



Tests Microbiens en Odontologie & Evaluation de l'inflammation

DFGSO3 2019-2020

UFR Odontologie Montpellier

PY Collart Dutilleul



Objectifs du cours :

- ✓ Connaitre les principales techniques d'identification des bactéries
- ✓ Comprendre les différentes approches diagnostiques face à une infection

1. Identification de l'Agent Pathogène

Diagnostic bactériologique:

- Identification de la souche bactérienne
- Évaluation des possibilités thérapeutiques (détermination de l'antibiotique le mieux adapté)



1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes conventionnelles

Prélèvement de bactéries vivantes (et transport vers laboratoire)

Identification fiable en quelques jours pour de nombreux genres bactériens

Parfois difficiles à mettre en œuvre

- ❖ Examen direct
- ❖ Mise en culture





1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles

❖ Examen direct

Prélèvement de salive ou de plaque

Observation immédiate au microscope, sans coloration

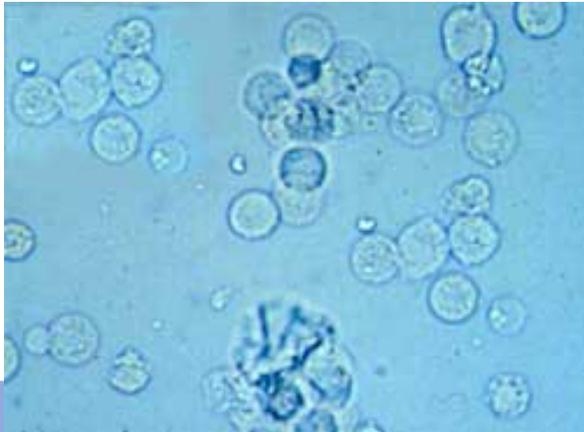
>> Morphologie, densité et mobilité des bactéries présentes

Observation directe en contraste de phase, ou en fond noir



Peu d'intérêt clinique

(le pourcentage d'espèces mobiles est corrélé à la profondeur des poches parodontales et ne renseigne pas mieux que le sondage parodontal)





1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles

❖ Mise en Culture (& Examen indirect)

Prélèvement et transport

Qualité du prélèvement et conditions de transport

Site et la quantité de matériel prélevé (=> influence les résultats)

Rmq: bactéries anaérobies strictes => conditions de transport appropriées.

Isolement

Quel est l'objectif recherché :

- Croissance préférentielle de certains genres bactériens??
- Développement du plus grand nombre d'espèces possibles??
- Conditions de culture en anaérobiose??

Rmq: Colorations pour identification (Gram)

1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles





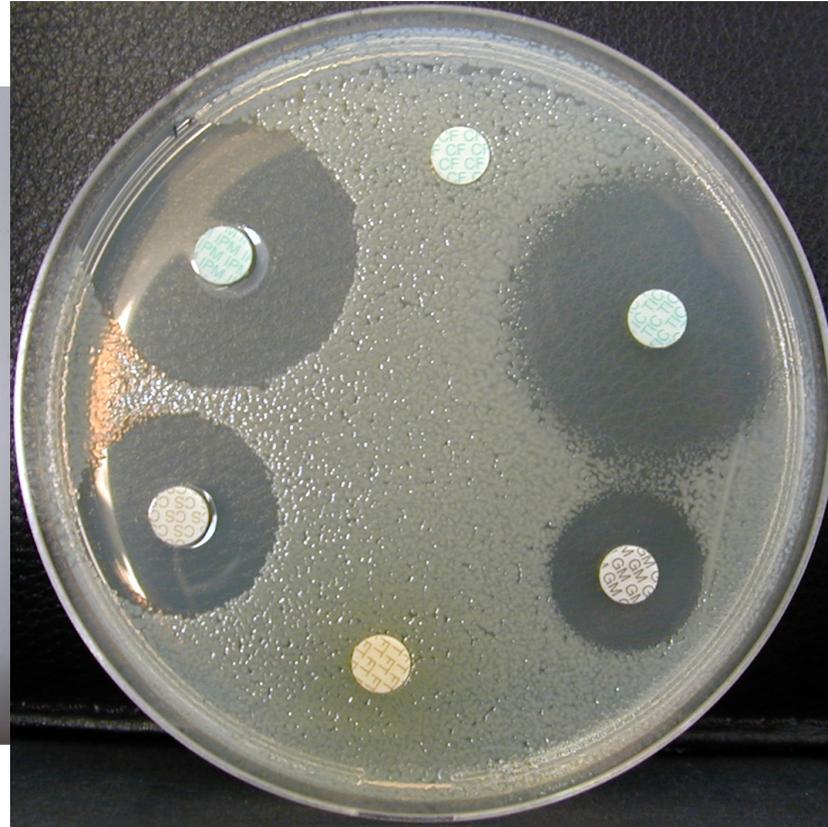
1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles



