

PLAN

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	3
I- Infections à <i>Haemophilus influenzae</i>	3
I-1- Les infections respiratoires basses (IRB)	3
I-1-1- Formes systématisées	3
I-1-2- Formes bronchopneumoniques	3
I-2- Otites moyennes	4
I-3- Autres infections	4
II- Classification et sous-typage	4
III- Facteurs de virulence	5
III-1- Définition	5
III-2- Les différents facteurs de virulence	6
III-2-1- La capsule	6
III-2-2- Les pili : fimbriae	7
III-2-3- Les immunoglobulines A protéases	8
III-2-4- Les lipooligosaccharides	8
III-2-5- Les autres protéines de surface	9
III-2-6- Captation du fer	10

IV- Mécanisme de colonisation	11
IV-1- Interactions avec la mucine	11
IV-2- Interactions avec les surfaces des mammifères	12
IV-3- Le LOS	13
 V- Mécanisme d'échappement	13
V-1- Les IgA protéases	13
V-2- Pénétration à l'intérieur des cellules épithéliales	14
V-3- Variation antigénique	15
 VI- Composant des antigènes d'intérêt	15
VI-1- OMPs : Protéines de la membrane externe	16
VI-1-1- Protéines majeures de la membrane externe	16
VI-1-2- Protéines mineures de la membrane externe (mOMPs)	18
VI-2- Le lipooligosaccharide	19
 VII- Caractères bactériologiques	19
VII-1- Morphologie microscopique	19
VII-2- Caractères culturaux	20
VII-2-1- Exigences en facteurs de croissance	20
VII-2-2- Milieux de culture	20
VII-2-3- Conditions de culture	21
VII-2-4- Aspect macroscopique des colonies	21
VII-2-5- Caractères biochimiques	22

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I- Bactériologie	24
I-1- Cadre de l'étude	24
I-2- Matériel	24
I-2-1- Origine des souches	24
I-2-2- Matériel pour l'isolement et l'identification	24
I-2-3- Matériel pour conservation	25
I-3- Méthodes	25
I-3-1- Méthode d'isolement	25
I-3-2- Conservation	26
II- Entretien des cellules PS par trypsinisation	26
II-1- Cadre de l'étude	26
II-2- But et domaine d'application	26
II-3- Matériel	27
II-4- Méthodes	27
II-4-1- Préparation du matériel	27
II-4-2- Manipulation	28
II-4-3- Numération et test de viabilité	29
II-4-3-1- Principe du test de viabilité	29
II-4-3-2- Technique	29
II-4-3-3- Expression des résultats	30
III- Réalisation de l'épreuve d'adhésion cellulaire	30
III-1- Cadre de l'étude	30
III-2- Matériel	30
III-3- Schéma général de l'épreuve d'adhésion	31
III-3-1- Mise en culture des bactéries	31
III-3-2- Préparation des chambres de culture	31
III-3-3- Préparation de suspensions bactériennes	

à 10^8 bactéries / ml dans du PBS	32
III-3-4- Lavage des chambres de culture	32
III-3-5- Epreuve des puits	32
III-3-6- Incubation	32
III-3-7- Lavage pour l'élimination des bactéries non adhésives	33
III-3-8- Coloration au Bleu Trypan	33
III-3-9- Lecture au microscope à contraste de phase	33

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

I- Flore bactérienne isolée	34
I-1- Répartition globale des souches	34
I-2- Répartition des souches isolées selon l'origine	35
I-3- Répartition des souches selon l'infection, l'âge et l'origine	36
II- Adhérence des souches d' <i>Haemophilus</i> aux cellules PS	37

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

I- Les souches d' <i>Haemophilus</i>	38
I-1- Isolement et contrôle de qualité	38
I-2- Répartition des souches	38
II- Adhérence aux cellules épithéliales PS et déterminants de virulence	39

CONCLUSION	41
-------------------	-----------

BIBLIOGRAPHIE	43
----------------------	-----------

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC :	American Type Culture Collection
BCC :	Bouillon Coeur cervelle
DNP :	Dinucléotide phosphate
EBS :	solution saline de Earle
GSC :	Gélose au sang cuit
GSO :	Gélose au sang ordinaire
HBS :	Solution tamponnée de Hanks
Hib :	<i>Haemophilus influenzae</i> b
HMW :	High Molecular Weight
HTM :	<i>Haemophilus</i> Test Medium
IgA :	Immunoglobuline A
IRB :	Infections respiratoires basses
kDa :	kilodalton
LOS :	Lipooligosaccharide
mOMPs :	miner outer membrane proteins
NAD :	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NADP :	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NANA :	Acide N-acétyl neuramique
NTHi :	Non typeable <i>Haemophilus influenzae</i>
OMPs :	Outer membrane proteins
ORL :	Oto-rhino-laryngologie
PM :	Poids moléculaire
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PMN :	Polymorphonuclear
SDS-PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide – sodium dodecyl sulfate
SVF :	Sérum de veau foetal
Tbps :	Transferrin Binding proteins

INTRODUCTION

Haemophilus influenzae, petite bactérie Gram négatif est un germe pyogène responsable d'infections variées plus sévères chez l'enfant ou chez les sujets fragiles.

D'abord appelé « bacille de Pfeiffer », *Haemophilus influenzae* a été ainsi dénommé car, jusqu'à la mise en évidence du virus grippal en 1933, il avait été cru responsable de la grippe.

Haemophilus influenzae occupe une place importante en pathologie infectieuse. Il fait partie de la triade bactérienne classique des agents étiologiques des méningites bactériennes et représente également un agent majoritaire des otites moyennes (48).

Les souches capsulées possèdent un antigène polysaccharidique lié à la capsule dont il existe six (6) variants déterminant six (6) sérovars : a, b, c, d, e et f. Les autres sérotypes non b et les souches non sérotypables, du fait de l'absence de la capsule (NTHi) sont surtout responsables d'infections ORL et pulmonaires (56).

Les infections respiratoires basses associées aux NTHi demeurent une des principales causes de la mortalité chez les enfants des pays en voie de développement et des pays développés (9, 55, 27), avec une morbidité et une capacité à préparer le lit à d'autres maladies en recrudescence, beaucoup plus graves, telles que les BPCO (bronchopneumopathies chroniques obstructives) ou la fibrose cystique (44).

Haemophilus influenzae est le deuxième agent responsable de pneumopathie communautaire chez les patients VIH positifs (5).

Le sérotype b était jusque là responsable des infections invasives mais depuis que la vaccination anti-Hib est devenue de plus en plus accessible, les autres sérotypes sont de plus en plus incriminés dans les maladies chez les enfants vaccinés (41). Ceci engendre en effet un regain d'intérêt vers un nouveau vaccin anti-*Haemophilus influenzae* plus protecteur (68, 32).

La pathogénèse des infections est très liée aux facteurs de virulence. Une meilleure connaissance de ces facteurs permettrait ainsi un meilleur contrôle des infections à *Haemophilus influenzae* non b.

Plusieurs composantes bactériennes ont été proposées comme facteurs potentiels de virulence.

La majorité de ces déterminants bactériens sont de nature protéique mais la bactérie possède aussi des polysaccharides capsulaires pouvant être impliqués dans la virulence.

Nous avons entrepris ce travail avec deux objectifs principaux :

- répertorier les différents facteurs de virulence des souches *d'Haemophilus influenzae* non b
- et sélectionner des souches *d'Haemophilus influenzae*, capables d'adhésion in vitro à des cellules épithéliales, à partir desquelles d'autres études plus poussées seraient menées en vue de contribuer à l'élaboration d'un vaccin contre les *Haemophilus influenzae* non b.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES

I- Infections à *Haemophilus influenzae*

I-1- Les infections respiratoires basses (IRB)

Les IRB associées aux *Haemophilus influenzae* non typables (NTHi) sont une cause principale de mortalité chez les enfants et les personnes âgées des pays en voie de développement (9, 26), avec une capacité à prédisposer les individus à des maladies en recrudescence aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays développés (73).

La pneumonie à *Haemophilus influenzae* est d'une fréquence difficile à évaluer en raison d'un portage très répandu des souches non capsulées (10). Celles-ci sont responsables d'une colonisation des voies aériennes quasi-constante chez l'enfant, fréquente chez l'adulte, en particulier s'il est fumeur et/ou bronchitique chronique.

Au cours de la pneumonie, deux types de tableaux cliniques sont observés.

I-1-1- Formes systématisées

Elles sont habituellement dues à des souches capsulées de type b, compliquées de bactériémies, de localisation pleurale, de dissémination infectieuse métastatique ; elles sont les plus fréquentes chez l'enfant et en cas d'hypogammaglobulinémie.

I-1-2- Formes bronchopneumoniques

Elles sont surtout observées chez l'homme, en rapport avec des germes non capsulés, survenant chez le fumeur, le bronchopathe chronique, l'alcoolique ou à la faveur d'une maladie chronique évolutive ; la bactériémie est rare, les localisations infectieuses à distance exceptionnelles (5).

I-2- Otites moyennes (45, 10)

La prévalence de l'otite moyenne pendant les trois premières années de la vie a d'énormes effets sur la capacité intellectuelle, le cursus scolaire, le discours et le langage. Jusqu'à 100 % des enfants des pays en voie de développement et 62 % des enfants des pays développés ont eu leur première épisode d'otite moyenne à l'âge de un an. Les NTHi sont responsables pour 27 à 37 % de ces épisodes (25).

I-3- Autres infections

H. influenzae peut être à l'origine :

- de méningites souvent précédées d'infections respiratoires supérieures ou oto-rhino-laryngologiques et accompagnées d'un état septicémique. Elles sont surtout observées chez le nourrisson âgé de 3 à 10 mois et rarement chez le sujet âgé.
- D'épiglottites chez les enfants âgés de 2 à 7 ans.
- D'états septicémiques fébriles accompagnés ou non de signes de localisation tels que : otite, arthrite, ostéite, ostéomyélite, péricardite, pneumonie ou orchiépididymite.
- De conjonctivites

Il existe aussi une possibilité d'infections puerpérales où la localisation vaginale de la bactérie peut être la cause d'infections du nouveau-né.

