

# Première partie : *Rhodococcus equi*, un actinomycète pathogène zoonotique au traitement controversé

## I.1) Introduction

*Rhodococcus equi*, bactérie actinomycétale, proche des mycobactéries et des corynébactéries, est un agent intracellulaire facultatif responsable de pneumonies graves et mortelles chez le poulain âgé de moins de 6 mois et chez les patients immunodéprimés, notamment atteints du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) ou après transplantation et traitement contre le rejet du greffon. Sa parenté avec *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium jeikeium* et la possibilité de coïnfection avec ces agents chez l'homme posent le problème de la survenue de résistances antibiotiques croisées, et donc d'un risque pour la santé publique, *a fortiori* parce que le traitement actuel de référence chez le poulain est une association en bithérapie de rifampicine, une ansamycine, et de macrolides tels l'érythromycine, la clarithromycine ou l'azithromycine. (Heidmann, 2006 ; Yamshchikov, 2010 ; Euzeby bacterio.cict.fr)

## I.2) Taxonomie, position systématique et caractéristiques bactériologiques

a) *Rhodococcus* un genre bactérien plein de ressources et de surprises : depuis les bactéries essentielles pour l'industrie à l'agent pathogène *Rhodococcus equi*.

L'histoire taxonomique du genre *Rhodococcus* est complexe (Bell *et al.*, 1998). Le nom de genre *Rhodococcus* (« cocci de couleur rouge ») a été utilisé pour la première fois en 1891 par Zopf et redéfini dans son acceptation contemporaine en 1977 par Goodfellow pour y inclure le « complexe *rhodochrous* ». Les caractéristiques initiales examinées comprenaient la coloration, la morphologie, les sources de carbone, la résistance aux inhibiteurs et aux

antibiotiques, les conditions de culture (pH, température), et des analyses chimiques, dont celles de l'ADN.

Actuellement, le genre *Rhodococcus* comprend une cinquantaine d'espèces bactériennes (<http://www.bacterio.net/qr/rhodococcus.html>) ; les bactéries du genre *Rhodococcus* ont pour point commun d'être des cocco-bacilles intracellulaires facultatifs, aérobies, à métabolisme oxydatif, à coloration de Gram positive et partiellement acido-résistants.

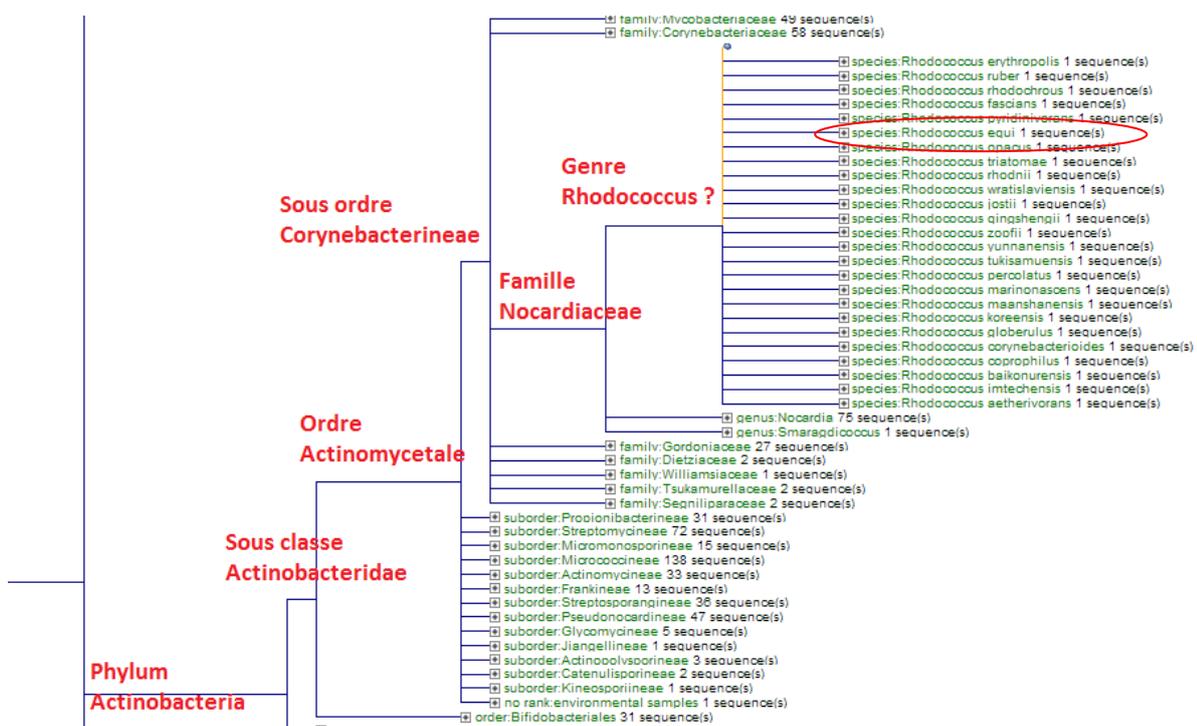
Ces bactéries colonisent les sols, les eaux de surface, et sont même les hôtes des systèmes digestifs de certains insectes ou mammifères. Le panel métabolique de ces bactéries est très varié : utilisation de substrats divers, synthèse d'hydrocarbures aromatiques, de composés chimiques plus ou moins indispensables au niveau industriel comme l'acrylamide.