1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles



1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles

Staphylococcus aureus

Caractéristiques bactériologiques

Etat frais : **Cocci immobiles en amas**

Coloration de Gram : **Cocci Gram + en amas**

Catalase : **Positive** Oxydase : **Négative**

Culture sur milieu ordinaires : **OUI**

Culture sur milieux sélectif : **OUI, gélose au sang ANC**

Conditions de culture / délai : **à 37°C, 24 h**

Exigences nutritives : **Aucune**

Taille des colonies : **2 mm**

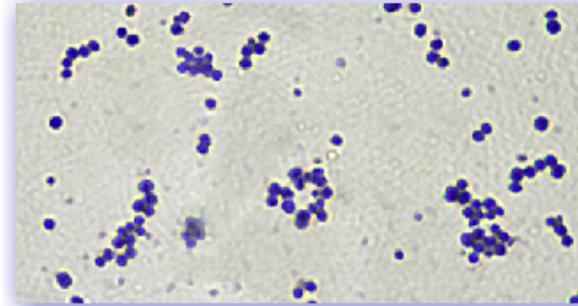
Méthode d'identification :

Phénotypiques : Agglutination SLIDEX

Génotypiques :

Antibiotiques à tester :

**Oxacilline, Vancomycine, Rifampicine, Acide Fusidique,
Fosfomycine, Ofloxacin, Cotrimoxazole, Gentamicine**



1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles

Escherichia coli

Caractéristiques bactériologiques

Etat frais : **Bacilles immobiles**

Coloration de Gram : **Bacilles gram -**

Catalase : **Positive** Oxydase : **Négative**

Culture sur milieu ordinaires : **OUI**

Culture sur milieux sélectif : **OUI, Mac-Conkey**

Conditions de culture / délai : **à 37°C, 24 h**

Exigences nutritives : **NON**

Taille des colonies : **2 à 3 mm**

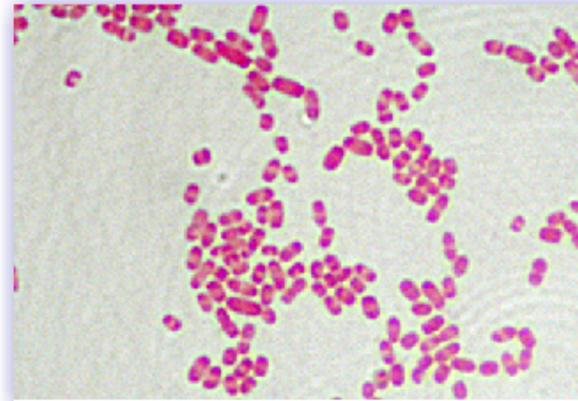
Méthode d'identification :

Phénotypiques : Galerie Api 20E

Génotypiques :

Antibiotiques à tester :

Imipenem, Cephalosporine 3G, Gentamicine, Fluoroquinolone, Carboxy et Uréido Pénicillines, Aminopénicilline, Cotrimoxazole



1. Identification de l'Agent Pathogène

1.1 Méthodes Conventionnelles

Pseudomonas aeruginosa

Caractéristiques bactériologiques

Etat frais : Bacilles fins à mobilité lophotriche

Coloration de Gram : Bacilles Gram - fins à coloration homogène

Catalase : Positive Oxydase : Positive

Culture sur milieu ordinaires : OUI

Culture sur milieux sélectif : OUI, Mac-Conkey

Conditions de culture / délai : à 37°C, 24 h

Exigences nutritives : Aucune

Taille des colonies : 4 mm

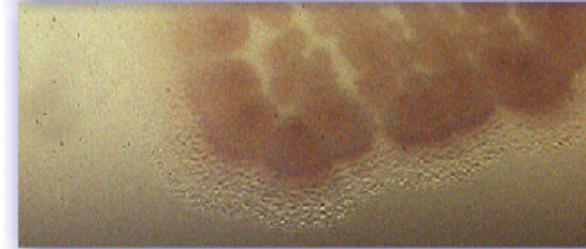
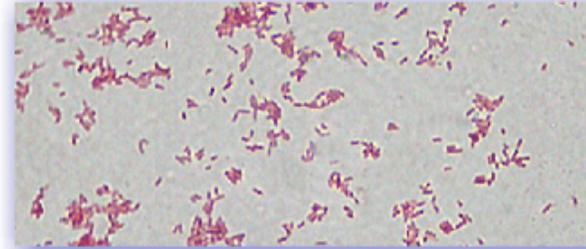
Méthode d'identification :

Phénotypiques : Galerie Api 20 NE

Pigment bleu-vert : Pyocyanine

Antibiotiques à tester :

