squares, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Relman. 2003. Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*. *Lancet* 361:637-644.
8. Black-Schaffer, B. 1949. Tinctorial demonstration of a glycoprotein in Whipple's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 72:225-227.
9. Boulos, A., J. M. Rolain, M. N. Mallet, and D. Raoult. 2005. Molecular evaluation of antibiotic susceptibility of *Tropheryma whipplei* in axenic medium. *J Antimicrob Chemother* 55:178-181.
10. Boulos, A., J. M. Rolain, and D. Raoult. 2004. Antibiotic susceptibility of *Tropheryma whipplei* in MRC5 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:747-752.
11. Bruhlmann, P., B. A. Michel, and M. Altwegg. 2000. Diagnosis and therapy monitoring of Whipple's arthritis by polymerase chain reaction. *Rheumatology.(Oxford)* 39:1427-1428.
12. Cannon, W. R. 2003. Whipple's disease, genomics and drug therapy. *Lancet* 361:1916.
13. Cheers, W. C. Jr. and C. T. Ashworth. 1961. Electron microscopy study of the intestinal mucosa in Whipple's disease-demonstration of encapsulated bacilliform bodies in the lesion. *Gastroenterology* 41:129-138.

14. Chears, W. C. Jr., M. D. Hargrove, J. V. Verner, A. G. Smith, and J. M. Ruffin. 1961. Whipple's disease. A review of twelve patients from one service. *Am J Med* 30:226-234.
15. Cohen, A., E. Schimmel, P. Holt, and K. Isselbacher. 1960. Ultrastructural abnormalities in Whipple's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 105:411-414.
16. Coria, F., N. Cuadrado, C. Velasco, J. J. Jiménez Carmena, M. I. Jiménez, F. J. Mena, and J. M. Acebes. 2000. Whipple's disease with isolated central nervous system symptomatology diagnosed by molecular identification of *Tropheryma whippelii* in peripheral blood. *Neurologia* 15:173-176.
17. Dearment, M. C., T. A. Woodward, D. M. Menke, P. W. Brazis, L. W. Bancroft, and S. T. Persellin. 2003. Whipple's disease with destructive arthritis, abdominal lymphadenopathy, and central nervous system involvement. *J Rheumatol* 30:1347-1350.
18. Desnues, B., D. Raoult, and J. L. Mege. 2005. IL-16 is critical for *Tropheryma whippelii* replication in Whipple's disease. *J Immunol*. 175:4575-4582.
19. Dobbins, W. O. III. Whipple's disease. Thomas Books. 1987. Springfield, IL.
20. Dobbins, W. O. III. and J. M. Ruffin. 1967. A light- and electron-microscopic study of bacterial invasion in Whipple's disease. *Am J Pathol* 51:225-242.
21. Drancourt, M., D. Raoult, H. Lepidi, F. Fenollar, M. L. Birg, B. Bodahi, P. L. Hoang, and J. D. Lelievre. 2003. Culture of *Tropheryma whippelii* from the vitreous fluid of a patient presenting with unilateral uveitis. *Ann Intern Med* 139:1046-1047.
22. Dreier, J., F. Szabados, A. von Herbay, T. Kroger, and K. Kleesiek. 2004. *Tropheryma whippelii* infection of an acellular porcine heart valve bioprosthesis in a patient who did not have intestinal Whipple's disease. *J Clin Microbiol*. 42:4487-4493.
23. Dumler, J. S., B. L. Baisden, J. H. Yardley, and D. Raoult. 2003. Immunodetection of *Tropheryma whippelii* in intestinal tissues of Dr Whipple's 1907 patient. *N Engl J Med* 348:1411-1412.
24. Dutly, F. and M. Altwegg. 2001. Whipple's disease and "*Tropheryma whippelii*". *Clin Microbiol Rev* 14:561-583.
25. Dutly, F., H. P. Hinrikson, T. Seidel, S. Morgenegg, M. Altwegg, and P. Bauerfeind. 2000. *Tropheryma whippelii* DNA in saliva of patients without Whipple's disease. *Infection* 28:219-222.
26. Ehrbar, H. U., P. Bauerfeind, F. Dutly, H. R. Koelz, and M. Altwegg. 1999. PCR-positive tests for *Tropheryma whippelii* in patients without Whipple's disease. *Lancet* 353:2214.
27. Elssner, A., A. I. Doseff, M. Duncan, M. Kotur, and M. D. Wewers. 2004. IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis. *J Immunol* 172:7721-7725.
28. Enzinger, F. M. and E. B. Helwig. 1963. Whipple's disease: a review of the literature and report fifteen patients. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 336:238-269.
29. Farr, M., C. A. Hollywell, C. J. Morris, G. R. Struthers, P. A. Bacon, and K. W. Walton. 1984. Whipple's disease diagnosed at hip arthroplasty. *Ann Rheum Dis* 43:526-529.