II- Classification et sous-typage

Les *Haemophilus* font partie de la flore des muqueuses de l'homme et de nombreux oiseaux.

Le genre *Haemophilus* appartient à la famille des Pasteurellaceae avec les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus*. Il contient seize (16) espèces d'origine animale et humaine, dont quelques unes sont pathogènes pour l'homme ; *Haemophilus influenzae* est l'espèce type.

Huit systèmes majeurs pour la classification des *Haemophilus influenzae* sont établis. Les souches capsulées possèdent un antigène polysaccharidique lié à la capsule dont il existe six (6) variants déterminant six (6) sérovars : a, b, c, d, e et f.

Les sept (7) systèmes de classification restant concernent les *H. influenzae* non capsulées (i.e. NTHi) et sont résumés par Murphy et Sethi (55). Ils incluent le biotyping, la différence de masse moléculaire entre les protéines de la membrane externe (OMPs) ou l'hétérogénéité antigénique, la classification selon l'hétérogénéité antigénique du LOS et la détermination des différences génétiques selon le type électrophorétique ou par l'amplification par PCR (25).

Le sous-typage fait la cartographie des facteurs de virulence avec leur implication dans la pathogenèse des maladies chez un individu. Elle va permettre donc un meilleur contrôle des affections à *H. influenzae*.

III- Facteurs de virulence

III-1- Définition (64)

Ce terme, au sens strict, se réfère à des substances produites par un micro-organisme qui peut être pathogène pour l'homme. Les toxines bactériennes constituent un exemple classique de facteurs de virulence.

Plus récemment ce terme a été redéfini comme désignant n'importe quel composant d'un microbe qui est nécessaire ou qui potentialise sa capacité à provoquer une maladie. Par cette définition au sens large, même une substance qui, purifiée, est non toxique pour les tissus de l'hôte, peut quand même être

considérée comme un facteur de virulence si son absence doit rendre le microbe significativement moins apte à provoquer une maladie (moins virulent). Sont exclus de cette définition tous les gènes (et produits de gènes) qui sont essentiels pour la croissance normale d'un microbe. Ainsi, un facteur nécessaire à la bactérie pour sa croissance sur un milieu artificiel n'est pas considéré comme étant un facteur de virulence, alors qu'un facteur qui potentialise la capacité de la bactérie pour sa capacité à envahir le sang, chez l'homme, est un facteur de virulence.

III-2- Les différents facteurs de virulence

III-2-1- La capsule (25, 28)

Les souches capsulées possèdent un antigène polysaccharidique lié à la capsule dont il existe six variants.

Ces polysaccharides capsulaires, dont la structure chimique est connue, peuvent être identifiés par des réactions immunologiques en présence d'anticorps spécifiques.

Le polysaccharide capsulaire est le premier facteur de virulence. Cette capsule peut avoir un diamètre égal à plusieurs fois celui de la cellule. Elle est essentielle à la cellule en lui donnant la capacité d'être un bon compétiteur dans des milieux naturels variés. Elle offre un autre mode d'adhésion à des surfaces, et protège également de nombreuses bactéries pathogènes (provoquant des maladies) contre la phagocytose par les macrophages et les leucocytes polynucléaires des animaux supérieurs (57).

L'expression de la capsule est relativement instable, et la perte de cette expression est liée à la perte du matériel génétique requis pour sa synthèse.

L'ensemble du DNA qui est spécifique à un type particulier de capsule est relativement infime ; plusieurs gènes qui ne sont pas spécifiques au type de capsule sont requis pour la synthèse de la capsule.

Le matériel capsulaire inhiberait les pili dans la reconnaissance des surfaces cellulaires de l'hôte. L'encapsulation est modulée positivement lors des bactériémies et négativement très tôt dans les processus infectieux pour éviter d'interférer avec la colonisation.

III-2-2- Les pili : fimbriae (64, 25, 29)

H. influenzae présente également des facteurs d'adhésion expliquant sa capacité à adhérer aux cellules de la muqueuse nasopharyngée, première étape nécessaire à la colonisation.

Les pili sont les organites de l'attachement aux surfaces et ils démontrent une remarquable spécificité. Ils prennent naissance dans la membrane cellulaire et s'étendent dans le milieu sur 0,2 à 2 μm de long. Ils sont composés de protéines structurales nommées pilines. Des protéines mineures ou adhésines, parfois situées à la pointe du pili, sont responsables des propriétés d'attachement.

Certains NTHi possèdent le gène codant pour la protéine de piline. Chez ces souches, les propriétés d'adhérence et antigéniques sont similaires à celles des *H. influenzae* de type b (Hib).

Il existe également une adhésine pour les NTHi qui est une protéine de pili thermomodifiable et de masse moléculaire 25 KDa. Cette protéine aurait un haut degré d'homologie avec l'OmpA de plusieurs bactéries Gram négatif et avec le polysaccharide de *H. influenzae* b.

Chaque pili de *H. influenzae* b comporte plusieurs sous-unités dont la majeure est celle protéique HifA constituée d'une séquence variable d'amino-acides. HifA coïncide à la partie hydrophile et antigénique. Ainsi pendant que

les autres sous-unités assurerait les fonctions protéiques du pili, HifA, par ses modifications permettrait à la bactérie de présenter des épitopes inconstantes. Ceci contribuerait à l'évasion contre le système immunitaire.

Les pili jouent également d'autres rôles dans la maladie. Comme les capsules, ils peuvent être antiphagocytaires.

III-2-3- Les immunoglobulines A protéases

H. influenzae produit une enzyme qui a la propriété de cliver les immunoglobulines humaines de type A. C'est une protéase extracellulaire constitutive, d'origine chromosomique spécifique des IgA humaines de la sous-classe des IgA₁. Par hydrolyse, ces dernières libèrent les fragments Fab et Fc (43).

Ainsi *H. influenzae* pourrait se protéger de la présence locale des IgA sécrétaires spécifiques (56).

La fréquence assez élevée de sa production (68,4 % des souches d'*H. influenzae*) dans les infections respiratoires supérieures relativiserait son rôle dans l'induction d'infections symptomatiques (78).

III-2-4- Les lipoooligosaccharides (LOS)

Comme toutes les bactéries Gram négatif, *H. influenzae* possède une membrane externe qui est construite à l'extérieur de la fine couche de muréine. Cette membrane externe comprend deux feuillets : l'un interne constitué de phospholipides et l'autre, externe constitué de lipopolysaccharides ou lipoooligosaccharides.

Ce LOS comporte deux parties :

- le lipide A qui ancre Le LOS dans le feuillet externe de la membrane externe

- et le core, constitué d'une courte série de sucres.

La partie lipide A possède un grand nombre d'activités biologiques « dose dépendante ». A petites doses, elle provoque la fièvre et active une série d'évènements immunologiques et biochimiques qui conduisent à la mise en alerte des mécanismes de l'hôte.

A fortes doses, ce composé, également connu sous le nom d'endotoxine, peut provoquer un état de choc et même la mort (57). C'est ce phénomène qui est observé au cours de la lyse des bactéries où les LPS sont libérés et vont exercer une activité cytotoxique sur de nombreuses cellules de l'organisme.

En dépit de la constance de la portion lipidique, similaire à celle des autres bactéries Gram négatif, le LOS des NTHi contient de courtes séquences de chaînes d'oligosaccharides par comparaison aux autres bactéries de la famille des entérobactéries (23).

La structure des souches d'*H. influenzae* est très hétérogène malgré une absence de spécificité O. Au moins dix sérotypes de LOS ont été identifiés. Cependant, certains épitopes d'oligosaccharides ne varient pas chez différentes espèces d'*H. influenzae*, de *Neisseria* et de *Branhamella* (28, 14).

Fonctionnellement, le LOS des *Haemophilus spp* apparaît très similaire au LPS purifié des entérobactéries.

Certains variants de LOS d'*H. influenzae* possèdent des résidus de phosphocholine qui affaibliraient leur flexibilité immunologique et les rendraient plus susceptibles face à l'activité bactéricide du sérum humain (28).

III-2-5- Les autres protéines de surface

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide –sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) des souches d'*H. influenzae* encapsulées et non encapsulées montre jusqu'à 36 protéines parmi lesquelles 6 représentent des protéines majeures.

Ces protéines majeures ont un poids moléculaire compris entre 50 000 et 15 000 Da et sont typées de P1 à P6 (52) ou de a à f (49) dans l'ordre de décroissance du poids moléculaire.

Les protéines des souches d'*H. influenzae* non typables présentent une plus grande variabilité au niveau de la migration par rapport à celles des souches d'*H. influenzae* b. Mais la même terminologie générale est transposée aux NTHi.

Ces protéines d'adhésion sont identifiées à cause de leur capacité fonctionnelle à promouvoir l'adhésion des souches d'*H. influenzae* au niveau des cellules épithéliales humaines (25).

Chez les NTHi, il a été identifié deux adhésines à haut poids moléculaire dénommées HMW₁ et HMW₂. Chaque souche de NTHi peut exprimer l'une ou l'autre, ou les deux à la fois.

Certaines souches n'expriment ni l'une ni l'autre et disposent en lieu et place une protéine appelée Hia.

III-2-6- Captation du fer (64)

H. influenzae possède un récepteur à la transferrine et à la lactoferrine lui permettant de capter le fer chélaté à ces deux transporteurs. En effet, le fer à l'état libre n'est présent dans l'organisme qu'à des concentrations bien inférieures aux besoins exigés pour la croissance des bactéries (66).

