

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

1 Microbisme commensal des rongeurs

1/a : Atelier "Rongeurs de laboratoire : microbisme commensal et réactivité biologique" - Bilan et Perspectives

Marion Bérard, Institut Pasteur – Paris

(voir transparents joints)

Depuis l'atelier de discussion qui s'est tenu en septembre 2003 à l'initiative de l'Institut Pasteur et de l'INRA, l'influence du statut sanitaire des rongeurs de laboratoire sur la recherche est redevenue d'actualité, notamment en ce qui concerne leur flore commensale. Dans son intervention, M. Bérard reprend les principaux points évoqués sur ce sujet, que la Com Vet entend suivre de près.

L'observation de départ est venue de chercheurs, principalement en immunologie, dont les résultats devenaient incohérents. Les explorations menées alors sur les modèles animaux utilisés ont mis en évidence un manque de stimulation de leur système immunitaire par l'environnement.

L'objectif de la journée a donc été d'en déterminer les causes probables au travers des techniques d'élevage et d'entretien des animaux, mais aussi d'appréhender les outils permettant de mieux caractériser l'état de développement du système immunitaire.

Ont ainsi été présentés :

- Les effets de la flore commensale digestive sur le système immunitaire
- L'influence de l'alimentation et de l'environnement sur la flore commensale digestive, permettant d'avancer des hypothèses sur l'origine des altérations immunitaires observées chez les animaux de laboratoire
- Les pratiques zootechniques et sanitaires des éleveurs commerciaux de rongeurs de laboratoire
- Les recommandations de la FELASA en matière de gestion d'élevage

En conclusion ont été abordées les notions de définition et de caractérisation de ce que « doit » être un rongeur de laboratoire, bien « standardisé » pour certains utilisateurs, mais trop dérivé pour d'autres. La difficulté réside dans la détermination de paramètres biologiques significatifs du niveau de confinement des animaux, en fonction de leur destination en recherche.

Cet atelier a ainsi ouvert de nombreuses perspectives de discussion entre producteurs et utilisateurs et de recherche d'outils permettant de caractériser les modèles expérimentaux. Une session a été consacrée à la poursuite des discussions lors du symposium de FELASA à Nantes en juin 2004.

1/b : Actualités sur les Staphylocoques en médecine vétérinaire

Christine Médaille, Vebiotel – Arcueil (94)

Le genre *Staphylococcus* compte 36 espèces, pour certaines rares, pour d'autres difficiles à identifier.

Il se divise en plusieurs groupes :

- *S. aureus* qui forme un groupe à lui seul
- 6 groupes majeurs : *epidermidis*, *saprophyticus*, *simulans*, *sciuri*, *hyicus* et *intermedius*
- *S. auricularis* ...

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Le critère de la coagulase est un caractère phénotypique par lequel se distinguent certaines espèces :

- Coagulase + : *S. aureus* (2 sous-espèces : *aureus* et *anaerobius*), *intermedius*, *schleiferi*, *coagulans*, *hyicus*, *delphini* et *lutrae*
- Coagulase - : tous les autres, dont *S. schleiferi schleiferi*

MAIS, un effet « pseudocoagulase » peut se manifester selon les tests et les réactifs, à savoir une réponse « coagulase + » d'espèces « coagulase - ».

Généralités

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses, de l'homme et de l'animal. Il existe pour quelques espèces une niche écologique préférentielle. Les espèces les plus fréquemment isolées en clinique sont secondaires à des infections ou des colonisations (débordement depuis leur niche écologique).

De nombreuses espèces ne sont rencontrées que chez certains animaux chez qui elles peuvent être pathogènes (ex. : *S. delphinus*, *S. lutrae*). Mais, ces espèces peuvent également coloniser ou infecter l'homme en cas de contacts fréquents (métiers à risque : soigneurs, vétérinaires). Il s'agit là de cas rares lors de déficit immunitaire ou d'agression sévère (morsure).

Rmq : l'homme peut également être à l'origine d'infection chez l'animal.

Espèces existant chez l'animal ayant présenté une pathogénicité isolées chez l'homme

S. aureus - *S. intermedius* - *S. pasteurii* - *S. schleiferi coagulans* - *S. caprae* - *S. sciuri sciuri*, *rodentium* - *S. xylosum*

Flores dont elles ont issues :

- *S. xylosum* et *sciuri* sur la peau des animaux. Occasionnellement narines de l'homme.
- *S. intermedius* dans le nez et anus du chien.
- *S. hominis* et *epidermidis* prévalents sur la peau de l'homme.