**Ticarcilline, Ceftazidime, Imipenem, Ciprofloxacine,
Tobramycine, Gentamicine**



1. Identification de l'Agent Pathogène

1.2 Méthodes moléculaires génomiques

Identification de séquences d'acides nucléiques (ADN ou ARN) caractéristiques de l'espèce bactérienne recherchée

Les acides nucléiques sont des molécules très résistantes (ADN) et bien conservées, même lorsque les micro-organismes ne sont plus vivants

❖ Amplification du matériel génétique:

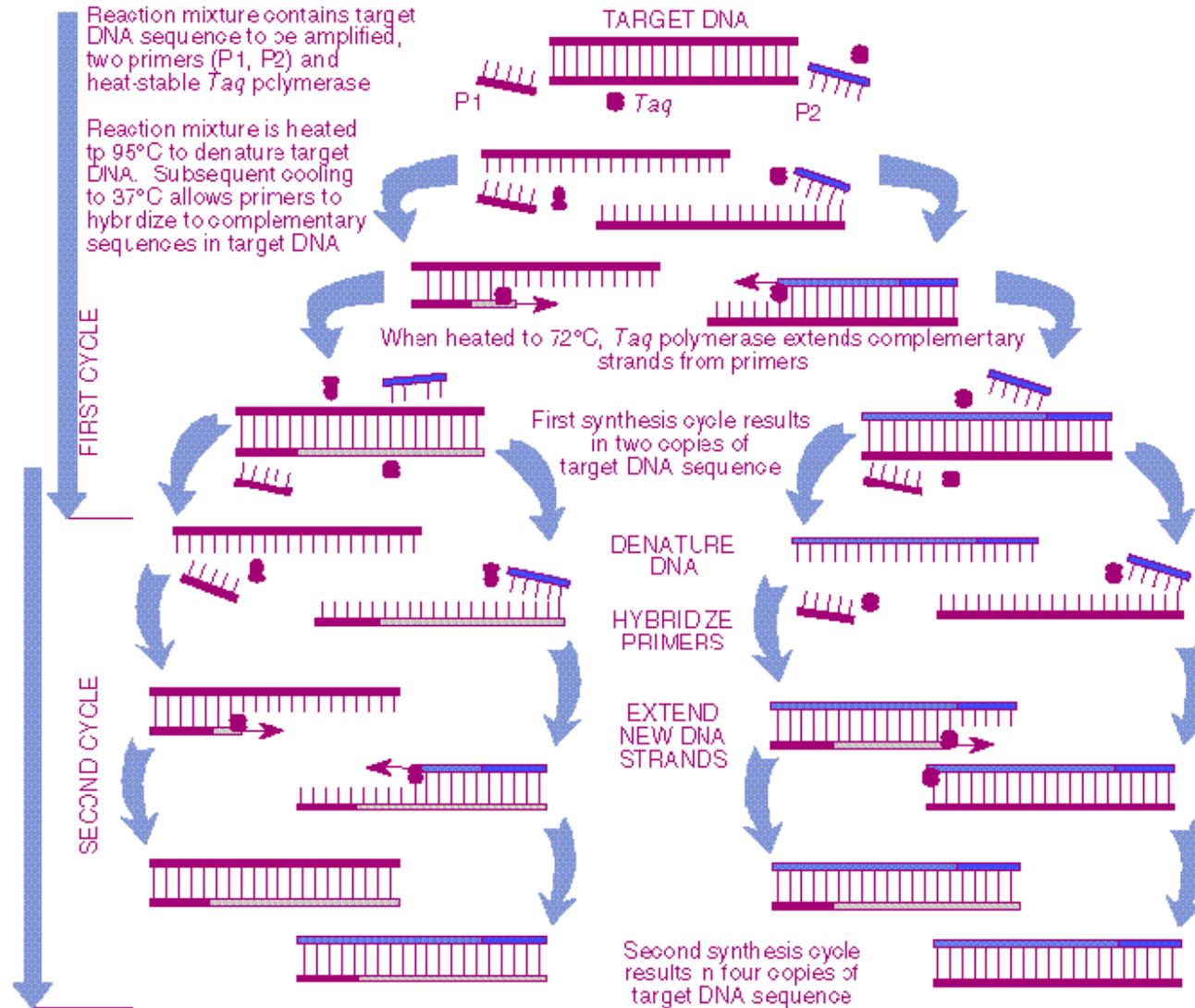
- > Amplification *in vivo* (clonage E. Coli)
- > PCR (Polymerase Chain Reaction)