D'autres systèmes ont été signalés : il s'agit des Tbps (transferrin binding proteins) et d'une protéine liant l'hémopexine. La diversité des mécanismes mis en œuvre pour l'acquisition de fer permettrait aux *H. influenzae* d'être plus flexibles afin de mieux s'adapter à leur environnement.

IV- Mécanisme de colonisation

Les infections à *H. influenzae* commencent par une colonisation de la muqueuse pharyngée ou des voies respiratoires supérieures souvent favorisée par une infection virale intercurrente. Survient alors une extension avec réactions inflammatoires. Si les défenses sont efficaces et la souche pas ou peu virulente, l'infection restera localisée ; sinon les ganglions lymphatiques sont envahis, ce qui entraîne une extension bactérienne et systémique. Pour les NTHi, ce mécanisme comporte trois phases.

IV-1- Interactions avec la mucine

Les mucines sont des glycoprotéines ayant comme principales fonctions biologiques au niveau des voies aériennes de conduction :

- La protection de l'épithélium en tant que composant du mucus,
- Le captage, en tant que sites récepteurs, des bactéries et des virus afin de favoriser leurs éliminations par l'activité ciliaire.

Certaines protéines de la membrane externe (OMPs) des NTHi telles que la P2 et la P5 et maintenant une protéine de poids moléculaire compris entre 21 et 31 kDa ont la capacité de se lier à l'acide sialique contenu dans la mucine (sialomucine) au niveau du nasopharynx et d'entamer ainsi le processus de la colonisation (60) .

Les acides sialiques les plus connus sont l'acide N-acétylneuramique (NANA) et l'acide N-glycosylneuramique. NANA a été retrouvé sur le LOS de *H. influenzae* (50). La caractéristique de ce NANA est qu'il peut être produit de façon endogène par la bactérie ou recruté de façon exogène (72). Un mécanisme de transfert de NANA de l'hôte jusqu'à la surface bactérienne a été démontré pour *H. influenzae* (50).

Une fois dans la circulation sanguine, cette capacité de se lier à la mucine subit un rétrocontrôle négatif au profit d'un rétrocontrôle positif en faveur d'une liaison avec la lactoferrine (28).

IV-2- Interactions avec les surfaces des mammifères

La colonisation de l'hôte par la bactérie dépend de ses interactions avec les cellules (épithéliales, endothéliales ou phagocytaires). Ces interactions impliquent l'adhérence des bactéries qui sera éventuellement suivie par l'invasion ou l'endommagement des cellules. La présence de polysaccharides chargés confère chez certaines bactéries comme Hib une surface hydrophile à la bactérie, ce qui contribue à réduire la phagocytose (1).

Les NTHi peuvent interagir avec les structures superficielles des cellules de mammifères, contenant des glycoprotéines apparentées au sulfate d'héparine. Ceci leur permet de se lier à plusieurs variétés de cellules de mammifères, y compris les phagocytes mononucléés.

Par ce biais, les NTHi vont coloniser les sites des tissus endommagés et envahir les tissus sous-épithéliaux.

HMW1 a plus d'aptitude à se lier spécifiquement aux cellules oropharyngées tandis que HMW2 a plus d'affinités avec les cellules du tractus génital. Ceci permet aux NTHi selon le degré d'expression de l'une de ces protéines, de s'orienter vers l'un ou l'autre des deux tractus.

Pour la molécule de piline, la liaison avec les cellules épithéliales oropharyngées a seulement lieu au niveau des structures de lactosylcéramide contenant l'acide sialique in vitro.

Les NTHi se lient également à l'asialoglycosphingolipide rencontré en grande quantité au niveau du tractus respiratoire. L'abondance de ces sites au niveau du tractus respiratoire expliquerait en partie le commensalisme de la bactérie.

Un réarrangement au niveau du gène codant pour la fimbriae diminue , mais n'élimine pas la capacité d'adhérence de la bactérie aux cellules oropharyngées in vitro.

IV-3- Le LOS

Son degré d'implication aux interactions avec l'hôte est multifactoriel. Le LOS des espèces d'*Haemophilus* est un antigène majeur de surface et représente environ 4 % du poids sec de la bactérie (25). L'hétérogénéité de structure entre le LOS au niveau des souches contribue à l'évasion des *Haemophilus* vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte (13).

La présence de NANA au niveau du LOS de *H. influenzae* (50), sa production et/ou son recrutement de façon exogène (72), offrirait à la bactérie plusieurs atouts. D'abord, l'arrangement spatial et les aspects des sites antigéniques (65) ; ensuite NANA pourrait permettre à la bactérie de mimer les cellules de l'hôte et d'échapper ainsi aux systèmes de défense immunitaire (51).

V- Mécanisme d'échappement

Pour son bon fonctionnement, l'organisme humain dispose de systèmes de défense immunitaire inné ou acquis.

Les bactéries mettent en œuvre un ensemble de mécanismes qui leur permettent soit de coexister avec l'hôte, soit de prendre le dessus sur ces systèmes de défense engendrant la maladie.

V-1- Les IgA protéases

Les souches d '*H. influenzae* peuvent produire trois types d'IgA protéases. Chacun de ces trois peut cliver l'IgA₁ dans sa région charnière. Le clivage de la

chaîne lourde conduit à un fragment Fab monomérique qui perd sa capacité à se lier à l'Ag et à un fragment Fc mono ou dimérique qui perd ses fonctions biologiques (59). Le fragment Fab peut tout de même conserver et performer une fonction de neutralisation partielle, qui peut altérer le pouvoir d'adhésion des NTHi aux cellules de l'hôte. La majorité des souches d'*H. influenzae* encapsulées produit seulement l'un de ces trois types d'IgA₁ protéases. A l'opposé, les souches de NTHi produisent des protéases différent de chacun de ces trois types.

Les IgA₁ protéases produites par les souches d'*H. influenzae* sont antigéniquement très variées. Plus de 30 types antigéniques ont été reconnus (60). Ce polymorphisme est plus prononcé chez les NTHi que chez les souches encapsulées.

Les souches de NTHi colonisant les voies respiratoires basses pourraient développer une capacité de modifier la structure de leur IgA1 protéase devant toute pression immunologique de l'hôte.

V-2- Pénétration à l'intérieur des cellules épithéliales (42)

William et coll (77) ont démontré que la présence d'une capsule sur *H. influenzae b* aiderait la survie intracellulaire de la bactérie et lui permettrait même de se diviser.

Habituellement, les souches de NTHi ne sont pas invasives mais elles peuvent l'être. Elles seraient alors capables, pour éviter le système immunitaire de l'hôte, de pénétrer sa cellule. Cependant leur survie intracellulaire reste à être élucidée. Cette pénétration intracellulaire s'accompagne d'un envahissement des points nécrotiques et des jonctions cellules-cellules.

V-3- Variation antigénique

Si un mécanisme de modification capsulaire a été proposé pour *H. influenzae* b (46), les souches NTHi ont aussi démontré, par leur commensalisme et leur pathogénie, leur capacité à profiter de ce système de variation antigénique.

Il existe une grande hétérogénéité au niveau des protéines de la membrane externe (OMPs). Des otites moyennes récurrentes chez l'homme ont pu être causées par des souches de NTHi avec seulement des changements mineurs au niveau de leurs OMPs (53).

Il a été démontré chez des patients au cours d'une étude récente l'existence concomitante d'infections dues aux NTHi et d'anticorps spécifiques dans leurs crachats et leurs sérums.

Le développement d'une dérive antigénique au niveau de l'épitope immunodominant de la protéine P2 par de petites modifications dans la composition des acides aminés au niveau de la région variable, permet aux NTHi d'éviter l'action lytique du complément..

Les protéines P1 et P5 sont les cibles d'anticorps bactéricides chez l'hôte humain. Elles ont démontré leur capacité à varier pour éviter les réponses du système immunitaire pendant la persistance de l'infection (8).

Ces variations antigéniques permettent aux NTHi de survivre pendant longtemps chez l'hôte malgré une réponse immune originellement adéquate.

VI- Composant des antigènes d'intérêt

La sécrétion de certaines substances et/ou la présence d'adhésines sont des facteurs très importants pour l'établissement d'une niche, aussi bien pour les souches capsulées que pour celles non capsulées d'*H. influenzae*, au niveau des cellules ciliées du tractus respiratoire (21, 2). Les protéines de la membrane externe (OMPs), par leurs propriétés antigéniques, pourraient être utilisées pour prévenir cette colonisation et les infections subséquentes.

La membrane externe de *H. influenzae* est très similaire à celle de la majorité des bacilles Gram négatif avec comme composants : des phospholipides, du LOS, du peptidoglycane et des protéines. Cependant *H. influenzae* a une membrane cytoplasmique plus fragile, entourée d'une membrane externe très plissée (ridée) (17).

VI-1- OMPs : Protéines de la membrane externe

L'intérêt de l'étude des OMPs réside dans leurs qualités antigéniques qui font d'elles de potentielles candidates pour la production de vaccin et la possibilité du sous-typage des NTHi (15, 16, 32, 40).

VI-1-1- Protéines majeures de la membrane externe

La protéine P1 ou protéine a, est un protéine de surface thermomodifiable présente à la fois chez *H. influenzae* b et les NTHi. A la température ambiante, son poids moléculaire est de 35 kDa tandis que chauffée à 100 °C, son PM est compris entre 46 et 50 kDa (8).

Il existe une variabilité significative au niveau de la séquence de protéines primaires de la région variable de P1.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'identifier jusqu'à huit (8) épitopes au niveau de la P1 de *H. influenzae* b.

Actuellement, les potentialités de P1 comme candidat intéressant pour un vaccin ont montré des résultats mixtes chez l'animal surtout pour l'élimination des souches hétérogènes.