Quelques exemples dans la littérature

- Uemura E and coll.; Jpn J Infect Dis. 2004 57 (1) 21-4 : *Comparative characterization of Staphylococcus aureus isolates from throats and noses of healthy volunteers.*

51 % porteurs sains : *Staphylococcus aureus*
34 porteurs = nez, 24 = gorge, 22 = les deux
7 en tout méthicilline - résistants
Différence de souche entre ceux de la gorge et ceux du nez

- Nagase N. and coll; J.Vet.Med.Sci.64(3):245-250,2002 : *Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin.*

40 à 100% de *Staphylococcus* dans 7 espèces animales : bovins, caprins, chiens, chats, rongeurs...
Taux d'isolement chez l'homme : 88,9 %
Essentiellement *xylosum* et *sciuri* chez animal
S. aureus chez le porc, la vache, l'homme (11 %)
Souris de labo (écouvillonnage sur tout le corps) (23) : 69,6 % *xylosum*, 43,5 % *sciuri*, 8,7 % *aureus*.

- Shimizu A et coll, J.Vet.Med.Sci.54(2):355-357,1992 : *Distribution of Staphylococcus species on animal skin.*

Souris de laboratoire : 66 positives sur 76
80,3 % *xylosum*
8 autres espèces 1,5 à 6,1 %, 4,5 % *aureus*
Rat de laboratoire : 17 positifs sur 21
82,4 % *xylosum*, 35,3 % *aureus*, 23,5% *cohnii*.

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

- Zadoks R. et coll, J.Clin.Microb.38(5):1931-1939,2000 : *Application of P.F.G.E and binary typing in vet.clin.bacteriology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human Staphylococcus aureus isolates*

5/55 et 16/38 des souches ont 95 % similitude, mais forte spécificité liée à l'espèce.

Forte spécificité liée à l'hôte pour *S. aureus*

Transfert bovin → homme possible mais peu fréquent : c'est l'homme qui est la source de staphylocoques à l'origine des mammites de la vache.

Transfert de résistance à étudier (gène *mecA* responsable de la résistance étendue aux antibiotiques)

Conclusions

L'étude des flores est encore d'actualité !

La recherche des Staphylocoques methicilline résistants est à poursuivre chez l'animal, en particulier chez les carnivores (car un *S. intermedius* peut passer à l'homme suite à une morsure, avec transfert du gène *mecA*).

Cependant, il n'y a pas lieu de « diaboliser » *Staphylococcus aureus* : il existe un porteur sain sur 2 chez l'homme...

1/c : Bactérie opportunistes des rongeurs de laboratoire : définition, historique, intérêt du dépistage

François Veillet, Charles River Laboratories France – L'Arbresle (69)

(voir transparents joints)

Historique – Définitions

Naissance du statut SOPF (*Specific and Opportunistic Pathogen Free*) dans les années 70 pour les besoins de domaines tels que la radiobiologie, l'immunologie et la cancérologie. Par la suite, ce statut a été étendu à toutes les souches immuno-déficientes et potentiellement fragilisées (génétiquement modifiées).

STAL 1993 : Définition d'un micro-organisme

- pathogène : capacité d'induire même à faible dose une maladie dans une espèce donnée, chez un animal immuno-compétent et quelles que soient les conditions expérimentales, avec tendance à persistance chez l'hôte
- opportuniste : faible capacité d'induire une maladie dans une espèce donnée, uniquement chez animal immuno-déprimé et / ou si dose infectante forte, sans tendance à persister chez l'hôte

NB : pour obtenir l'absence d'opportunistes, il ne faut pas de contact avec l'homme, même porteur d'équipements de protection individuelle.

Voir les transparents pour la liste des germes inclus à la liste d'exclusion SOPF :

Selon Iffa Credo, FELASA 1993, FELASA 2001 et Charles River France 2004 : allongement de la liste des germes à exclure.

Certains de ces germes servent de marqueurs de bio-exclusion.

L'énumération d'agents de la flore humaine montre la « menace » que représentent les anaérobies.

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Le niveau de confinement doit ainsi être consolidé, en isolateur ou micro-isolateur, car le statut SOPF n'est possible que si l'homme n'est plus en contact direct avec les animaux.

Aspects pratiques – Dépistage

Différentes catégories de micro-organismes peuvent être distinguées, sans pour autant qu'il n'existe de barrière nette entre elles :

Commensale ou résidente / Symbiotique et flore de barrière / Opportuniste (mineure, majeure) / Interférente (relative !) / Pathogène / Zoonotique

Les flores symbiotique et de barrière correspondent à une flore de « dérive », liée à une baisse des contraintes, dépendante du lieu et du personnel.