1. Identification de l'Agent Pathogène

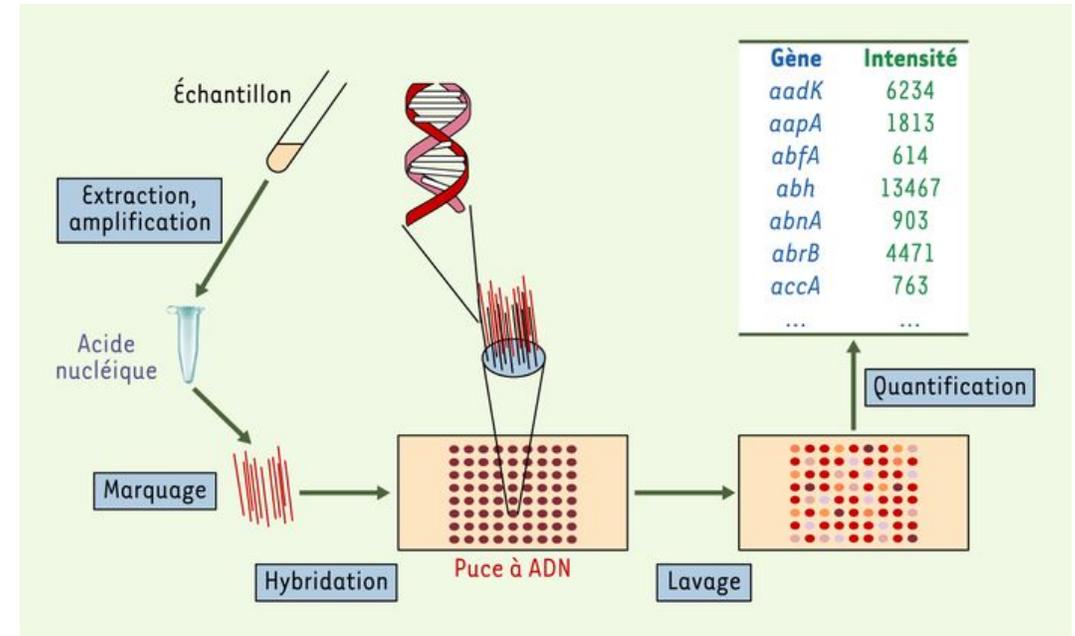
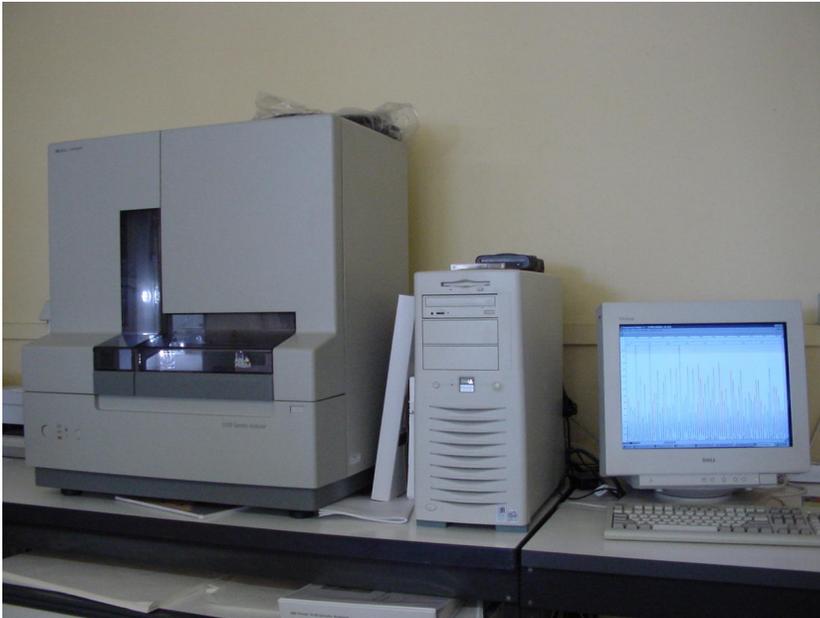
1.2 Méthodes Moléculaires

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



❖ Identification des bactéries:

- > Hybridation avec des sondes ADN spécifiques
- > Séquençage génomique





1. Identification de l'Agent Pathogène

1.2 Méthodes Moléculaires



RESULTAT D'ANALYSE QUANTITATIVE PAR PCR EN TEMPS REEL PERIO-ANALYSE

Chirurgien-Dentiste : Docteur XXXX - XXXX
 Tel : _____ Fax : _____ Email : _____

Référence Interne : P070503/001 Patient : XXXXX

N° Sécurité Sociale	Date de prélèvement	N° de la dent	Face de la dent
	27/04/07	1001	