P2 ou protéine b/c est également présente chez les *H. influenzae* b et les NTHi. Son poids moléculaire varie de 36 à 46 kDa (25, 54). Cette protéine existe sous forme de trimère et fonctionne comme une porine pouvant laisser passer les molécules jusqu'à 1000 Da, à travers la membrane (18).

La clairance induite par P2 chez les souches homologues est moins importante que celle induite par P1 ou P6.

La protéine P4 ou protéine e est une lipoprotéine de 28 à 30 kDa qu'on pense retrouver à la fois chez les souches capsulées que chez les NTHi (49). Cette lipoprotéine aurait un intérêt très mineur quant à la prévention contre la colonisation. Toutefois, P4 serait essentielle pour l'utilisation de l'hémine, de la protoporphyrine IX ou de l'hémoglobine comme source exclusive de protoporphyrine (61).

La protéine P5 ou protéine d est une protéine thermomodifiable de 27kDa. P5 semble être une adhésine de pili chez les NTHi.

Après immunisation passive ou active, la capacité de P5 à induire une protection partielle contre les souches homologues a été prouvée chez le chinchilla lors d'un modèle d'otite moyenne.

L'immunisation par voie parentérale soit avec P5, soit avec un peptide synthétique de P5 lié à un épitope de la cellule T (appelée LB1) augmente significativement l'élimination des souches de NTHi du nasopharynx chez le chinchilla.

L'immunisation par voie parentérale à l'aide d'une piline de P5 accroît l'élimination des souches hétérologues lors d'un modèle d'otite moyenne chez le chinchilla (6).

P6 ou protéine g est une lipoprotéine de 16 kDa présente chez *H. influenzae* b et les NTHi (49). Une immunisation avec P6 seule par voie parentérale est capable d'induire la production d'anticorps bactéricides aussi bien contre les souches hétérologues que contre les souches homologues de NTHi. Elle peut être aussi partiellement protectrice contre l'otite moyenne chez le chinchilla (20).

P6 serait un candidat intéressant pour un vaccin contre les *H. influenzae* non b.

Les protéines HMW1 et HMW2 identifiées par Barenkamp et Bodor (7) sont les adhésines majeures des souches NTHi pour les cellules épithéliales, les cellules mononucléées et les matrices extracellulaires. Ces deux protéines fournissent une protection partielle contre l'infection chez le chinchilla au cours d'un modèle d'otite moyenne (70).

L'identification d'une seconde famille de protéines à haut poids moléculaire Hia (114 kDa) codées par le gène hia a poussé Barenkamp et St-Geme à proposer un vaccin composé de HMW1-HMW2 et Hia. Cette association pourrait procurer une protection contre toutes les souches de NTHi (69).

VI-1-2- Protéines mineures de la membrane externe (mOMPs)

Certaines mOMPs ont été identifiées comme potentiellement immunogènes pour les hôtes mammifères. Ce sont principalement l'OMP26, la D15, les Tbps (1 et 2) et L'HxuA.

L'OMP 26 est une protéine de 26 kDa qui après immunisation par les muqueuses favorise l'élimination des souches homologues et hétérologues des NTHi chez un modèle pulmonaire de rat.

La D15 est une protéine de masse moléculaire de 103 kDa. La présence du gène d15 au niveau de plusieurs sérotypes et de NTHi a été démontrée. La protection d'anticorps anti-D15 a été signalée chez 8/9 sérum d'enfants en convalescence (71).

Des anticorps contre la protéine D15 recombinée seraient protecteurs contre des souches homologues ou hétérologues de NTHi.

Les protéines liant la transferrine (Tbps) ont aussi suscitées beaucoup d'intérêt lors des études d'*Haemophilus spp* (74). Il s'agit aujourd'hui de deux Tbps : le « Iron-repressible Tbp 1 » avec un PM de 100 kDa hautement conservé chez les hib et les NTHi et le Tbp2, très variable avec un PM proche de 85 kDa.

Ces Tbps sont nécessaires mais pas indispensables pour l'acquisition de fer chez les *H. influenzae*. En effet, la majorité des souches de NTHi utilise plusieurs mécanismes pour obtenir du fer (33).

Les Tbps ont été proposées en raison de leur statut de candidat vaccin : elles sont essentielles dans la majorité des cas de maladies invasives, mais aussi à cause de la présence d'anticorps anti-Tbps 1 et Tbps2 (35) dans les sérum des patients en convalescence et dans 6/8 sérum sains (36).

Les NTHi et Hib sécrètent une protéine de 100 kDa liant l'hémopexine sous une forme soluble capable de fournir de l'hème comme nutriment pour la croissance de la bactérie. Cette protéine est également immunogène (31).

VI-2- Le lipooligosaccharide (12)

La capacité de protection des anticorps anti-LOS contre les infections est assez limitée. Ceci est dû à la grande hétérogénéité structurale du LOS (58) entre les souches d'une part et d'autre part pendant la phase de croissance de chaque bactérie (76, 67). Ceci rend ainsi difficile l'obtention d'un épitope du LOS commun à toutes les souches d'*Haemophilus* (28).

L'immunisation à partir du complexe (LOS détoxifié – HMW) s'est révélée hautement protectrice chez la souris et le lapin (30).

Ces études devraient être poursuivies chez des modèles d'otite moyenne et de pneumonie chez l'homme.

VII-Caractères bactériologiques

VII-1- Morphologie microscopique

Dans un produit pathologique, ou dans une culture, *H. influenzae* apparaît sous la forme d'un bacille Gram négatif, immobile, non sporulé, de petite taille

(0,5 à 2,4 μ sur 0,2 μ), polymorphe, souvent coccobacillaire, parfois filamenteux.

Le polymorphisme s'accentue dans une culture âgée. Certaines souches peuvent présenter une capsule.

VII-2- Caractères culturaux

VII-2-1- Exigences en facteurs de croissance

H. influenzae ne peut pousser que sur des milieux de culture enrichis en facteurs V et X. Le facteur V, thermolabile est constitué par :

- soit du NAD (Nicotinamide adénine dinucléotide) ou DPN (Diphosphonucléotide) ou coenzyme I ;
- soit du NADP (NAD-phosphate) ou TPN (triphosphonucléotide) ou coenzyme II.

Ce sont des coenzymes des déshydrogénases qui sont présentes dans les globules rouges, les tissus animaux et végétaux et chez la plupart des bactéries.

Le facteur X, thermostable, est constitué par l'hémine (ou hématine) qui est un composé tétrapyrrrolique contenant le fer, dérivé de l'hémoglobine et des enzymes de la chaîne respiratoire (cytochrome, catalase, peroxydase).

Cette double exigence permet de distinguer *H. influenzae* d'autres espèces notamment *H. parainfluenzae*. (cf tableau I)

VII-2-2- Milieux de culture

Divers milieux sont utilisés :

- gélose au sang ordinaire (GSO) : le sang de cheval, de lapin, de cobaye ou de rat donne de bons résultats,

- Gélose au sang cuit (GSC),
- Milieu de Levinthal,
- Haemophilus test medium (HTM),
- Milieux sélectifs,

La recherche de *Haemophilus* dans les produits pathologiques polymicrobiens provenant du tractus respiratoire (sécrétions bronchiques, prélèvements pharyngés et ORL) demande des milieux sélectifs.

Différents milieux ont été proposés, contenant des antibiotiques qui inhibent la croissance de la plupart des bactéries de la flore pharyngée, en particulier celle des bactéries Gram positif : bacitracine (300 mg/l) ; bacitracine et cloxacilline ; vancomycine ; bacitracine et clindamycine ; etc.

VII-2-3- Conditions de culture

L'incubation doit être faite à une température optimale de 35 – 37 °C et la croissance est habituellement meilleure en atmosphère ordinaire qu'en anaérobiose. Cette croissance est favorisée par une atmosphère enrichie en CO₂, et par la forte humidité ambiante obtenue dans un système clos (jarre ou incubateur à CO₂). Ce besoin d'humidité sera satisfait en utilisant des milieux fraîchement préparés n'ayant pas encore subi de déshydratation.

VII-2-4- Aspect macroscopique des colonies (19)

Sur gélose au sang, les colonies sont petites, fines, transparentes, parfois difficilement visibles en 18 heures. Sur le milieu approprié, après 18 heures d'incubation, les colonies d'*H. influenzae* ont un diamètre de 1 mm et augmentent de taille en 48 heures.

VII-2-5- Caractères biochimiques

H. influenzae possède une catalase et une oxydase. Il fermente le glucose, le maltose, le ribose et le xylose mais pas le lactose ou le saccharose. Des tests biochimiques permettent de séparer 8 biotypes numérotés de I à VIII. Le biotype I est le plus fréquemment isolé. (cf tableaux I et II)

Tableau I : Caractères différentiels d'*Haemophilus* (19)

	Besoins		Hémolyse du sang de cheval	Fermentation				Catalase	Stimulation de la croissance par du CO ₂
	Facteur X	Facteur V		Glucose	Sucrose	Lactose	Mannose		
<i>H. influenzae</i> ^b	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	+	+	-	+	V	V
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	F	F	-	-	V	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+

b : le biotype aegyptius inclus

V : caractère variable

F : faible réaction de fermentation

**Tableau II : Différenciation des biotypes d '*H. influenzae*
et d '*H. parainfluenzae* (19)**

Espèces et biotypes	Indole	Uréase	Ornithine décarboxylase
<i>H. influenzae</i>			
Biotype I	+	+	+
Biotype II	+	+	-
Biotype III ^a	-	+	-
Biotype IV	-	+	+
Biotype V	+	-	+
Biotype VI	-	-	+
Biotype VII	+	-	-
Biotype VIII	-	-	-
<i>H. Parainfluenzae</i>			
Biotype I	-	-	+
Biotype II	-	+	+
Biotype III	-	+	-
Biotype IV	+	+	+
Biotype V	+	-	+
Biotype VI	+	+	-
Biotype VII	+	-	-

a: le biotype III d'*H. influenzae* et le biotype *aegyptius* d'*H. influenzae* peuvent être différenciés par l'analyse des profils de la membrane externe.