L'influence de la flore opportuniste varie selon l'hôte et son statut (ex. : *Staphylococcus aureus* n'est pas dangereux en élevage, mais peut le devenir dans certaines conditions d'utilisation)

La difficulté pour les éleveurs et les utilisateurs d'animaux réside donc dans la définition de leur propre liste d'agents tolérables et à exclure, tout en sachant que la maîtrise de l'absence d'opportunistes dépend des moyens que l'on peut y mettre.

Critères de caractérisation de la micro-flore :

	Evolution du contexte	
<u>Absence</u> de risque zoonotique	→	<u>Absence</u> de risque zoonotique
<u>Absence</u> d'agents pathogènes (mineurs et majeurs) : spécificité d'espèce	→	<u>Absence</u> d'agents pathogènes (mineurs et majeurs) : spécificité d'espèce
<u>Absence</u> d'agents interférents (mineurs et majeurs) : spécificité liée au domaine de recherche	→	<u>Absence</u> d'agents interférents (mineurs et majeurs) : spécificité liée au domaine de recherche
<u>Absence</u> d'agents opportunistes (mineurs et majeurs) : dépendant de l'environnement et du statut immunitaire	→	« Réactivité normale » : spécificité liée au domaine de recherche
	→	<u>Effet positif</u> de la flore sur la santé
	→	<u>Effet positif</u> de la flore sur la recherche

Exemple de flore SOPF chez Charles River France (1999) :

Meilleure stabilisation de la flore avec *E. coli* et Streptocoques du groupe D (*S. faecalis*)

C.R.A.S flora : « Charles Rives Altered Schaedler flora »

Listes de classification des germes

NB : les micro-organismes des listes 1 et 2 (et les autres encore plus) peuvent être à l'origine d'infections en enceinte stérile en cas de rupture de confinement.

- **liste 1** : flore normale = symbiotique, flore de barrière, possédant un effet positif sur la santé
- **liste 2** : flore neutre, commensale (principalement d'origine humaine)

ex. : *Acinetobacter*, très présent dans l'environnement, est fréquemment retrouvé chez les rongeurs SPF. Il s'agit donc d'un agent normal des conditions SPF, mais que doit en penser l'utilisateur... ??

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

ex. rôle de l'hôte : *Staphylococcus xylosus* isolé au sein de lésions d'abcès plantaires chez des souris KO p47 -/- et ainsi pour la 1^{ère} fois associé à un développement pathogène, alors qu'il n'avait jamais été isolé chez des souris immuno-déficientes élevées en conditions similaires.

- **liste 3** : germes pour lesquels un potentiel opportuniste est documenté chez des hôtes fortement fragilisés / immuno-déprimés

Corynebacterium bovis → hyperkératose cutanée non purulente chez la *nude*. A noter que les souris *scid*, non sensibles à la maladie, portent le germe sur leur pelage et peuvent ainsi le transmettre aux *nude* au sein d'un même isolateur.

Pneumocystis carinii : champignon ou protozoaire ?? importance du statut immunitaire : portage sain ou morbidité (pneumonie chronique, perte de poids) et mortalité. Transmission par voie respiratoire. Recherche possible en histologie ou par PCR.

Pseudomonas aeruginosa : fréquemment isolé chez une souche de souris transgénique utilisée en recherche sur la fibrose.

Streptococcus : potentiel infectieux distinct selon le groupe : flore normale, germes opportunistes ou pathogènes reconnus.

Foyer infectieux : écarter une possible origine traumatique ; dans ce cas, il s'agira le plus souvent de *S. aureus*.

Helicobacter bilis peut être responsable de l'induction ou de l'accélération du développement d'une IDB (« inflammatory bowel disease ») chez certaines souches de souris et de rats.

- **liste 4** : germes pour lesquels un potentiel opportuniste est documenté chez des hôtes faiblement fragilisés / immuno-déprimés, ou en association avec d'autres agents → à exclure pour le statut SPF

Ces bactéries sont listées dans les recommandations de la FELASA. Mais sont-elles réellement pathogènes, voire interférentes ? en effet, il est à noter que la FELASA ne considère qu'une liste d'agents à rechercher, sans mention de leur caractère pathogène, zoonotique, opportuniste ou interférent...

Selon l'application en recherche, il y aura effectivement lieu d'exclure ou non ces germes au cas par cas.

1/c : Conclusions de la matinée - Discussion

Nathalie Fiks

Alors que les éleveurs et les utilisateurs d'animaux de laboratoire travaillent sur la base d'une liste d'exclusion depuis de nombreuses années, un certain microbisme commensal s'avère nécessaire au bon équilibre des modèles de recherche.