Les *Rhodococcus* sont proches des *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia* et *Corynebacterium*. Ils appartiennent au taxon des Mycolata, et plus précisément des actinomycétales nocardioformes. En effet, leur paroi est composée en partie d'acides mycoliques à 30-54 carbones (Alshamaony *et al.*, 1976).

Les principaux représentants du genre *Rhodococcus* sont *R. equi*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. fascians*, et *R. rhodnii*.

La **figure 1** précise la position systématique actuelle du genre *Rhodococcus* et de *R. equi* en particulier.

Figure 1 Position systématique de *Rhodococcus equi* (NCBI genomes MICROBE)



## b) *Rhodococcus equi* un cas à part

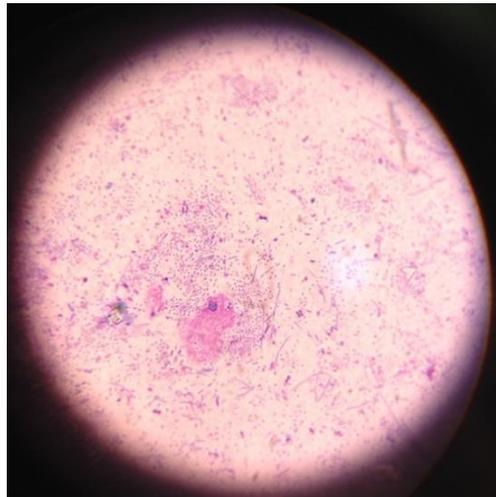
La première description de *Rhodococcus equi* remonte à 1923 à partir d'un échantillon de poumons de poulains atteints de bronchopneumonie ; il est alors classé par Magnusson comme *Corynebacterium equi*. La taxonomie (<http://www.uniprot.org/taxonomy/43767>) lui accorde également les noms de *Bacillus hoagii* (Morse, 1912), *Corynebacterium (pyogenes) equi roseum*" (Lutje, 1923), *Mycobacterium equi* (Magnusson, 1923 ; Jensen, 1934), *Corynebacterium purulentus* (Holtman, 1945), *Mycobacterium restrictum*" (Turfitt, 1944 ; Krasil'nikov 1949), *Proactinomyces restrictus*" (Turfitt, 1944) et enfin, *Prescottia equi* ou *Prescottella equi* (Jones *et al.*, 2013).