DEUXIÈME PARTIE :
TRAVAIL PERSONNEL

I- Bactériologie

I-1- Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé à l'unité de recherche et de biotechnologie bactérienne du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec

I-2- Matériel

I-2-1- Origine des souches

Ces souches ont été isolées chez des patients, d'août 1999 à avril 2002 dans les structures suivantes :

- service de pneumo-phtysiologie du CHU de Fann
- clinique des maladies infectieuses du CHU de Fann
- Hôpital d'Enfants Albert Royer (HEAR)
- Secteur privé (cabinets médicaux et médecine du travail)
- Hôpital Ibn Rochd (Casablanca)

I-2-2- Matériel pour l'isolement et l'identification

- gélose au sang cuit
- bouillon Schaedler
- eau distillée
- sang de cheval
- anse de platine
- boîtes de Pétri
- bacitracine

- polyvitex®
- jarre d'incubation
- générateur de CO₂ ou bougie
- étuve à 37 °C
- autoclave

I-2-3- Matériel pour conservation

- cryotubes Nunc
- bouillon cœur cervelle (BCC)
- lait écrémé
- glycérol

I-3- Méthodes

I-3-1- Méthode d'isolement

Les souches utilisées dans le cadre de notre étude ont été des souches qui avaient été congelées à – 70 °C. Pour réisoler ces souches, nous les avons repiquées sur gélose au sang cuit additionné de supplément polyvitaminé « Polyvitex® » et d'un inhibiteur , la bacitracine, pour rendre sélectif le milieu. L'incubation a été effectuée à l'étuve, à 37 °C, sous CO₂, pendant 24 à 48 heures.

Les souches d' *H. influenzae* se présentaient sous forme de colonies lisses, rondes, bombées ou de colonies muqueuses, volumineuses ayant tendance à s'étaler.

I-3-2- Conservation

Les souches ont été conservées dans du bouillon cœur cervelle avec 15 % de glycérol et dans du lait écrémé.

Environ 10 à 20 colonies ont été mises en suspension dans 1 ml de milieu de conservation contenu dans un cryotube Nunc. Les cryotubes ont été ensuite conservés au congélateur, à – 70 °C.

II- Entretien des cellules PS par trypsinisation

II-1- Cadre de l'étude

Ces manipulations ont été effectuées en concomitance au niveau du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) et au niveau de l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne.

II-2- But et domaine d'application

Les cellules PS sont issues du rein de porc présentant une infection totale par le virus de la peste porcine.

La trypsinisation a permis l'entretien des cellules en vue de la détermination de la capacité d'adhésion des souches de NTHi isolées. La trypsine est une enzyme de digestion des liaisons cellules-cellules. Son activité est fonction :

- de la température (elle est plus active à 37 °C),
- du pH (elle est plus active en milieu alcalin),
- de sa conservation (le vieillissement induit une baisse d'activité),
- du temps de contact trypsine-cellules.

Son activité est bloquée par le sérum de veau fœtal (SVF). Son action est plus rapide sur le tapis cellulaire d'une culture jeune.

L'EDTA a permis de décoller les cellules.

II-3- Matériel

- hotte à flux laminaire
- étuve à 37 °C
- microscope inversé
- microscope ordinaire
- flacon pour culture cellulaire
- cristallisoir
- erlenmeyer
- pipettes de 5 et 10 ml
- pipet-aid
- milieu L15 + 8 % de SVF + 1 % d'AB (prêt à l'emploi)
- trypsine prêt à l'emploi
- cellule de Mallassez
- pipette Pasteur capillaire
- papier buvard

II-4- Méthodes

II-4-1- Préparation du matériel

- Sortir les flacons du réfrigérateur (flacons de milieu de croissance et de trypsine).
- Sortir de l'étuve un flacon de culture cellulaire dont le tapis est confluent.

II-4-2- Manipulation

- Vider le surnageant cellulaire dans un bécher contenant de l'eau de Javel.
- Prélever à l'aide d'une pipette 4 à 8 ml de trypsine selon les dimensions de la boîte.
- Laisser en contact la trypsine et le tapis cellulaire pendant 1 minute.
- Rejeter la trypsine et la remplacer par un volume plus faible de trypsine.
- Laisser en contact pendant 30secondes environ.
- Rejeter la trypsine en laissant un fin film à la surface des cellules.
- Pour accélérer la digestion, placer le flacon à l'étuve pendant 2 minutes.
- Sortir le flacon de l'étuve et lorsqu'il se forme des plages (lorsqu'on incline le flacon), tapoter bien le flacon pour décoller les cellules.
- Vérifier au microscope inversé la séparation et le décollement des cellules.
- Prélever de l'rlenmeyer (préalablement préparé et contenant 10 à 20 ml de milieu de croissance) 5 à 10 ml.
- Dissocier les cellules les unes des autres en refoulant les 5 à 10ml sur le plancher de la boîte puis enchaîner avec une succession d'aspirations et de refoulements. Eviter la formation de bulles d'air (mousse) dans la boîte à trypsiner.
- Après décollement et dissociation, prélever la totalité de la suspension cellulaire ainsi obtenue pour faire retomber une quantité voulue (0,5 à 3 ml) selon la concentration obtenue.

Remarque :

En entretien courant :

- 1 flacon de 175 ml reçoit 5 ml de suspension cellulaire et 45 ml de milieu de croissance.

- 1 flacon de 80 ml reçoit 2 ml de suspension cellulaire et 18 ml de milieu de croissance.

Il est recommandé de ne pas réaliser plus de 4 passages dans le même flacon afin d'éviter un vieillissement précoce des cellules.

II-4-3- Numération et test de viabilité

II-4-3-1- Principe du test de viabilité (3)

Test d'exclusion des colorants vitaux (exemple du Bleu Trypan) :

Les cellules vivantes et en bon état sont imperméables à ces colorants. Le pourcentage de cellules non colorées représente l'indice ou le pourcentage de viabilité des cellules.

II-4-3-2- Technique

- Bien homogénéiser la suspension cellulaire et en prélever une quantité pour faire une dilution dans une solution de Bleu Trypan
- En prélever une petite quantité avec une pipette Pasteur capillaire
- Appliquer le bout de la pipette entre la lame et la lamelle de l'hémocytomètre: le liquide est aspiré par capillarité et couvre la surface de numération délimitant un volume donné.
- Avec un papier buvard, aspirer l'excès de liquide qui déborde.
- Examiner au microscope (X10) et compter les cellules en prenant en compte que les cellules incolores.

II-4-3-3- Expression des résultats

Elle est exprimée en pourcentage de cellules viables ou en indice de viabilité.

III- Réalisation de l'épreuve d'adhésion cellulaire

III-1- Cadre de l'étude

Ces manipulations ont été également effectuées au niveau du LNCM, à la section microbiologie.

III-2- Matériel

En plus du matériel pour la trypsinisation, ont été utilisés :

- tubes à essai
- portoir pour tubes à essai
- anse de platine
- lame de verre
- plaque de 24 cupules stériles
- méthanol
- D-mannose
- Tampons : PBS A, PBS et HBS
- Giemsa rapide
- Pipette aid
- Pipette ependorf
- Pipettes de 1, 5 et 10 ml
- Verre à pied contenant de l'eau de Javel (détergent)
- Hotte à flux laminaire.

III-3- Schéma général de l'épreuve d'adhésion

III-3-1- Mise en culture des bactéries

Les souches conservées dans du BCC ou dans du lait écrémé, ont été ensemencées dans du bouillon Schaedler additionné de polyvitex® et de bacitracine à raison de 5 ml par tube à vis.

Des témoins négatifs ont été effectués par l'ajout de 1 % de D-mannose. L'incubation s'est déroulée sous 5 % de CO₂ pendant 18 heures. Sans agiter les cultures.

III-3-2- Préparation des chambres de culture

- Rincer les chambres de culture vides avec 200 µl de solution de sel EBS ou HBS ou PBS A.
- Distribuer dans chaque puits de 2,5 cm de diamètre 1 ml de suspension cellulaire (à 4.10⁵ cellules/ml) dans le milieu de base L15 + SVF.
- Incuber à 37 °C pendant 18 heures
- Afin de réaliser l'épreuve du pouvoir d'adhésion cellulaire, la confluence maximale doit être de 50 %.

III-3-3- Préparation de suspensions bactériennes
à 10^8 bactéries / ml dans du PBS

A partir des cultures sur bouillon :

Suspension diluée	1/10	1/20
Culture bactérienne (bouillon)	50 µl	25 µl
PBS	450 µl	475 µl
(+ 1% de D-mannose)		

III-3-4- Lavage des chambres de culture

- Vider les chambres de culture cellulaire de leur milieu par retournement
- Laver 2 fois avec une solution de PBS A
- Puis vider

Cette étape permet l'élimination des antibiotiques utilisés dans le milieu de culture.

III-3-5- Epreuve des puits

- Eprouver chaque puits (souche) avec 0,5 ml de la suspension bactérienne dans du PBS (avec $MgCl_2$ et $CaCl_2$)

III-3-6- Incubation

- Incuber à 37 °C sous 5 % de CO_2 pendant 1 heure en évitant les contaminations

III-3-7- Lavage pour l'élimination des bactéries non adhésives

- Vider les chambres de culture.
- Laver avec une solution de sel PBS.
- Eviter de diriger le jet directement vers le tapis cellulaire (pour ne pas le décoller).

III-3-8- Coloration au Bleu Trypan

- Diluer 10 µl de suspension cellulaire avec 90 µl de Bleu Trypan à 1 pour 1000 additionnée d'1 volume d'une solution de Hanks hypertonique.