30. Fenollar, F., M. L. Birg, V. Gauduchon, and D. Raoult. 2003. Culture of *Tropheryma whippelii* from human samples: A 3-year experience (1999 to 2002). J Clin Microbiol 41:3816-3822.
31. Fenollar, F., P. E. Fournier, D. Raoult, R. Gerolami, H. Lepidi, and C. Poyart. 2002. Quantitative detection of *Tropheryma whippelii* DNA by real-time PCR. J Clin Microbiol 40:1119-1120.
32. Fenollar, F., P. E. Fournier, C. Robert, and D. Raoult. 2004. Use of genome selected repeated sequences increases the sensitivity of PCR detection of *Tropheryma whippelii*. J Clin Microbiol 42:401-403.
33. Fenollar, F., H. Lepidi, R. Gerolami, M. Drancourt, and D. Raoult. 2003. Whipple disease associated with giardiasis. J Infect Dis 188:828-834.
34. Fenollar, F., H. Lepidi, and D. Raoult. 2001. Whipple's endocarditis: Review of the literature and comparisons with Q fever, *Bartonella* infection, and blood culture-positive endocarditis. Clin Infect Dis 33:1309-1316.
35. Fenollar, F. and D. Raoult. 2001. Molecular techniques in Whipple's disease. Expert Rev Mol Diagn 1:299-309.
36. Fenollar, F. and D. Raoult. 2001. Whipple's disease. Clin Diagn Lab Immunol 8:1-8.
37. Feurle, G. E. and T. Marth. 1994. An evaluation of antimicrobial treatment for Whipple's disease-tetracycline versus trimethoprim-sulfamethoxazole. Dig Dis Sci 39:1642-1648.
38. Fleming, J. L., R. H. Wiesner, and R. G. Shorter. 1988. Whipple's disease: clinical, biochemical, and histopathologic features and assessment of treatment in 29 patients. Mayo Clin Proc 63:539-551.
39. Frésard, A., C. Guglielminotti, P. Berthelot, A. Ros, F. Farizon, C. Dauga, H. Rousset, and F. Lucht. 1996. Prosthetic joint infection caused by *Tropheryma whippelii* (Whipple's bacillus). Clin Infect Dis 22:575-576.
40. Geboes, K., N. Ectors, H. P. Heidbuchel, P. J. Rutgeerts, V. J. Desmet, and G. R. Vantrappen. 1992. Whipple's disease: the value of upper gastrointestinal endoscopy for the diagnosis and follow-up. Acta Gastroenterol Belg 55:209-219.
41. Geissdorfer, W., I. Wittmann, G. Seitz, R. Cesnjevar, M. Rollinghoff, C. Schoerner, and C. Bogdan. 2001. A case of aortic valve disease associated with *Tropheryma whippelii* infection in the absence of other signs of Whipple's disease. Infection 29:44-47.
42. Gerard, A., F. Sarrot-Reynauld, E. Liozon, P. Cathébras, G. Besson, C. Robin, A. Vighetto, J. F. Mosnier, I. Durieu, D. Vital-Durand, and H. Rousset. 2002. Neurologic presentation of Whipple disease: report of 12 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 81:443-457.
43. Ghigo, E., C. Capo, M. Aurouze, C. H. Tung, J. P. Gorvel, D. Raoult, and J. L. Mege. 2002. Survival of *Tropheryma whippelii*, the agent of Whipple's disease, requires phagosome acidification. Infect Immun 70:1501-1506.