La problématique qui en découle

- passe par la définition des micro-organismes à éliminer et de ceux que l'on souhaite présents : tout responsable d'animalerie devrait dans l'idéal effectuer ce travail pour chacun des utilisateurs avec lequel il a affaire.

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

- demande la mise en œuvre de moyens pour tracer les germes qui doivent l'être.

Il y a là un champ de travail intéressant.

Discussion :

Interprétation de la liste FELASA

La liste FELASA provient d'une détermination *a posteriori* des germes interférents et est donc basé sur l'historique disponible. Or, le nombre de données palpables, publiables reste limité. (A ce sujet, les éleveurs pourraient être un mine d'informations)

En raison de la difficulté technique liée à l'identification de certains agents dans la liste, tout résultat positif lors d'un contrôle sanitaire est considéré comme rédhibitoire par les utilisateurs.

Ex. : tous les *Helicobacter* ne sont pas pathogènes, mais l'utilisateur commun ne fera pas la différence entre *H. hepaticus* (très grave) et un autre...

Ainsi, si le « screening » des germes donne une idée du statut sanitaire, il y a lieu d'inciter les professionnels à développer les tests spécifiques en cas de besoin et à sensibiliser les responsables d'animalerie sur leur impact.

Remarque : en raison de l'évolution de la taxonomie, la vigilance des spécialistes est appelée sur la mise à jour régulière des listes d'agents microbiens.

Problématique d'un élevage adapté à chaque utilisateur

La grande majorité (99 %) des utilisateurs est satisfaite par l'utilisation d'animaux à statut SPF. La définition d'une liste positive de micro-organismes dont l'intérêt est prouvé pour la recherche est un challenge intéressant, mais il y a lieu d'y adjoindre l'information adéquate pour éviter toute confusion chez les utilisateurs.

Pour les éleveurs qui possèdent un impératif d'uniformisation, quelles sont les solutions permettant de répondre aux demandes spécifiques ?

Dans la mesure où il existe déjà une flore spécifique SOPF, il sera toujours possible d'y adjoindre une flore contrôlée. Reste à savoir laquelle. Restera également le problème de la flore non contrôlée (anaérobies...) qui s'implantera d'elle-même...

Enfin, l'évolution de la flore de dérive est une donnée qui ne peut être contrôlée, sachant que, sur un même site, cette flore peut être distincte d'une zone à l'autre. Elle diffère même d'un individu à l'autre au sein d'une même portée, car elle traduit directement un équilibre entre la flore microbienne et son hôte.

Quarantaine ou acclimatation pour les rongeurs de laboratoire ?

L'isolement des animaux sur un site à leur arrivée tient lieu d'acclimatation en permettant l'enrichissement de la flore des animaux à partir du microbisme ambiant.

La quarantaine proprement dite n'est utile (et indispensable) que lors de l'entrée d'animaux de source inconnus, car il existe un risque majeur d'infection, en particulier d'origine virale.

C'est le cas lors des échanges internationaux de souris transgéniques, dont on sait qu'elles sont fréquemment porteuses de virus de l'hépatite (50-60 %) ou de parvovirus.

Dans ce cas, une quarantaine vraie de 4 à 6 semaines accompagnée de contrôles sanitaires s'impose.

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

2 Tuberculose humaine et cas des Primates non humains

M. G. Marchal, Institut Pasteur – Paris

La tuberculose est une maladie contagieuse, due à *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch). L'homme est le réservoir de la bactérie, la contamination des PNH est accidentelle.

2/a : Epidémiologie

La tuberculose tue 2 millions de personnes chaque année dans le monde. Elle est particulièrement fréquente en Afrique, Asie, Amérique du Sud, où la croissance de la population engendre des problèmes de promiscuité ; et en régression lente dans les pays dits « développés ».

NB : la fréquence de la maladie semble augmenter, mais il faudrait pondérer cette évolution par l'augmentation du nombre de déclarations.

2/b : Les bactéries à tropisme pulmonaire

Bactéries à tropisme pulmonaire accidentel :

- *Legionella pneumophila* (environnement et amibes)
- *Bacillus sp*
- *Bacillus anthracis*
- *Yersinia pestis*
- *Mycobacterium sp* (mycobactéries de l'environnement)

Bactéries pathogènes spécialisées

- *Mycobacterium tuberculosis* : espèce bactérienne inféodée à l'homme, survit bien dans l'environnement ou un aérosol, sensible aux UV, très sensible à la décontamination par l'alcool
- *Mycobacterium leprae* : bactérie de l'homme, transmission par aérosol ?
- *Mycobacterium bovis* : bactérie du bétail, blaireaux, opossums, transmission digestive ou aérosol, peu infectieuse pour l'homme.