Nom des bactéries	Présence / Absence de la bactérie	Nombre de bactéries dans l'échantillon	% bactéries / flore totale
Flore totale		2,14x10 ¹⁰	100,00%
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	+++	1,61x10 ⁰⁹	0,75%
<i>Tannerella forsythensis</i>	++	5,62x10 ⁰⁸	0,03%
<i>Campylobacter rectus</i>	-		
<i>Treponema denticola</i>	++	6,07x10 ⁰⁸	0,03%
<i>Eikenella corrodens</i>	+	2,94x10 ⁰⁸	0,001%
<i>Prevotella intermedia</i>	++	5,92x10 ⁰⁸	0,03%
<i>Peptostreptococcus micros</i>	++	1,19x10 ⁰⁷	0,06%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	++	8,00x10 ⁰⁷	0,42%

Proportion de chaque parodontopathogène quantifié par rapport à l'ensemble des parodontopathogènes présents dans l'échantillon :

- A. actinomycetemcomitans
- F. nucleatum
- P. micros
- T. denticola
- P. intermedia
- T. forsythensis
- E. corrodens

Dr. Sophie Couturier, Chirurgien Dentiste
 Dr. Franck Chaubron, Biologiste Moléculaire

RESULTAT D'ANALYSE QUANTITATIVE PAR PCR EN TEMPS REEL PERIO-ANALYSE

Chirurgien-Dentiste : Docteur XXXX - XXXX

Référence Interne : P070503/001 Patient : XXXXX

N° Sécurité Sociale	Date de prélèvement	N° de la dent	Face de la dent
	27/04/07	1001	

Nom des bactéries	Présence / Absence de la bactérie	% bactéries / flore totale	Nombre de bactéries dans l'échantillon
Flore totale		100,00%	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	+++	0,75%	
<i>T. forsythensis</i>	++	0,03%	
<i>C. rectus</i>	-		
<i>T. denticola</i>	++	0,03%	
<i>E. corrodens</i>	+	0,001%	
<i>P. intermedia</i>	++	0,03%	
<i>P. micros</i>	++	0,06%	
<i>P. gingivalis</i>	-		
<i>F. nucleatum</i>	++	0,42%	

Proportion de chaque parodontopathogène quantifié par rapport à l'ensemble des parodontopathogènes présents dans l'échantillon :

- A. actinomycetemcomitans
- F. nucleatum
- P. micros
- T. denticola
- P. intermedia
- T. forsythensis
- E. corrodens