44. Goldenberger, D., A. Kunzli, P. Vogt, R. Zbinden, and M. Altwegg. 1997. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 35:2733-2739.
45. Gross, M., C. Jung, and W. G. Zoller. 1999. Detection of *Tropheryma whippelii* (Whipple's disease) in faeces. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31:70-72.
46. Gubler, J. G., M. Kuster, F. Dutly, F. Bannwart, M. Krause, H. P. Vögelin, G. Garzoli, and M. Altwegg. 1999. Whipple endocarditis without overt gastrointestinal disease: Report of four cases. *Ann Intern Med* 131:112-116.
47. Hamrock, D, Azmi, FH, O'Donnell, E, Gunning, WT, and A. Zaher. Infection by *Rhodococcus equi* in a patient with AIDS: histological appearance mimicking Whipple's disease and *Mycobacterium avium intracellulare* infection. *J Clin Pathol* 52, 68-71. 1999.
48. Keinath, R. D., D. E. Merrell, R. Vlietstra, and W. O. III. Dobbins. 1985. Antibiotic treatment and relapse in Whipple's disease. Long term follow-up of 88 patients. *Gastroenterology* 88:1867-1873.
49. Kelly, J. J. and B. B. Weisiger. 1963. The arthritis of Whipple's disease. *Arthritis Rheum* 6:615-632.
50. Khavari, P. A., Bolognia, J. L., Eisen, R., Edberg, S. C., Grimshaw, S. C., P. E. and Shapiro. 1991. Periodic acid-Schiff positive organisms in primary cutaneous *Bacillus cereus* infection-case report and an investigation of periodic acid-Schiff staining properties of bacteria. *Arch Dermatol* 127: 543-546.
51. Kowalczywska, M., Fenollar, F., Lafitte, D., and D. Raoult. 2006. Identification of candidate antigen in Whipple's disease using a serological proteomic approach. *Proteomics*. 6: 3294-3305.
52. La Scola, B., F. Fenollar, P. E. Fournier, M. Altwegg, M. N. Mallet, and D. Raoult. 2001. Description of *Tropheryma whippelii* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1471-1479.
53. Lee, A. G. 2002. Whipple disease with supranuclear ophtalmoplegia diagnosed by polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid. *J Neuroophthalmol* 22:18-21.
54. Lepidi, H., F. Fenollar, J. S. Dumler, V. Gauduchon, L. Chalabreysse, A. Bammert, M. F. Bonzi, F. Thivolet-Bejui, F. Vandenesch, and D. Raoult. 2004. Cardiac valves in patients with Whipple endocarditis: microbiological, molecular, quantitative histologic, and immunohistochemical studies of 5 patients. *J Infect Dis* 190:935-945.
55. Lepidi, H., F. Fenollar, R. Gerolami, J. L. Mege, M. F. Bonzi, M. Chappuis, J. Sahel, and D. Raoult. 2003. Whipple's disease: immunospecific and quantitative immunohistochemical study of intestinal biopsy specimens. *Human Pathol* 34:589-596.
56. Lohr, M., W. Stenzel, G. Plum, W. P. Gross, M. Deckert, and N. Klug. 2004. Whipple disease confined to the central nervous system presenting as a solitary frontal tumor. Case report. *J Neurosurg* 101:336-339.