Sa position actuelle dans le genre *Rhodococcus* date de la description de Goodfellow *et al.*, en 1982. Récemment, des auteurs ont proposé sa reclassification en *Prescottia equi* en l'honneur du Pr John Prescott qui a contribué de façon majeure à son étude (Sutcliff *et al.*, 2013) ou plus récemment encore, Jones *et al.*, (2013) ont proposé le nom de *Prescottella equi*. Le patronyme de *Rhodococcus*, genre très important pour l'industrie, permet de lever des fonds de recherche assez aisément. Ainsi, des scientifiques s'opposent à ses récents changements taxonomiques.

*Rhodococcus equi* est un actinomycète cocco-bacille, intracellulaire facultatif, non mobile, à coloration de Gram positive (**Figure 2**), dépourvu de flagelle, pouvant posséder des pili selon les souches, capsulé et vivant en milieu aérobie. (Euzéby, 2012)

Figure 2 *Rhodococcus equi* intracellulaire vu au microscope grossissement 400 Crédit photo Céline Morand

ENVA



*In vitro*, les conditions optimales de croissance en aérobiose et sur milieu ordinaire de type BHI, TSA ou gélose au sang sont : une température de 30°C mais pouvant aller de 10 à 40°C, et un pH entre 7 et 8,5. Les colonies apparaissent en moins de 48h (figure 3) ; elles sont irrégulièrement rondes, lisses, semi-transparentes, muqueuses. La coloration caractéristique rose saumon apparaît plus tard jusqu'au 4<sup>ème</sup> voire 7<sup>ème</sup> jour. À l'examen microscopique (figure 2), *R. equi* varie d'un aspect coccoïde à bacillaire, selon les conditions de culture et la phase de croissance ; en milieu liquide il peut former de longs bâtonnets ou de courts filaments avec des branchements rudimentaires. (Weinstock et Brown, 2002).

Les caractéristiques biochimiques de routine sont résumées dans le **tableau 1**. *Rhodococcus equi* est caractérisé par la présence de catalase, uréase, lipase et phosphatase et l'absence d'oxydase, DNase, élastase, lécithinase et protéase.

Tableau 1 Caractéristiques biochimiques de *Rhodococcus equi*

							Utilisation des sucres suivants				
<b>Réaction positive</b>	<b>Catalase</b>	Nitrate réductase	Uréase	DNase	Lipase	Phosphatase	Ribose	Inositol	Mannose	Saccharose	Sorbitol
<b>Réaction négative</b>	<b>Arylsulfatase</b>	Oxydase	Indole				Cellulose	Galactose	Maltose	Turanose	Xylose

En gras rouge caractères biochimiques communs à tous les *Rhodococcus*

*R. equi* présente un CAMP test positif : une hémolyse apparaît quand il est cultivé sur gélose au sang en présence de souches bêta-hémolytiques de *Staphylococcus aureus*, ou de *Listeria monocytogenes*, et de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Prescott, 1991).

De plus, un antagonisme entre l'imipénème et de nombreuses céphalosporines a été observé *in vitro* pour de nombreuses souches de *R. equi* (Nordmann *et al.*, 1993).

L'identification est réalisable manuellement ou avec une galerie d'identification biochimique de type API-ZYM<sup>®</sup> corynébactéries.

Récemment, en médecine humaine, une technique rapide (~2h contre ~16h) et moins onéreuse sur le long terme que les méthodes traditionnelles de bactériologie a vu le jour : l'identification par spectrométrie de masse ou MALDI TOF (Désorption-ionisation laser assistée par matrice et temps de vol). Description dans l'encadré page suivante.

Vila *et al.* (2012) ont notamment produit des spectres d'identification de *Rhodococcus equi* et d'autres bactéries de la famille des corynébactéries. Pour les souches testées, la corrélation entre MALDI TOF et identification biochimique (API-Coryne V2<sup>®</sup>) n'était cependant que de 89 % (10 souches identifiées par MALDI TOF sur les 11 souches identifiées par la galerie biochimique). Selon Vila *et al.*, la confusion vient de la plus faible spécificité de la galerie rapide d'identification biochimique dans vis-à-vis de la discrimination entre *R. equi* et d'autres bactéries appartenant à des genre proches (*Dietzia*).