III-3-9- Lecture au microscope à contraste de phase

- Contrôle négatif :

Absence d'adhésion des bactéries aux cellules (efficacité de l'inhibition des pili de type I par le D-mannose)

- Lecture des résultats :

Adhésion aux cellules PS : les bactéries sont fixées à la surface des cellules non confluentes.

TROISIEME PARTIE :

RESULTATS

I- Flore bactérienne isolée

Nous avons travaillé sur 11 souches d'*Haemophilus* antérieurement isolées et conservées à – 70 °C dans du lait écrémé et dans du BCC.

Les souches isolées se sont réparties comme suit :

- 5 souches d'*Haemophilus* d'origine locale
- 5 souches d'*Haemophilus influenzae* d'origine marocaine
- 1 souche d'*Haemophilus influenzae* AT CC 1923.

I-1- Répartition globale des souches

Tableau III : Répartition des souches isolées

	Nombre	Pourcentage (%)
<i>H. influenzae</i> ATCC	1	9
NTHi	9	82
<i>H. parainfluenzae</i>	1	9

Une souche d'*H. parainfluenzae* a été isolée. LES NTHi représentent la majorité des souches isolées, soit 82 % (voir tableau III).

I-2- Répartition des souches isolées selon l'origine

Tableau IV : Répartition des souches isolées selon l'origine

	<i>H. influenzae</i> b	<i>H. parainfluenzae</i>	NTHi	Total
HALD			2 (18 %)	2
CHU de Fann		1 (9 %)	2 (18 %)	3
Ibn Rochd (Maroc)			5 (46 %)	5
ATCC	1 (9 %)			1
Total	1	1	9	11

- 18 % des souches de NTHi venaient de HALD.
- 27 % des souches provenaient du CHU de Fann avec 9 % de *H. parainfluenzae* et 18 % de NTHi.
- 46 % des souches isolées ont été d'origine marocaine.

I-3- Répartition des souches selon l'infection, l'âge et l'origine

Tableau V : Répartition des souches selon l'infection, l'âge et l'origine

		Enfant < 3 ans		Adulte		Total
		Ibn Rochd	IRB	Ibn Rochd	IRB	
Infections ORL	Ibn Rochd	3				3
	IRB					
Infections respiratoires	Ibn Rochd			2		
	IRB				5	7
Total		3 (30 %)		7 (70 %)		10

IRB : Infections respiratoires basses (CHU Fann et CHU HALD)

Dans notre échantillon, ce sont les souches isolées d'infections respiratoires basses qui ont été les plus représentatives (soit 70 %) dont 29 % d'origine marocaine et 71 % d'origine IRB (Fann et HALD).

Les souches isolées à partir d'infection ORL représentent 30 % et sont d'origine marocaine.

Les souches d' *Haemophilus* isolées sont retrouvées plus chez l'adulte (70 %) que chez l'enfant (30 %).

II- Adhérence des souches d' *Haemophilus* aux cellules PS

Tableau VI : Résultats du test d'adhérence

	Adhérence	
	En présence de D-mannose	En l'absence de D-mannose
NTHi	9	9 (82 %)
<i>H. influenzae</i> ATCC	1	1 (9 %)
<i>H. parainfluenzae</i>	1	1 (9 %)

Toutes les souches d' *H. influenzae* non typables (NTHi), soit 82 % des souches isolées, ont été positives.

Il en était de même des souches Hib ATCC 1923 et *H. parainfluenzae* qui représentaient chacune 9 % des souches testées.

Ces résultats n'ont pas varié qualitativement selon la présence ou l'absence de D-mannose.

QUATRIÈME PARTIE :

DISCUSSIONS

I- Les souches d'*Haemophilus*

Les souches que nous avons étudiées ont été collectées au cours de l'année 1997 (souches du Maroc) d'une part et d'autre part dans la période de 1999 à 2000 pour les souches isolées d'infections respiratoires basses (IRB).

La conservation a été faite à – 70 °C en bouillon cœur cervelle ou dans du lait écrémé additionné de 10 % de glycérol.

I-1- Isolement et contrôle de qualité

Les *Haemophilus* sont des germes fragiles, difficiles à cultiver et à conserver. La culture sur gélose au sang cuit (GSC) enrichie de polyvitex® et additionnée de bacitracine nous a permis d'effectuer l'isolement.

Le contrôle de qualité réalisé à l'aide de la souche de référence *Haemophilus influenzae* b ATCC 1923, nous a permis de valider les tests d'identification.

I-2- Répartition des souches

Nous avons isolé au total 10 souches d'*Haemophilus influenzae* dont cinq (5) d'origine marocaine, précisément de l'Hôpital Ibn Rochd de Casablanca et cinq (5) autres d'origine locale isolées d'infections respiratoires basses aux CHU de Fann et de HALD.

La fragilité du germe a rendu la collecte difficile, ce qui explique le faible nombre de notre série. A titre d'exemple, un seul rayon de soleil est capable de tuer la bactérie (19).

La majorité des souches a été isolée chez l'adulte (70 %) et à partir de prélèvements d'IRB (expectorations de bronchopneumonie, bronchites aiguës, rhinobronchites, toux grasse).

Les 30 % des souches restantes ont été isolées à partir de la sphère ORL, essentiellement chez l'enfant.

Les souches d'*Haemophilus influenzae* non typables (NTHi) ont constitué la majorité des isolats, soit 82 % contre 9 % pour *Haemophilus parainfluenzae*.

Cette forte prédominance des NTHi souligne leur importance dans les infections respiratoires (5, 25) . En effet, *H. influenzae* et le pneumocoque viennent au second rang, après le virus syncytial respiratoire, chez l'enfant de moins de 2 ans (10).

Chez l'enfant plus grand, entre 2 et 10 ans, les données épidémiologiques se rapprochent de celles de l'adulte d'âge moyen. Dans ce cas, les bactéries incriminées sont outre les *Haemophilus*, *Mycoplasma pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus* (5).

ANTIPHON, à travers une étude de 1980 à 1981 regroupant tous les *Haemophilus* isolées de plusieurs centres hospitaliers français, a établi en fonction de la pathologie une répartition des souches qui montre la prédominance :

- des infections respiratoires basses (bronchites et bronchopneumopathies), urinaires et génitales chez l'adulte et
- des épiglottites, méningites, septicémies et des infections respiratoires hautes (otites, sinusites et rhinopharyngites) chez les enfants.

Haemophilus influenzae est le deuxième agent responsable de pneumopathies communautaires chez les sidéens (63).

II- Adhérence aux cellules épithéliales PS et déterminants de virulence

Nous avons testé 11 souches dont celles de référence et d'*H. parainfluenzae*. Toutes les souches ont été capables d'adhésion aux cellules épithéliales P.S. Nous n'avons pas étudié le degré d'adhésion, car l'objectif principal de cette

étude était simplement de sélectionner des souches d'*Haemophilus influenzae* non b exprimant des adhésines de pilines.

En effet, les pili de par leur spécificité, leur importance dans l'adhérence de même que par leur rôle antiphagocytaire, constituaient un facteur très intéressant à étudier.

Selon KAPLAN et coll (39), la perte ou la suppression des pili peut être un important prérequis en vue de l'invasion de l'hôte par *Haemophilus influenzae* b ayant un haut degré d'expression des pili.

C'est pourquoi avant l'épreuve, nous avons réalisé une culture en milieu liquide pour favoriser la production de pili (19, 47).

Les résultats obtenus n'ont pas été influencés de façon significative par le D-mannose.

Ces résultats témoigneraient de l'implication d'autres structures autres que les pili, dans l'adhérence.

En réalité, ces résultats, loin d'être aberrant, ne font que confirmer la variabilité des protéines d'adhésine chez *Haemophilus* principalement la capsule (25, 28, 46), les adhésines de la membrane externe (HMW₁,HMW₂, Hia) (70) et les adhésines de piline.

Selon SABLE et collaborateurs (62), d'*Haemophilus influenzae* b exprimerait deux adhésines dont l'une, une protéine de piline, aurait une grande affinité pour les cellules buccales. L'autre adhésine se lierait préférentiellement aux cellules Hep-2.

KRASAN et coll. (45), ont estimé que chez les NTHi, Hia et les adhésines HMW interviendraient à divers degrés dans la pathogénicité au cours de l'otite moyenne pendant que les pili agiraient très tôt dans le processus de colonisation.

Il serait intéressant de n'utiliser le D-mannose que pour les souches de référence n'exprimant comme adhésine que la piline.

La température d'incubation des bactéries avec les cellules pourrait être mise à profit. A 0 °C, il n'y a que l'attachement mais pas la pénétration (57).

CONCLUSION

H. influenzae fait partie de la flore commensale des voies respiratoires supérieures. Ce commensalisme représente chez l'enfant de moins de 2 ans 29 % des sujets porteurs de ce germe, 30 à 90 % chez l'enfant de plus de 2 ans et enfin 25 % chez l'adulte (5, 10) et concerne surtout les souches non capsulées.

Cette colonisation des muqueuses rhinopharyngées provoque des troubles plus ou moins importants ; certains d'entre eux sont capables selon l'état de virulence de la bactérie, des mécanismes de défense de l'hôte et éventuellement de facteurs favorisants (virus respiratoire syncytial, tabagisme, etc.) (38) de gagner d'autres organes et de provoquer des syndromes infectieux plus généraux et plus graves (otites, sinusites, infections respiratoires et méningites).

Les *Haemophilus* disposent d'un ensemble de facteurs de virulence qui leur permettent de coexister, ou d'échapper au système immune des muqueuses (37).

Au premier rang des facteurs de virulence, figurent les adhésines indispensables dans l'établissement d'une niche pour *Haemophilus influenzae*.

Nous avons isolés au cours de notre étude 10 souches provenant de malades qui souffraient soit d'infections respiratoires basses, soit d'infections de la sphère ORL.