57. Louis, E. D., T. Lynch, P. Kaufmann, S. Fahn, and J. Odel. 1996. Diagnostic guidelines in central nervous system Whipple's disease. *Ann Neurol* 40:561-568.
58. Lynch, T., J. Odel, D. N. Fredericks, E. D. Louis, S. Forman, H. Rotterdam, S. Fahn, and D. A. Relman. 1997. Polymerase chain reaction-based detection of *Tropheryma whippelii* in central nervous system Whipple's disease. *Ann Neurol* 42:120-124.
59. Mahnel, R., A. Kalt, S. Ring, A. Stallmach, W. Strober, and T. Marth. 2005. Immunosuppressive therapy in Whipple's disease patients is associated with the appearance of gastrointestinal manifestations. *Am J Gastroenterol*. 100:1167-1173.
60. Maibach, R. C., F. Dutly, and M. Altwegg. 2002. Detection of *Tropheryma whippelii* DNA in feces by PCR using a target capture method. *J Clin Microbiol* 40:2466-2471.
61. Maiwald, M., H. J. Ditton, A. von Herbay, F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1996. Reassessment of the phylogenetic position of the bacterium associated with Whipple's disease and determination of the 16S-23S ribosomal intergenic spacer sequence. *Int J Syst Bacteriol* 46:1078-1082.
62. Maiwald, M. and D. A. Relman. 2001. Whipple's disease and *Tropheryma whippelii*: secrets slowly revealed. *Clin Infect Dis* 32:457-463.
63. Maiwald, M., F. Schuhmacher, H. J. Ditton, and A. von Herbay. 1998. Environmental occurrence of the Whipple's disease bacterium (*Tropheryma whippelii*). *Appl Environ Microbiol* 64:760-762.
64. Maiwald, M., A. von Herbay, D. N. Fredricks, C. C. Ouverney, J. C. Kosek, and D. A. Relman. 2003. Cultivation of *Tropheryma whippelii* from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 188:801-808.
65. Maiwald, M., A. von Herbay, D. H. Persing, P. P. Mitchell, M. F. Abdelmalek, J. N. Thorvilson, D. N. Fredricks, and D. A. Relman. 2001. *Tropheryma whippelii* DNA is rare in the intestinal mucosa of patients without other evidence of Whipple disease. *Ann Intern Med* 134:115-119.
66. Maizel, H., J. M. Ruffin, and W. O. III. Dobbins. 1993. Whipple's disease: a review of 19 patients from one hospital and a review of the literature since 1950. *Medicine (Baltimore)* 72:343-355.
67. Marth, T., M. Neurath, B. Cuccherini, and W. Strober. 1997. Defects of monocyte interleukin 12 production and humoral immunity in Whipple's disease. *Gastroenterology* 113:442-448.
68. Marth, T. and D. Raoult. 2003. Whipple's disease. *Lancet* 361:239-246.
69. Marth, T. and W. Strober. 1996. Whipple's disease. *Semin Gastrointest Dis* 7:41-48.
70. Maurin, M. and D. Raoult. 1999. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12:518-553.
71. Messori, A., P. Di Bella, G. Polonara, F. Logullo, P. Pauri, R. Haghhighipour, and H. Salvolini. 2001. An unusual spinal presentation of Whipple disease. *AJNR* 22:1004-1008.
72. Misbah, S. A. and N. P. Mapstone. 2000. Whipple's disease revisited. *J Clin Pathol* 53:750-755.
73. Misbah, S. A., B. Ozols, A. Franks, and N. Mapstone. 1997. Whipple's disease without malabsorption: new atypical features. *QJM* 90:765-772.

74. Misbah, S. A., D. Stirzaker, B. Ozols, A. Franks, and N. P. Mapstone. 1999. Anonymous survey of blood donors by polymerase chain reaction for *Tropheryma whippelii*. QJM 92:61.
75. Morgenegg, S., F. Dutly, and M. Altwegg. 2000. Cloning and sequencing of a part of the heat shock protein 65 (hsp65) gene of *Tropheryma whippelii* and its use for the detection of *Tropheryma whippelii* in clinical specimens by PCR. J Clin Microbiol 38:2248-2253.
76. Müller, S. A., P. Vogt, M. Altwegg, and J. D. Seebach. 2005. Deadly carousel or difficult interpretation of new diagnostic tools for Whipple's disease: case report and review of the literature. Infection 33:39-42.
77. Naegeli, B., F. Bannwart, and O. Bertel. 2000. An uncommon cause of recurrent strokes: *Tropheryma whippelii* endocarditis. Stroke 31:2002-2003.
78. O'Duffy, J. D., W. L. Griffing, C. Y. Li, M. F. Abdelmalek, and D. H. Persing. 1999. Whipple's arthritis: direct detection of *Tropheryma whippelii* in synovial fluid and tissue. Arthritis Rheum 42:812-817.
79. Oliver-Pascual, E., J. Galan, A. Oliver-Pascual, and E. Castillo. 1947. Un caso de lipodistrofia intestinal con lesiones ganglionares mesentericas de granulomatosis lipofagica (Enfermedad de Whipple). Rev Esp Ap Dig Nutr 6:213-226.
80. Papadopoulou, M., M. Rentzos, C. Nicolaou, V. Ioannidou, A. Ioannidis, and S. Chatzipanagiotou. 2003. Cerebral Whipple's disease diagnosed using PCR: the first case reported from Greece. Mol Diagn 7:209-211.
81. Paulley, J. W. 1952. A case of Whipple's disease (intestinal lipodystrophy). Gastroenterology 22:128-133.
82. Peters, G., D. G. du Plessis, and P. R. Humphrey. 2002. Cerebral Whipple's disease with a stroke-like presentation and cerebrovascular pathology. J Neurol Neurosurg Psychiatry 73:336-339.
83. Posada, I. J., A. Ferreira-Sieiro, E. Lopez-Valdes, A. Cabello, and F. Bermejo-Pareja. 2004. Whipple's disease confined to the brain. A clinical case with pathological confirmation at necropsy. Rev Neurol 38:196-198.
84. Puéchal, X. 2001. Whipple's disease and arthritis. Curr Opin Rheumatol 13:74-79.
85. Raoult, D., M. Birg, B. La Scola, P. Fournier, M. Enea, H. Lepidi, V. Roux, J. Piette, F. Vandenesch, D. Vital-Durand, and T. Marrie. 2000. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. N Engl J Med 342:620-625.
86. Raoult, D., H. Ogata, S. Audic, C. Robert, K. Suhre, M. Drancourt, and J. Claverie. 2003. *Tropheryma whippelii* Twist: a human pathogenic Actinobacteria with a reduced genome. Genome Research 13:1800-1809.
87. Raoult, D. 1999. Afebrile blood culture-negative endocarditis. Ann Intern Med 131:144-146.
88. Raoult, D., M. L. Birg, B. La Scola, P. E. Fournier, M. Enea, H. Lepidi, V. Roux, J. C. Piette, F. Vandenesch, D. Vital-Durand, and T. J. Marrie. 2000. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. N Engl J Med 342:620-625.