2/c : Causes de mortalité chez l'homme des pays « développés » au cours du XXe siècle

1900 : l'espérance de vie dans les pays occidentaux est d'environ 50 ans, la mortalité infantile de 100/1000 ; la mortalité liée à la tuberculose est très élevée.

Elle baisse progressivement jusqu'en 1950 : cette baisse (et celle des autres maladies infectieuses) est liée à l'amélioration des conditions de vie, auxquelles s'ajoutent la découverte des antibiotiques (streptomycine) et du BCG, plus tardivement.

2/d : Physiologie respiratoire

Epuration nasale et trachéo-bronchique

Trajet des particules en fonction de leur taille :

Les particules < 3 µm pénètrent jusqu'à l'alvéole pulmonaire

Les particules de 0,1 à 1 µm sont rejetées

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Les particules $< 0,1 \mu\text{m}$ diffusent comme les gaz sanguins

Les autres restent dans le nez ou remontent l'arbre trachéo-bronchique via l'appareil muco-ciliaire, sont avalées et passent dans l'estomac.

Or le BK a tendance à s'agglomérer, il suit donc généralement le trajet de rejet, passe dans l'estomac où l'acidité l'inactive ($\text{pH}=1$)

Valeurs respiratoires physiologiques chez l'homme (en activité réduite)

Volume courant : 0,5 l

Fréquence respiratoire : 12-16 /min

Ventilation au repos : 6-8 l/min, soit 15 à 20 m^3 / jour

Point important : d'après M. Marchal, on démontre que c'est bien **1** bactérie qui contamine un homme (puis elle se divise).

2/e : Pathogénie

Premier contact avec *Mycobacterium tuberculosis*

NB : une personne sur 10 entrant en contact avec le BK développe la maladie.

Le bacille entre dans une alvéole pulmonaire (soit dans le milieu extra-corporel) : il doit être phagocyté par un macrophage (il lui est donc nécessaire d'induire un phénomène immunitaire). Un bacille sur 50 à 200 est réellement infectant pour un macrophage : alors il crée un petit foyer infectieux dans le poumon.

Ce foyer reste localisé, sauf si le macrophage alvéolaire (donc extra-corporel) amène le BK jusqu'au nœud lymphatique local : commence alors la réponse immunitaire (multiplication des lymphocytes T, qui vont circuler au bout de quelques semaines dans l'organisme par voie lymphatique puis sanguine).

A la fin de cette phase : un foyer infectieux (10 à 100 000 BK) + un nœud lymphatique sont touchés, avec n'importe quelle localisation dans le poumon.

Phase de diffusion du bacille → tuberculose secondaire (« tuberculose »)

(10 000 – 10^6 BK)

Il diffuse dans l'organisme à partir du poumon ou du nœud lymphatique.

- Tuberculose miliaire du poumon → mort en quelques mois (on peut considérer que le bacille s'est « suicidé », ayant tué son hôte).
- Méningite, pleurésie ou infection du péricarde ou du péritoine → guérison (également « suicide » du BK)
- Tuberculose pulmonaire
 - mortalité : 1/3 en 2 à 3 ans
 - mortalité : 1/3 jusqu'à 15 ans
 - guérison : 1/3 en 5-10 ans

Elle est généralement localisée au niveau de l'apex : zone moins ventilée, donc moins perfusée, la pression partielle en oxygène est différente (environ au niveau de l'air ambiant), or la réponse immunitaire n'est pas efficace à cette p_{O_2} .

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Phase de réactivation

Les foyers de tuberculose pulmonaire permettent la survie du bacille. Il y a formation d'une caverne (ou tuberculome), à l'intérieur de laquelle le nombre de bacilles augmente exponentiellement (10^8 BK). Les BK peuvent alors s'éliminer par la bronche de drainage avec dispersion autour du malade : voici la phase la plus contaminante !

L'évolution vers la guérison est possible, mais en 5 à 10 ans avec contamination de l'environnement.

En bref : un tuberculeux peut contaminer environ 20 personnes par an :

- 1/5 d'entre eux développera une tuberculose secondaire
- 1/10 à 1/20 une tuberculose excavée

NB : les enfants sont particulièrement sensibles !

NB : chez une personne porteuse du HIV, la déplétion en LT4 diminue la réponse immunitaire de l'organisme et les BK, restant intracellulaires, sont paradoxalement moins contagieux !