Parmi ces souches, neuf (9) sont des *Haemophilus influenzae* non capsulées (NTHi) dont sept (7) ont été isolées chez les adultes au cours de rhinobronchites, de bronchopneumonies ou de bronchites aiguës.

Seule une souche d' *Haemophilus parainfluenzae* a été isolée chez l'adulte.

Trois (3) souches ont été isolées chez des enfants de moins de 3 ans, d'infections de la sphère ORL et ont été essentiellement des NTHi.

Après avoir isolé les souches d'*Haemophilus*, nous nous sommes attelés à réaliser l'épreuve d'adhérence sur cellule P.S.

A l'issue de cette épreuve, nous avons constaté que toutes les souches isolées étaient capables d'adhérer aux cellules P.S.

L'utilisation du D-mannose pour l'inhibition des pili de type I n'a pas influé sur les résultats obtenus.

Ces résultats témoignent de ce fait de la variabilité des adhésines codées par des gènes qui peuvent être exprimés ou pas.

Aujourd'hui, devant l'apparition de souches d'*Haemophilus* résistantes et multirésistantes à l'antibiothérapie (24) et d'infections dues à des souches non b (5, 41) jusque là insuffisamment explorées, les recherches en vue de la mise au point d'un vaccin efficace aussi bien contre les Hib que pour les *H. influenzae* non b devraient être poursuivies.

Les expériences prometteuses chez l'animal devront être adaptées chez l'homme.

De plus, dans l'attente d'un vaccin plus protecteur, une attention particulière devrait être accordée à l'allaitement maternel qui a prouvé une grande capacité de stimulation de l'immunité des muqueuses contre les infections respiratoires chez le nourrisson (34).

Chez l'adulte, l'immunisation par voie orale par un vaccin à base d'*Haemophilus influenzae* tués à des bronchiteux chroniques colonisés par cette bactérie, diminue le nombre d'épisodes de bronchites aiguës chez ces patients (5).

BIBLIOGRAPHIE

1- Absolom, R.

The role of bacterial hydrophobicity in infection : bacterial adhesion and phagocytic ingestion.

Can. J. Microbiol. 1988, 34 : 287-298.

2- Adler, K. B., D. d. Hendley, and G. S. Davis.

Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion by explants of guinea pig airways.

Am. J. Pathol. 1986, 125:501-514.

3- Adolphe M. , Barlovatz-Meimon G.

Culture de cellules animales. Méthodologies. Applications.

Les éditions INSERM, 1988.

4- Ambrosino, D. M., G. Schiffman, E. C; Gotschlich, P. H. Schur, G. A.**Rosenberg, G. G. DeLange, E. van Loghem, and G. R. Siber.**

Correlation between G2m (n) immunoglobulin allotype and human antibody response and susceptibility to polysaccharide encapsulated bacteria.

J. Clin. Invest., 1985, 75: 1935-1942.

5- Aubier M., Fournier M., Pariente R.

Pneumologie.

1998. Médecine Sciences. Flammarion

6- Bakalatz, L. O., E. R. Leake, J. M. Billy, and P. T. P. Kaumaya.

Relative immunogenicity and efficacy of two synthetic chimeric peptides of fimbrin as vaccinogens against nasopharyngeal colonization by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla.

Vaccine, 1997, 15 : 955-961.

7- Barenkamp, S. J., and F. F. Bodor.

Development of serum bactericidal activity following nontypeable *Haemophilus influenzae* acute otitis media.

Pediatr. Infect. Dis. J, 1990, 9 : 333-339.

8- Barenkamp, S. J., R. S. Munson, Jr., and D. M. Granoff.

Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles.

J. Infect. Dis., 1981, 143 : 668-676.

9- Barker, J., M. Gratten, I. Riley, D. Lehman, J. Montgomery, M. Kajoi, H. Gratten, D. Smith, T. F. D. Marshall, and M. P. Alpers.

Pneumonia in children in the eastern highlands of Papua New Guinea : a bacteriological study of patients selected by standard clinical criteria.

J. Infect. Dis., 1989, 159 : 348-352.

10- Berkovitch, M., Bulkowstein, M., Zhovtis, D., Greenberg, R., Nitzan, Y., Barzilay, B., Boldur, I..

Colonization rate of bacteria in the throat of healthy infants.

Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol., 2002, 63 (1) : 19-24.

11- Cadoz M.

General aspects of acute respiratory infections in Black Africa.

Rev Inst Pasteur Lyon, 1982, 1, 7-15.

12- Camou, T., Hortal, M., Janson, P. E., Lindbeerg A. A..

Frequencies of lipopolysaccharide-defined epitopes in *Haemophilus influenzae* type b and non-typeable isolates determined with monoclonal antibodies.

Clin. Microbiol. Infect., 1999, 5 (6) : 364-370.

13- Campagnari, A. A., M. R. Gupta, K. C. Dudas, T. F. Murphy, and M. A. Apicella.

Antigenic diversity of lipooligosaccharides of nontypeable *Haemophilus influenzae*.

Infect. Immun., 1987, 55 : 882-887.

14- Campagnari, A. A., S. M. Spinola, A. J. Lesse, Y. A. Kwaik, R. E. Mandrell, and M. A. Apicella.

Lipooligosaccharide epitopes shared among gram-negative non-enteric mucosal pathogens.

Microb. Pathog., 1990, 8: 353-362.

15- Clancy, R. L., A. W. Cripps, A. J. Husband, and D. Buckley.

Specific immune response in the respiratory tract after administration of an oral polyvalent bacterial vaccine.

Infect. Immun., 1983, 39 : 491-496.

16- Clancy, R. L., and A. W. Cripps.

Specific protection against acute bronchitis associated with nontypeable *Haemophilus influenzae*.

J. Infect. Dis, 1992, 165 : S 194-S 195.

17- Costerton, J. W., J. M. Ingram, and K. J. Cheng..

Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria.

Bacteriol. Rev., 1974, 38: 87-110.

18- Coulton, J. W., A. C. Chin, and E. R. Leake.

Recombinant porin of *Haemophilus influenzae* type b.

J. Infect. Dis., 1996, 165: S188-S191.

19- Dabernat, H., Sanson-Lepors, M. J.

Haemophilus in Le Minor, L., Veron, M. Bactériologie médicale. 2^e édition. Paris : Med. Science Flammarion. 1990, 521-544.

20- DeMaria, T. F., D. M. Murwin, and E. R. Leake.

Immunization with outer membrane protein P6 from nontypeable *Haemophilus influenzae* induces bactericidal antibody and affords protection in the chinchilla model of otitis media.

Infect. Immun., 1996, 64 : 5187-5192.

21- Denny, F. W.

Effect of a toxin produced by *Haemophilus influenzae* on ciliated respiratory epithelium.

J. Infect. Dis, 1974, 129 : 93-100.

22- Eden C.S., Shahin R., and Briles D.

Host resistance to mucosal gram-negative infection.

J Immunol, 1988, 140 : 3180-3185.

23- Flesher, A. R., and R. A. Insel.

Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*.

J. Infect. Dis., 1978, 138 : 719-729.

24- Foweraker J.R., Cooke N.J. and Hawket P.M.

Ecology of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae* in sputum and saliva and effects of antibiotics on their distribution in patient with lower respiratory tract infections.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993, 37 (4) : 804-809.

25- Foxwell-A. R., Kyd-J.M. et Cripps .

Nontypeable *Haemophilus influenzae* : pathogenesis and prevention.

Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62 (2) :294-308.

26- Friesen C.A. and Cho C.T.

Characteristic features of neonatal sepsis due to *Haemophilus influenzae*.

Rev Infect Dis, 1986, 8 : 777 –780.

27- Ghafor A.N.K., Nomani Z., Ishaq S.Z. and al.

Diagnoses of acute lower respiratory tract infections in children in Rawalpindi and Islamabad, Pakistan.

Rev Infect Dis, 1990, 12 : S907-S914.

28- Gilsdorf J.R.

Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*.

Infection and immunity, 1998, 66 (11) : 5053-5069.

29- Gilsdorf, J. R., McCrea, K. W., Marrs, C. F.

Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization.

Infect. Immun., 1997, 65 (8) : 2997-3002.

30- Gu X.X., Tsai C.M., Ueyama S.J. and al.

Synthesis, characterization, and immunologic properties of detoxified lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* conjugated to proteins.

Infect Immun, 1996, 64 : 4047-4053.

31- Guilig, P.A., McCracken G.H., Holmas P.L. and al

Immunogenic proteins in cell-free culture supernatants of

Haemophilus influenzae type b.

Infect Immun, 44:41-48.

32- Hansen, E. J., D. A. Hart, J. L. McGehee, and G. B. Toews.

Immune enhancement of pulmonary clearance off nontypeable *Haemophilus influenzae*.

Infect. Immun., 1988, 56:182-190.

33- Hardie K.R., Adams R.A. and Towner K.J.

Transferrin-binding ability of invasive and commensal isolates of

Haemophilus spp.

J Med Microbiol, 1993, 39 : 218-224.

34- Hokama, T., Yara, A., Hirayama, K., Takamina, F.. Isolation of respiratory bacterial pathogens from the throat of healthy infant-fed by different methods.

J Trop Pediatr., 1999, 45 (3) : 173-6

35- Holland J., Langford P.R., Towner K.J., and al.

Evidence for in vitro expression of transferrin-binding proteins in

Haemophilus influenzae type b.

Infect Immun, 1992, 60 : 2986-2991.

36- Holland J., Parsons T.R., Hasan A.A. and al.

Conservation and antigenic cross-reactivity of the transferrin-binding proteins of *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Neisseria meningitidis*.

Microbiology, 1996, 142 : 3505-3513.

37- Jenson, H., Carl, N. B., Cervin, A., Forsgren, A., Magnusdottir, A. B., Linddberg, S., Runer, T..