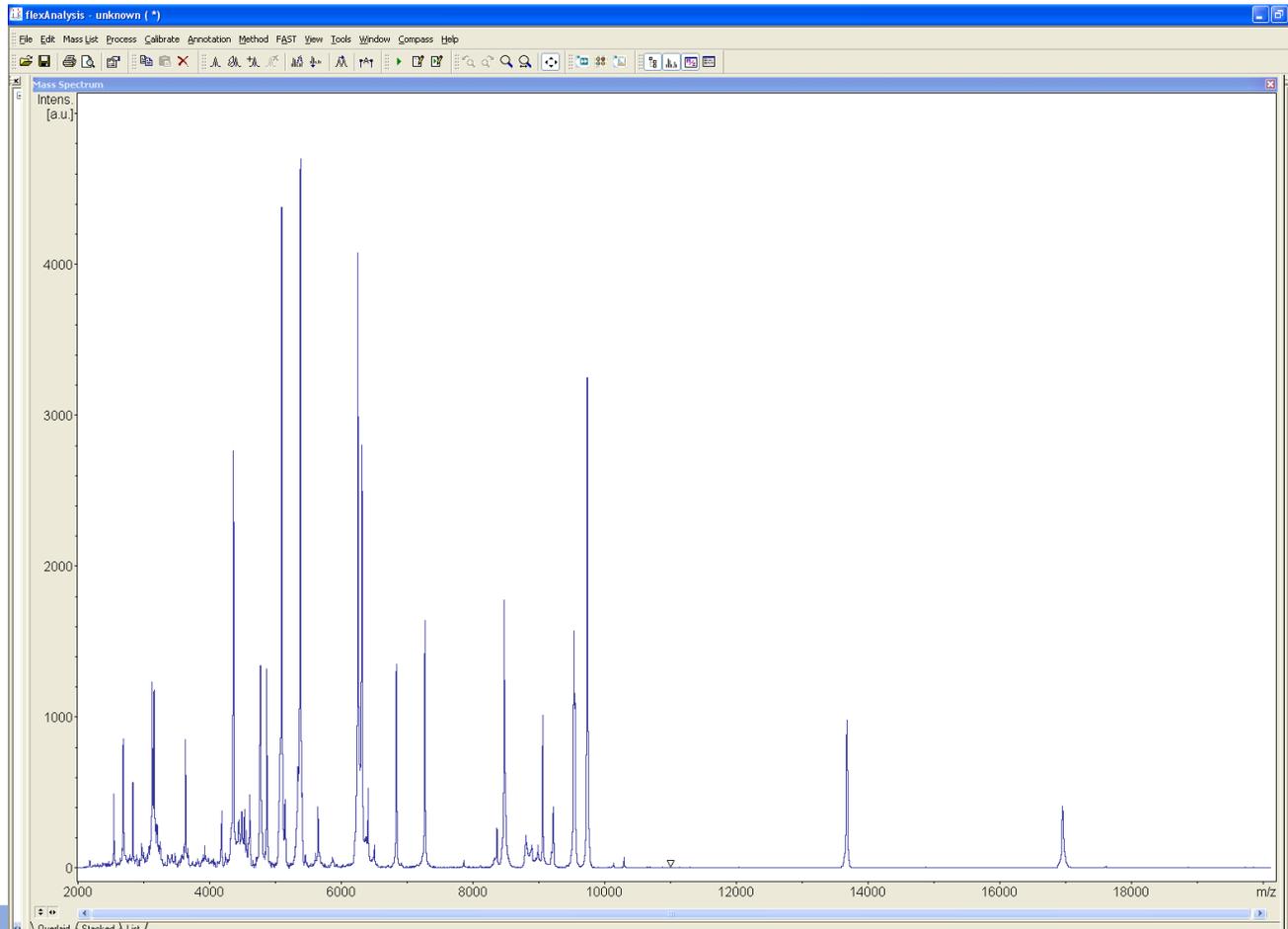


1. Identification de l'Agent Pathogène

1.2 Méthodes Moléculaires

❖ Identification des bactéries par les protéines:

> Spectrométrie de masse





1. Identification de l'Agent Pathogène

1.3 Avantages et Inconvénients

Mise en culture bactérienne	Techniques moléculaires génomiques
<p style="text-align: center;"><u>Avantages</u></p> <ul style="list-style-type: none">_Aspect non ciblé : identification d'un grand nombre de micro-organismes_Antibiogramme, après isolement des bactéries pathogènes d'intérêt	<p style="text-align: center;"><u>Avantages</u></p> <ul style="list-style-type: none">_Très bonne spécificité_Bonne sensibilité_Utilisation de techniques d'amplification qui permettent d'abaisser le seuil de sensibilité_Rapidité (24 à 48H)_Détection de germes à croissance difficile, ou impossible_Travail sur des échantillons non vivants_Simplicité et facilité à standardiser_Coût modéré
<p style="text-align: center;"><u>Inconvénients</u></p> <ul style="list-style-type: none">_Coût assez élevé_Durée de l'examen (jusqu'à 5 semaines)_Faible sensibilité_Variabilité en fonction des compétences et de l'expérience du microbiologiste_Culture de certains germes difficile, voire impossible.	<p style="text-align: center;"><u>Inconvénients</u></p> <ul style="list-style-type: none">_Faux négatifs théoriquement possibles en cas de mutation des séquences cibles_Contamination des échantillons => faux positifs_Recherche ciblée de micro-organismes : on doit savoir quels bactéries rechercher_Ne renseigne pas sur la sensibilité aux antibiotiques_Quantification partielle (sauf PCR temps réel, où il y a une réelle quantification)



2. Evaluation de l'inflammation gingivale

>> Fluide gingival

Le fluide gingival contient des substances dérivées du **fluide interstitiel** (facteurs produits localement), du **plasma** et des **bactéries**

La proportion de ces trois types de constituants dépend:

- de la plaque dentaire
- du renouvellement du tissu conjonctif
- de la perméabilité de l'épithélium et de la membrane basale (degré d'inflammation)

=> Reflet de l'activité biochimique au niveau des tissus sous-jacents



2. Evaluation de l'inflammation gingivale

2.1 Marqueurs de l'inflammation gingivale

Principe : immobiliser les protéines antigéniques (inflammatoires) sur une membrane, et les identifier par test ELISA

Interleukines

Cytokine issue des **macrophages** ayant interagi avec un produit bactérien.

IL-1 et IL-6 = cytokines pro-inflammatoires => résorption osseuse et sécrétion de protéases

Elles augmentent avec l'inflammation gingivale, précédant ses manifestations cliniques

TNF- α

Produit par les lymphocytes activés et les macrophages

Puissant immunorégulateur capable de stimuler les fibroblastes et le remaniement osseux



2. Evaluation de l'inflammation gingivale

2.1 Marqueurs de l'inflammation gingivale

Prostaglandines

L'augmentation de la prostaglandine E2 est révélatrice d'une perte d'attache gingivale

Libération locale par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages

Demi-vie biologiquement courte (car métabolisée sur place)

Activité limitée aux territoires directement adjacents.