2/f : Diagnostic - Prévention

Culture bactériologique

Le BK doit être recherché dans les crachats.

Un des objectifs de l'OMS est de détecter 70 à 80 % des personnes excréant du BK.

Intradermo-réaction

Il est primordial de savoir que c'est l'action mécanique d'injection (volume injecté et vitesse d'injection), qui déclenche la réaction dermique. De même, effectuer l'injection dans une zone dermique riche en mastocytes augmente la réaction (ces zones sont variables en fonction de l'espèce !).

Chez l'homme, il faut injecter 100 µl de tuberculine.

D'autre part, chez un sujet mal nourri, en mauvais état général ou en fin d'évolution, l'IDR est fréquemment négative.

Voir le déroulement de l'apparition de la réaction d'hypersensibilité retardée (page suivante).

NB : si les cellules inflammatoires sont recrutées par ailleurs (autre foyer infectieux par exemple), la réaction d'hypersensibilité retardée peut être négative.

NB : La PCR :

- ne peut être utilisée en dépistage (faux négatifs / faux positifs)
- est utile une fois le diagnostic avéré, pour identifier l'espèce bactérienne (Mycobacterium tuberculosis ou autre espèce)

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Cinétique de la réaction cutanée lors de test tuberculinique

Injection



Dégranulation du mastocyte = réaction inflammatoire non spécifique requise pour l'apparition de la réaction spécifique



Ouverture des capillaires, ce qui fait apparaître des récepteurs à leur surface



Adhésion des lymphocytes et des monocytes



2-3 h après l'injection :

De nombreuses cellules sortent du capillaire dans le derme (nombreux polynucléaires neutrophiles, quelques monocytes, quelques lymphocytes)



4-6 h après l'injection

→ Absence d'antigène : arrêt de la réaction

→ Présence d'antigène : recrutement des lymphocytes et réaction spécifique



24 h après l'injection :

98% des cellules sont recrutées (= réaction d'hypersensibilité retardée)



3-4 jours après l'injection :

Formation du pli cutané (épaississement de l'épithélium + dépôt de fibrine + infiltration cellulaire sous l'effet de l'interféron γ) : papule



5-8 jours après l'injection :

Baisse de la réponse chez l'homme (contrôle de l'inflammation par l'interleukine 10)

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Histologie du tuberculome

En périphérie : fibrose et infiltrat lympho-monocytaire, entourant des cellules géantes de type cellules de Langhans et une zone centrale de pus caséeux.

Les BK sont au niveau du foyer de nécrose centrale, à plus de 1 cm des cellules pulmonaires ou immunitaires vivantes.

C'est de ce foyer que viendra la caverne qui pourra s'étendre jusqu'à la bronche la plus proche pour permettre l'expulsion des germes.

2/g : Traitement

Il n'est pas possible de traiter en première intention une tuberculose par choix d'antibiotiques sur un antibiogramme, car celui-ci ne peut être obtenu qu'au bout de 2 mois (M. tuberculosis est un bacille à croissance très lente : 1 division toutes les 24 heures).

Primo-infection

Association de 2 antibiotiques (isoniazide + rifampicine) pendant 3 mois

Tuberculose

Association de 4 antibiotiques (isoniazide + rifampicine + ethambutol + pyrazinamide) pendant 2 mois, puis 2 antibiotiques (les deux premiers) pendant 4 mois.

ATTENTION : un traitement (nombre d'antibiotiques ou durée) sélectionne les souches de BK résistante !!

Par exemple : sur 10^8 BK, un antibiotique utilisé seul en inactive 10^5 , les 10^3 restants reprennent leur multiplication, avec sélection des résistants.

2/h : Principes des programmes nationaux de lutte contre la tuberculose

But

Couper la chaîne de transmission

Moyens

Mise en place de réseaux locaux

- De diagnostic par l'examen direct des crachats (problème : cette technique n'est diagnostique que dans 35 à 40% des cas), puis confirmation par culture en environ 2,5 mois. Le traitement débute donc avant le diagnostic, sur l'impression clinique du médecin
- De distribution des médicaments avec prise contrôlée

Coût d'un traitement : 12 € pour 6 mois d'un traitement de qualité équivalente à celui procuré en Europe

L'ensemble du processus coûte environ 250€ par malade, qui profite au pays en question.

En Europe, le nombre de cas a augmenté avec l'ouverture des frontières vers les pays de l'ex-URSS. Ainsi, après avoir atteint plus de 50 cas sur 100 000 par manque de distribution des médicaments, il est actuellement en régression.