89. Raoult, D., Fenollar, F., and Birg, M. L. 2006. Culture of *T. whipplei* from the stool of a patient with Whipple's disease. *N Engl J Med*. 355:1503-1505.
90. Raoult, D., B. La Scola, P. Lecocq, H. Lepidi, and P. E. Fournier. 2001. Culture and immunological detection of *Tropheryma whippelii* from the duodenum of a patient with Whipple disease. *JAMA* 285:1039-1043.
91. Relman, D. A., T. M. Schmidt, R. P. MacDermott, and S. Falkow. 1992. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 327:293-301.
92. Renesto, P., N. Crapoulet, H. Ogata, B. La Scola, G. Vestris, J. M. Claverie, and D. Raoult. 2003. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whipplei*. *Lancet* 362:447-449.
93. Richardson, D. C., L. L. Burrows, B. Korithoski, I. E. Salit, J. Butany, T. E. David, and J. M. Conly. 2003. *Tropheryma whippelii* as a cause of afebrile culture-negative endocarditis: the evolving spectrum of Whipple's disease. *J Infect* 47:170-173.
94. Rickman, L. S., W. R. Freeman, W. R. Green, S. T. Feldman, J. Sullivan, V. Russack, and D. A. Relman. 1995. Uveitis caused by *Tropheryma whippelii* (Whipple's bacillus). *N Engl J Med* 332:363-366.
95. Schneider, T., M. Salamon-Looijen, A. von Herbay, H. Schwerdt, S. Weg-Remers, A. Stallmach, and M. Zeitz. 1998. Whipple's disease with aortic regurgitation requiring aortic valve replacement. *Infection* 26:178-180.
96. Schneider, T., A. Stallmach, A. von Herbay, T. Marth, W. Strober, and M. Zeitz. 1998. Treatment of refractory Whipple disease with interferon-g. *Ann Intern Med* 129:875-877.
97. Schnider, P. J., E. C. Reisinger, W. Gerschlager, C. Muller, T. Berger, G. J. Krejs, and E. Auff. 1996. Long-term follow-up in cerebral Whipple's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8:899-903.
98. Schröter, A., J. Brinkhoff, T. Günthner-Lensfeld, S. Suerbaum, K. Reiners, H. Messmann, and M. Naumann. 2005. Whipple's disease presenting as an isolated lesion of the cervical spinal cord. *Eur J Neurol* 12:276-279.
99. Scollard, D. M., L. B. Adams, T. P. Gillis, J. L. Krahenbuhl, R. W. Truman, and D. L. Williams. 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 19:338-381.
100. Smith, M. A. 2000. Whipple's endocarditis without gastrointestinal disease. *Ann Intern Med* 132:595.
101. Street, S., H. D. Donoghue, and G. H. Neild. 1999. *Tropheryma whippelii* DNA in saliva of healthy people. *Lancet* 354:1178-1179.
102. Strom, R. and R. Gruninger. 1983. AIDS with *Mycobacterium avium-intracellulare* lesions resembling those of Whipple's disease. *New Engl J Med* 309:1323-1324.
103. Tran, H. A. 2006. Reversible hypothyroidism and Whipple's disease. *BMC Endocr Disord*. 6:3.