Son augmentation reflète une **inflammation parodontale persistante**

Lactoferrine

Pas un médiateur direct de l'inflammation : glycoprotéine de liaison du fer

Action antibactérienne (par captage des ions Fe^{++}), avec un effet bactéricide

Implication dans la réponse inflammatoire en augmentant la chémotaxie des polynucléaires neutrophiles

Elle module la production des Interleukines et des Prostaglandines

Libérée à partir des granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles

Concentration augmentée significativement dans **tous les cas de pathologie parodontale**

=> marqueur simple et efficace du nombre de PNN dans le sillon gingivo-dentaire



2. Evaluation de l'inflammation gingivale

2.1 Marqueurs de l'inflammation gingivale

Inflammation et remaniement osseux:

Recherche de marqueurs du métabolisme osseux (apposition et résorption)

Domaine important +++ :

La perte osseuse alvéolaire est irréversible, et observable *a posteriori*

Aucun indice clinique précoce

Phosphatase Alcaline

Marqueur de la maturation matricielle osseuse (minéralisation)

Synthèse par les ostéoblastes

Ostéocalcine

Marqueur de la biominéralisation (1 à 2 % des protéines de la matrice osseuse)

Teneur sérique accrue lors de la croissance squelettique

Synthèse par les ostéoblastes

Significativement plus abondante dans le fluide gingival de patients atteints de parodontite que dans celui de patients atteints de gingivite



2. Evaluation de l'inflammation gingivale

2.2 Enzymes dégradant les structures tissulaires

>> Enzymes protéolytiques

Collagénase

Activité collagénase dans le fluide gingival proportionnelle à la profondeur des poches et au degré d'inflammation gingivale

Production par diverses cellules: PNN, Mastocytes, Fibroblastes, Bactéries

NB: Le collagène type I est particulièrement bien représenté au sein des tissus parodontaux sains, mais disparaît en partie lors des gingivites, ce qui suppose une dégradation enzymatique importante

Elastase

Sérine-Endopeptidase issue des granules azurophiles de PNN, active contre divers substrats protéiques (élastine, collagène, protéoglycanes et laminines des membranes basales)

Présence dans le fluide gingival = reflet de l'activité leucocytaire, donc du processus inflammatoire



2. Evaluation de l'inflammation gingivale

2.3 Enzymes cytoplasmiques issues de lyse cellulaire

>> Toute nécrose tissulaire s'accompagne d'une augmentation brutale de la concentration d'un certain nombre d'enzymes strictement endocellulaires.

Lactate Dehydrogénase (LDH)

Activité corrélée avec le nombre de *Porphyromonas gingivalis*

Origine: dégradation des fibroblastes et des bactéries

(=> marqueur peu fiable de la lyse cellulaire parodontale)

Aspartate Amino Transférase (AST)

Enzyme très répandue qui participe à la chaîne de transfert des groupes aminés issus des acides aminés

Normalement confinée dans le cytoplasme => constitue un indicateur de dommage tissulaire

(couramment utilisé pour le diagnostic ou le suivi des nécroses myocardiques ou des hépatites aiguës)

Activité AST du fluide gingival : corrélée avec l'intensité de la parodontite et de la gingivite

=> Reflète bien les phases actives de la maladie parodontale



3. Bilan biologique de l'inflammation

L'approche biologique de l'inflammation repose sur des manifestations à distance d'un phénomène localisé (inflammation/infection gingivale)

Réaction locale

=> libération de cytokines

=> évènements biologiques dans organes éloignés (**foie**)

Cinétiques de synthèse et demi-vie varient selon les protéines

=> exploitation du profil protéique à des fins thérapeutiques

Rmq: Réponse biosynthétique altérée en cas d'insuffisances hépatiques



3. Bilan biologique de l'inflammation

- ❖ **Numération Formule Sanguine**
- ❖ **Vitesse de Sédimentation**
- ❖ **Protéines Plasmatiques**



3. Bilan biologique de l'inflammation

3.1 Hémogramme

L'hémogramme est une étude quantitative des éléments figurés du sang
C'est le premier examen biologique utilisé pour dépister, explorer et suivre la plupart des hémopathies.

C'est l'examen le plus prescrit en France.

Réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube contenant un anticoagulant

- Numération globulaire
- Formule sanguine
- Numération des plaquette



1. Hémogramme

❖ Numération globulaire:

Détermination du nombre de globules blancs et de globules rouges

➤ Globules rouges:

L'étude des globules rouges est basée sur l'analyse de l'hémoglobine (Hb).

Valeurs normales (adulte)

Homme: 130 à 170 g/L

Femme: 120 à 160 g/L

Augmentation du taux d'HB: **polyglobulie** (plusieurs causes possibles)

Exple : Polyglobulie secondaire à hypo-oxygénation ou anoxie tissulaire (Tabagisme +++, BPCO...)