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

2/i : Vaccination : historique du BCG

Le BCG (bacille de Calmette et Guérin) a été produit par atténuation de *Mycobacterium bovis*.

Mycobacterium bovis



Mise en culture sur milieu pomme de terre + bile de boeur (=désoxycholase)



Dès 15 repiquages, les bactéries étaient moins pathogènes pour les jeunes veaux



Après de nombreux essais, la virulence de la souche s'est avérée atténuée, fixée



Test sur des veaux, puis sur des bébés des familles tuberculeuses (par voie orale)



Les enfants vaccinés étaient moins malades

Le BCG agit au niveau de l'étape de diffusion du bacille, limitant ainsi méningites et tuberculoses miliaires.

NB : un humain ne développe jamais de maladie grave (tuberculose au sens strict) due à la vaccination par BCG, sauf en cas de déficit immunitaire sévère.

NB : un régime alimentaire pauvre en protéines réduit le degré de protection par le BCG.

2/j : Au sujet des primates non humains

QUESTION : QUELLE TUBERCULINE UTILISER ? Voici des éléments de réponse

Production de la tuberculine

Souche humaine de *Mycobacterium tuberculosis* ou bovine de *Mycobacterium bovis*



Mise en culture en milieu synthétique phosphore glycérine asparagine

Durée : de 1,5 à 3 mois en fonction du fabricant



Autoclavage : ≥ 120 °C pendant 2-3 heures (ceci n'est pas codifié !)



Obtention d'une « soupe » (= mélange hydrolysé,) non caractérisable biochimiquement



Concentration : obtention de la tuberculine, dite OLD

Tuberculine PPD = Purified Protein Derivative

La tuberculine PPD ne contient pas un antigène purifié !

En effet, les mycobactéries du même groupe sont presque génétiquement identiques (à plus de 98 %) : *M. tuberculosis*, *M. bovis*...

Elle est dite purifiée car obtenue par précipitation des protéines par des sels (sulfate d'ammonium ou acide chloracétique selon le fabricant).

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

NB : Il faut comprendre : des réactions « croisées » sont possibles avec des Mycobactéries non tuberculeuses !

A priori, la contamination des PNH en recherche est plutôt d'origine humaine

L'homme manipulant les PNH serait l'origine des transmissions : capture, élevage, transport, promiscuité... Il serait donc préférable d'utiliser la tuberculine PPD humaine (AN5) (Mycobacterium tuberculosis).

Actuellement, la « souche » de référence chez l'homme est la RT23.

Les tuberculines des différents fabricants devraient se baser sur un système de bio-équivalence identique en comparant les réactions dermiques engendrées sur un même site d'injection chez différentes espèces.

Site d'injection de la tuberculine chez les PNH

Les zones dermiques les plus riches en mastocytes sont (sous réserve de transcription contradictoire des notes de Nathalie et Nicolas : merci de nous corriger si nécessaire !) :

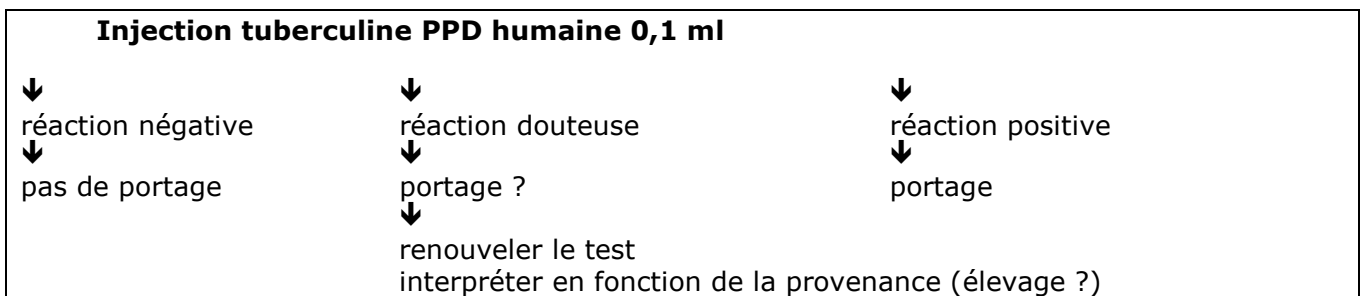
- souris : flanc
- cobaye : oreille, patte
- homme : avant-bras, thorax
- PNH : ?