104. Vital-Durand, D., C. Lecomte, P. Cathébras, H. Rousset, P. Godeau, and The SNFMI Research Group On Whipple Disease. Société Nationale Française de Médecine Interne. 1997. Whipple's disease-clinical review of 52 cases. *Medicine (Baltimore)* 76:170-184.
105. von Herbay, A., H. J. Ditton, F. Schuhmacher, and M. Maiwald. 1997. Whipple's disease: staging and monitoring by cytology and polymerase chain reaction analysis of cerebral fluid. *Gastroenterology* 113:434-441.
106. Wang, H., D. Tollerud, D. Danar, P. Hanff, K. Gottesdiener, and S. Rosen. 1986. Another Whipple-like disease in AIDS ? *N Engl J Med* 314:1577-1578.
107. Weber, U., M. H. Morf, J. G. Gubler, M. Altwegg, and R. C. Maibach. 2003. Spondylodiscitis as the first manifestation of Whipple's disease - a removal worker with chronic low back pain. *Clin Rheumatol.* 22:443-446.
108. Whipple, G. H. 1907. A hitherto undescribed disease characterized anatomically by deposits of fat and fatty acids in the intestinal and mesenteric lymphatic tissues. *Bull Johns Hopkins Hosp* 18:382-391.
109. Wilson, K. H., R. Blitchington, R. Frothingham, and J. A. Wilson. 1991. Phylogeny of the Whipple's disease-associated bacterium. *Lancet* 338:474-475.
110. Yardley, J. H. and T. R. Hendrix. 1961. Combined electron and light microscopy in Whipple's disease-demonstration of "bacillary bodies" in the intestine. *Bull Johns Hopkins Hosp* 109:80-98.

Adresses de sites :

<http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Whipple.html>

<http://www.emedicine.com/med/topic2409.htm>

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/home.php?Lng=FR>

<http://www.eurice.info/typo3sites/index.php?id=149&L=2>

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-51-X
EGOPRIM
45, rue de la Glacière 75013 Paris
Dépôt légal : Septembre 2007



CAHIER DE **Formation** Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--|--|
| N° 1 : Hématologie | N° 22 : Syndrome des anti-phospholipides |
| N° 2 : Immunoanalyse | N° 23 : Parasites sanguins |
| N° 3 : Parasitologie | N° 24 : Biochimie pédiatrique |
| N° 4 : Bactériologie | N° 25 : Les moisissures d'intérêt médical |
| N° 5 : Hormonologie - Gazométrie | N° 26 : Immuno-hématologie et groupes sanguins |
| N° 6 : G.B.E.A | N° 27 : Les marqueurs cardiaques |
| N° 7 : Immuno-allergie (1) | N° 28 : Immunoglobulines monoclonales |
| N° 8 : Hémoglobines glyquées - Lipides | N° 29 : Mycobactéries - Mycobactérioses |
| N° 9 : Dosage des médicaments Tome I | N° 30 : Exploration de la fonction de reproduction - versant féminin |
| N° 10 : Hématologie Cas illustrés | N° 31 : Les dermatophytes |
| N° 11 : Amibes et flagellés intestinaux | N° 32 : Les marqueurs tumoraux sériques des tumeurs solides |
| N° 12 : Les maladies à Prions | N° 33 : Sport et Biologie |
| N° 13 : Autoimmunité et autoanticorps | N° 34 : Borréliose de Lyme |
| N° 14 : L'exploration de la thyroïde | N° 35 : L'Inflammation |
| N° 15 : Dépistage de la trisomie 21 | N° 36 : Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection |
| N° 16 : Immuno-allergie (2) | N° 37 : Maladies auto-immunes du foie |
| N° 17 : Virus des hépatites A (VHA) et E (VHE) | N° 38 : Les vitamines |
| N° 18 : Dosage des médicaments Tome II | N° 39 : Les dosages biologiques dans l'ostéoporose |
| N° 19 : Vaginites et vaginoses | |
| N° 20 : Hémostase et thrombose | |
| N° 21 : Virus des hépatites B (VHB), Delta (VDH),C (VHC), autres | |
-

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A. et R.S.I.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes (S.d.B., S.N.M.B. et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privé ou hospitalier, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros sont disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6500 exemplaires.

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-51-X
Dépôt légal : SEPTEMBRE 2007