Diminution du taux d'Hb : **anémie**



1. Hémogramme

❖ Numération globulaire:

➤ Globules blancs:

Numération des Leucocytes :

Valeurs normales (adulte) : 4000 à 10 000 /mm³ (= 4 à 10 x10⁶ /L)

Leucocytes (chez l'adulte) :

> 10 000 /mm³ = hyperleucocytose

< 4000 /mm³ = leucopénie



1. Hémogramme

❖ Numération globulaire:

➤ Plaquettes:

Numération des Plaquettes :

Valeurs normales (adulte) : 150 000 à 400 000 /mm³ (= 150 à 400 x10⁶ /L)

Plaquettes (quel que soit l'âge et le sexe) :

< 150 000 /mm³ = Thrombopénie => **attention au risque hémorragique...**

> 400 000 /mm³ = Hyperplaquettose (Thrombocytose)



NUMERATION GLOBULAIRE

Hématies

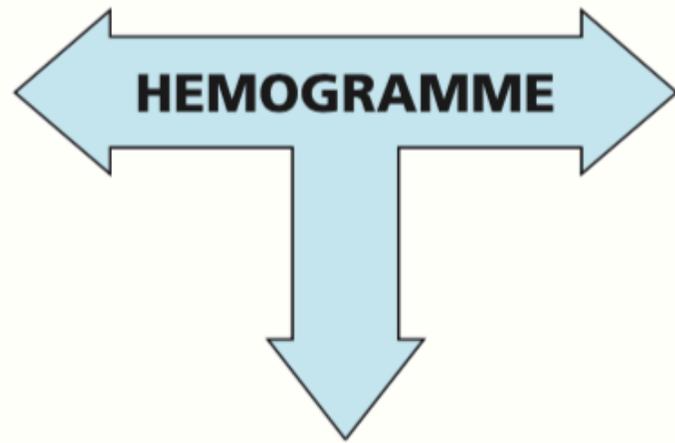
4 - 5,4 tera/L
4.5 - 6 tera/L

↗ = Polyglobulie

- Hypo ou anoxie tissulaire
- Intoxication par l'oxyde de carbone
- Tumeurs
- Syndrome de Cushing

↘ = Anémie

- ↘ du volume sanguin,
- ↘ de production des hématies,
- ↗ de destruction des hématies



NUMERATION PLAQUETTAIRE

Plaquettes

150 - 500 giga/L

↘ = Thrombopénie

- Aplasie médullaire
- Destruction excessive
- Trouble de répartition

↗ = Thrombocytose

- Inflammation systémique
- Tumeur
- Saignement
- Carence en fer

FORMULE SANGUINE (globules blancs)

Polynucléaires

Neutrophiles

1.5 - 7 giga/L

↗ = Neutrophilie

- Infections
- Tumeur
- Stress
- Maladie systémique
- Administration de stéroïdes

↘ = Neutropénie

- Génétique
- Affections parasitaires, virales, bactériennes
- Insuffisance médullaire
- Leucémies
- Agranulocytose pure
- Chimiothérapie

Eosinophiles

< 0,5 giga/L

↗ = Eosinophilie

- Infections parasitaires
- Asthme allergique
- Néoplasie

Basophiles

< 0,05 giga/L

↗ = Basophilie

- Maladie de Vaquez
- Certaines anémies hémolytiques chroniques
- Leucémies et syndromes myéloprolifératifs

Mononucléaires

Lymphocytes

1 - 4 giga/L

↗ = Lymphocytose

- Processus infectieux
- Syndrome prolifératif (lymphome)

↘ = Lymphopénie

- Infections
- Etats inflammatoires
- Médicaments immunosuppresseurs
- Chimiothérapie, radiothérapie

Monocytes

< 0.1 - 1 giga/L

↗ = Monocytose

- Maladies infectieuses, parasitaires
- Syndrome mononucléosique
- Certaines affections malignes

↘ = Monocytopénie

- Aplasie médullaire grave
- Anémie de Biermer



3. Bilan biologique de l'inflammation

3.2 Vitesse de sédimentation

Vitesse de sédimentation :

Vitesse nécessaire aux hématies pour se déposer au fond d'un tube à essai

⇒ Sang rendu incoagulable et placé dans un tube à essai

⇒ Vitesse à laquelle les hématies se déposent au fond du tube

VS < 15 mm/h avant 50 ans

VS < 20 mm/h après 50 ans

L'augmentation de la VS signe un tableau inflammatoire (sans détermination d'origine)



3. Bilan biologique de l'inflammation

3.3 Protéines plasmatiques

- Fibrinogène: syndromes inflammatoires aigus
- CRP (C-réactive protéine): marqueur précoce de l'inflammation (production en 12 à 24h et demi-vie 12h)
- α 1-glycoprotéine: 2 à 4 jours après inflammation (demi-vie 3 jours)
- Haptoglobuline: transport de l'HB vers le foie (demi-vie 3 à 5 jours): états inflammatoires, nécroses, ou certains cancers