Dose d'injection de la tuberculine

Pour l'homme : 5 à 10 Unités

Pour le PNH : 1500 à 2000 unités

Arbre de décision



NB : en test initial : en cas de réaction négative, renouveler le test 2 mois après
→ négatif → pas de portage

Conclusion pour les primates non humains

La difficulté d'interprétation de l'intradermo-réaction est basée sur le fait que la tuberculine n'est pas purifiée antigéniquement, d'où des risques de réactions faussement positives.

La M.O.T. (Mammalian Old Tuberculin) semble plus inflammatoire que la PPD. Néanmoins, la réaction reste plus un problème de dose injectée que de tuberculine.

Ainsi, une réaction positive en dépistage doit toujours être associée à un examen clinique, ainsi qu'à la corrélation avec l'environnement de départ de l'animal : élevage / capture, historique de l'élevage...

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

Le site (population en mastocytes ?) et les modalités d'injection modifient également la réponse cutanée : risques de réactions faussement négatives.

Il peut exister des réponses faussement positives liées à la présence de mycobactéries de l'environnement .

A noter en pratique, que 3 IDR répétées à 15 jours d'intervalle paraissent trop rapprochées aux yeux de M. Marchal.

Justification de la radiographie thoracique ?

Le problème réside dans l'interprétation des clichés : un certain nombre de PNH montrent des images « limites », d'autres positifs ne correspondent toutefois pas à des lésions de tuberculose. Le diagnostic obtenu n'est donc pas forcément complémentaire du test à la tuberculine.

Ainsi, d'après M. Marchal, doit pouvoir être considéré comme sain vis-à-vis de la tuberculose, un animal isolé depuis plus de 2 mois, en bon état clinique, s'alimentant normalement et ayant présenté deux réactions négatives à l'IDR à la tuberculine pratiquée avec un bon protocole.

Compte-rendu de la réunion du mardi 11 mai 2004

3 Révision des annexes de l'AM du 19/07/2002

Nicolas Dudoignon

(voir transparents joints)

Suite à la précédente réunion de la Com Vet, des contacts ont été pris avec le représentant du Bureau Importation Pays Tiers (BIPT) de la DGAL afin d'inclure l'AFSTAL au circuit de révision des annexes de l'A.M. d'importation des animaux de laboratoire.

Toutefois, la Com Vet n'a pas été saisie sur ces annexes elles-mêmes, mais elle l'a été sur un projet de décision européenne concernant l'importation des primates non humains. Eric Andréa transmis ce texte à un ensemble de spécialistes et a synthétisé leur réponses pour effectuer un retour au BIPT. Les principaux commentaires et sujets de discussion sont repris en annexe.

L'AFSTAL a également été saisie sur un projet de certificat sanitaire d'exportation des animaux de laboratoire France- Corée. Après consultation de divers interlocuteurs sur ce sujet, il s'est avéré que le texte en question émanait de Charles River France et avait semble-t-il été repris à son compte par le Bureau Export Pays Tiers de la DGAL.

4 Déclaration des protocoles douloureux : Point sur les actions du Grice (Groupe de Réflexion Interprofessionnel sur les Comités d'Ethique – GIRCOR)

Nicolas Dudoignon

(voir transparents joints)

Depuis sa parution, le Décret 2001-464 pose question notamment en ce qui concerne son article 5 où sont évoquées la déclaration et la justification auprès du préfet des expériences réalisées sans anesthésie ou analgésie et provoquant de la douleur.

En l'absence d'arrêtés d'application, des groupes de travail dont le Grice fait partie se penchent sur des questions telles que : « Sur quelles bases doit-on décider de déclarer un protocole ? » ou « Sur quelles bases les autorités compétentes jugeront-elles qu'un protocole doit être déclaré ? »

Afin de mieux définir le seuil de douleur pour la déclaration en préfecture, il est apparu nécessaire de disposer au niveau national de critères de référence communs admis par la communauté scientifique, les représentants ministériels et les DDSV. Un consensus a pu être obtenu sur la base d'un document admis comme référence par les représentants des comités d'éthiques du public et du privé : le document élaboré par l'Office Vétérinaire Fédéral suisse intitulé « Classification prospective des expériences sur animaux selon leur degré de gravité (catégories de contrainte) ».

La catégorie de contrainte de niveau 3 (le plus haut sur une échelle de 0 à 3) correspondrait alors au degré de gravité nécessitant déclaration.

Cette prise de position actuelle, qui doit obtenir l'aval du GIRCOR, ne doit pas occulter la volonté de réduire la douleur induite au cours des expériences...

Prochaine réunion le 26 octobre 2004

Merci à tous les intervenants et aux personnes qui nous ont apporté leur aide dans l'organisation et le déroulement de cette journée.