Effects on the ciliated epithelium of protein. D-producin non-typeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures.

J Infect Dis. ; 1999, 180 (3) : 737-46.

38- Jiang Z., Nagata N., Molina E., and al.

Fimbria-mediated enhanced attachment of nontypable *Haemophilus influenzae* to respiratory syncytial virus-infected respiratory epithelial cell.

Infect Immun, 1999, 67 (1) :187-92.

39- Kaplan S.L., Mason E.O., Wiederman B.L.

Role of adherence in the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* type b infection in infant rats.

Infect Immun, 1983, 42 (2), 612-617.

40- Karasic, R. B., C. E. Trumpp, H. E. Gnehm, P. A. Rice, and S. I. Pelton..

Modification of otitis media in chinchillas rechallenged with nontypeable *Haemophilus influenzae* and serological response to outer membrane antigens.

J Infect. Dis., 1985, 151 :273-279.

41- Kay, S. E., Nack, Z., Jenner, B. M..

Meningitis and septicaemia in a child caused by non-typeable *Haemophilus influenzae* biotype III.

Med J Aust, 2001, 175 (9) :484-500.

42- Ketterier M.R., Shao J.Q., Hornick D.B., and al .

Macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry.

Infect Immun, 1999, 67 (8) : 4161-70.

43- Killian M., Thomsen B., Petersen T. and al.

Occurrence and nature of bacterial IgA protease.

Ann. NY. Acad Sc, 1983; 409 : 612-624.

44- Koffi N., Ngom A., Aka-Danguy E., Mahan D.

Physionomie des pneumopathies aiguës mortelles chez l'adulte africain.

1er Congrès International de la Société Ivoirienne de Pneumophysiologie.

Abidjan, Côte d'Ivoire, 2000, 15-16 Juin.

45- Krasan G.P., Gutter D., Block S.L., St-Geme J.W. 3rd.

Haemophilus influenzae from children with acute otitis media.

Infect Immun, 1999, 67 (1), 449-54.

46- Kroll, J. S. et E. R. Moxon.. Capsulation in distantly related strains of

Haemophilus influenzae type b. genetic drift and gene transfer.

J. Bacteriol., 1990, 172: 1374-1379.

47- Le Minor L., Veron M.

Bactériologie médicale.

Med Science Flammarion, Paris, ed 1989.

48- Levayer S., Berche P.

Haemophilus influenzae : un pathogène respiratoire majeur.

Feuilles de biologie, 1996, 37 (210) : 13-16.

49- Loeb M.R., and Smith D.H.

Outer membrane protein composition in disease isolates of

Haemophilus influenzae : pathogenic and epidemiological implications.

Infect Immun, 1980, 30 : 709-717.

50- Mandrell, R. E. et M. A. Apicella..

Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS.

Immunobiology, 1993, 187: 382-402.

51- Moran A.P., Prendergast M.M, and Applemelk B.J.

Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease.

FEMS Immunol Med Microbiol, 1996, 16 : 105-15.

52- Munson R.S., Shene J.L., Barenkamp S.J.

Purification and comparison of outer membrane protein P2 from *Haemophilus influenzae* type b isolates.

J Clin Invest, 1983, 72 : 677 -684.

53- Murphy T.F., Bernstein J.M., Dryia D.M. and al.

Outer membrane and lipooligosaccharide analysis of paired nasopharyngeal and middle ear isolates in otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae* : pathogenetic and epidemiological observations.

J Infect Dis, 1987, 156 : 723-731.

54- Murphy T.F., Dudas K.C., Mylotte J.M. and Apicela M.A.

A subtyping system for nontypable *Haemophilus influenzae* based on outer membrane proteins.

J Infect Dis, 1983, 147 : 838-846.

55- Murphy T F., and sethi S.

Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease.

Am Rev Resp Dis, 1992, 146 : 1067-1083.

56- Nassif X.

Facteurs de virulence de *Haemophilus influenzae* responsables d'otites aiguës chez l'enfant.

La lettre de l'infectiologue, 1994, 9 (8) : 26-29.

57- Neidhart F.C., Ingraham J.L., Schaechter M.

Physiologie de la cellule bactérienne. Une approche moléculaire.

Enseignement des sciences de la vie, Paris : Masson, 1994.

58- Patrick, C. C., A. Kimura, M. A. Jackson, L. Hermanstorfer, A. Hood, G. H. McCracken, Jr., and E; J; Hansen.

Antigenic characterization of the oligosaccharide portion of the lipooligosaccharide of nontypeable *Haemophilus influenzae*.

Infect. Immun., 1987, 55:2902-2911.

59- Poulson K., Reinholdt J., and Kilian M.

A comparative genetic study of serologically distinct *Haemophilus influenzae* type 1 immunoglobulin A1 proteases.

J Bacteriol, 1992, 174 : 2913-2921.

60- Reddy M.S., Bernstein J.M., Murphy T.F, and faden H.S.

Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin.

Infect Immun, 1996, 64 : 1477 – 1479.

61- Reidl J., and Mekalanos J.J.

Lipoproteine (P4) essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*.

J Exp Med, 1996, 183 : 621-629.

62- Sable , N.S., Connor E., Hall C.B., and al .

Variable adherence of fimbriated *Haemophilus influenzae* type b to human cells.

Infect Immun, 1985, 48 (1) :119-123.

63- Sande M.A., Volberding P.A.

Bacterial infections in HIV disease. In: The medical management of AIDS

Philadelphia : WB Saunders Company Ed , 1993: 346-358.

64- Schaechter , Medoff, Eisenstein.

Microbiologie et pathologie infectieuse.

Bruxelles : De Boeck Université. 1999

65- Schauer, R.. Sialic acids: Chemistry, metabolism and function, vol. 10.,
New York: Springer-Verlag. 1982

66- Schryvers A.B.

Identification of the transferrin and lactoferrine binding proteins in *Haemophilus influenzae*.

J Med Microbiol, 1989, 29 : 121-130.

67- Shenep, J. L., R. S. Munson, Jr., and D. M. Granoff.

Human antibody responses to lipopolysaccharide after meningitis due to *Haemophilus influenzae* type b.

J. Infect. Dis. 1982, 145:181-190.

68- St Geme J.W., III.

Progress towards a vaccine for nontypable *Haemophilus influenzae*.

Ann Med, 1996, 28 : 31-37.

69- St Geme J. W. 3rd.

Molecular and cellular determinants of typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion.

Cell. Microbiol., 2002; 4 (4) : 191-200

70- Thomas ,W.R., Callow R.J., Dilworth and Audesho A.A.

Expression in *Escherichia coli* of a high-molecular -weight protective surface antigen found in nontypeable and type b *Haemophilus influenzae*.

Infect Immun, 1990, 58 : 1909-1913.

71- Van Putten, J. P. M. et B. D. Robertson.

Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in Neisseria.

Mol. Microbiol. 1995, 16 : 847-853.

72- Van Schilfgaarde M., Van Ulsen P., et al.

Characterization of adherence of non typeable *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells.

Infect. Immun., 2000; 68 (8) : 4658-65.

73- Vives L., Biel P., Maler G. et coll.

Pneumopathies aiguës communautaires préoccupantes ou graves explorées par fibroscopie bronchique. Analyse de 1993 cas hospitalisés en hôpital général.

Rev Mal Resp, 1996 ; 13 : 175-182.

74- Webb, D. C., Crippss A. W.

Immunization with recombinant transferrin binding protein B enhances clearance of non-typeable *Haemophilus influenzae* from the rat lung. .

Infect Immun, 1999; 67 (5) : 21382144.

75- Weiser, J. N.

Relationship between colony morphology and the life cycle of *Haemophilus influenzae*: the contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis.

J. Infect. Dis, 1993, 168 :672-680.

76- Weiser, J. N., Shchepetov, and S. T. H. Chong.. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*.

Infect. Immun. ,1997, 65:943-950.

77- **Williams, A. E., D. J. Maskell et E. R. Moxon.** Relationship between intracellular survival in macrophages and virulence of *Haemophilus influenzae* type b.

J. Infect. Dis., 1991; 163: 1366-1369.

78- **Zakrzewski, J., Bechert, T., Guggenbichler, J. P..**

IgA1 protease production by bacteria colonizing the upper respiratory tract.
Infection, 1998; 26 (2) : 116-9.

ANNEXES

ANNEXES

Composition de quelques solutions salines (en mg / l) (3)

Composant	HBS	EBS	PBS	PBS A
NaCl	8 000	6 700	8 000	8 000
KCl	400	400	200	200
NaH ₂ PO ₄ (anh)	-	-	1 150	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	150	150	-	-
NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	2 160
KH ₂ PO ₄ (anh)	-	-	200	200
NaHCO ₃	2 200	2 200	-	-
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	100	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	200	200	-	-
CaCl ₂ (anh)	-	20	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	264	-	132	-
Glucose	1 000	1 000	-	-
Rouge de phénol	10	10	-	-

HBS : sel de Hanks

EBS : sel de Earle

PBS : solution saline au phosphate de Dulbecco (contenant du Ca et du Mg)

PBS A : solution saline au phosphate de Dulbecco

Autres réactifs utilisés :

1- Solution de Bleu Trypan

Bleu Trypan	1	g
Eau distillée	100	ml

2- Solution de Hanks hypertonique

NaCl	2,55	g
HBS	100	ml

3- Solution extemporanée de Bleu Trypan

Solution de Bleu Trypan à 1 %	3 V
Solution de Hanks hypertonique	1 V

4- Trypsine – EDTA (solution mère)

Trypsine	1	g
EDTA	0,2	g
PBS A	100	ml

5- Trypsine EDTA (solution de travail)

Solution mère	5	ml
PBS A (pH 7,5)	100	ml

6- Trypsine 0,25 %

Trypsine (2,5 %)	5	ml
PBS (pH 7,5)	45	ml