La confirmation de l'identification se fait au besoin par séquençage de l'ARN ribosomal de 16 S. Cette procédure est longue et coûteuse.

*R. equi* est capable de métaboliser un grand nombre de substrats notamment les acides gras volatils comme l'acétate ou le propionate. (Muscatello, 2012)

La paroi de *R. equi* contient des acides mycoliques de 34 à 52 carbones, et au moins 24 sérotypes capsulaires ont été identifiés (Weinstock et Brown, 2002).

Figure 3 Colonie de *Rhodococcus equi* sur milieu BHI et sur gélose au sang (photographie personnelle à gauche, Yamschikov, 2010 à droite)

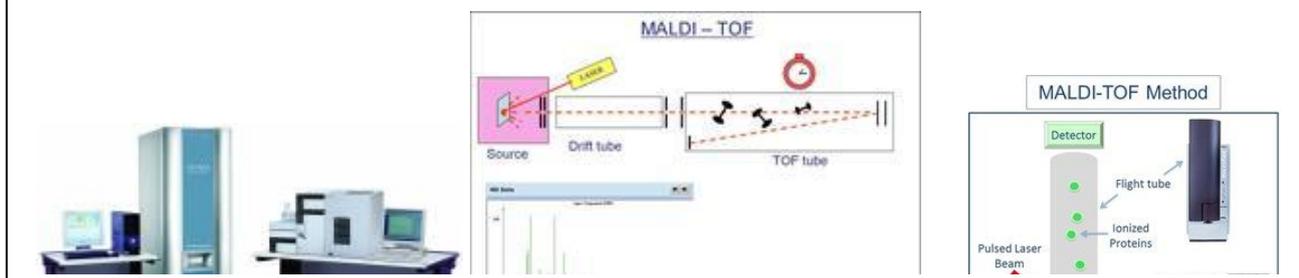


#### MALDI TOF

L'échantillon à analyser est mélangé avec une substance dénommée matrice. Le mélange est déposé sur une lame qui est placée dans l'instrument et illuminée par un laser. La matrice absorbe la lumière du laser, s'évapore avec l'échantillon, et gagne au passage une charge électrique (ionisation).

Les champs électriques guident les ions dans le spectromètre de masse qui les séparera en fonction de leur masse et donnera des résultats sous forme d'une série de pics (spectre) correspondant aux différents fragments issus de la molécule originale. En analysant les caractéristiques de ces fragments, il est ensuite possible d'en déduire la structure de la molécule.

Un logiciel compare alors le spectre de l'échantillon avec une banque de spectres incluant un grand nombre de bactéries enregistrées pour permettre une identification précise des espèces en présence. La limite de la technique repose sur l'existence d'une base de données, de spectre, suffisantes.



Le matériel génétique est contenu dans un chromosome circulaire de 5 Mb et dans différents plasmides. À ce jour, 12 plasmides de virulence ont été décrits. (Muscatello *et al.*, 2012)

En dépit d'une large présence dans l'environnement, la rhodococcose ne survient généralement que de façon endémique ou occasionnelle ; les isolats cliniques sont plus virulents que les souches environnementales. En outre, les infections expérimentales ont permis d'identifier des souches présentant des degrés variables de virulence. Plusieurs facteurs de virulence ont été suspectés : la capsule polysaccharidique, l'exoenzyme cholestérol oxydase, les acides mycoliques de la paroi et les produits codés par un plasmide de virulence. (Hondalus *et al.*, 1997)

La capsule peut interférer avec la capacité phagocytaire des leucocytes, mais aucune relation n'a été retrouvée entre un sérotype capsulaire particulier (1-27) et la virulence (Takai *et al.*, 1991). La cholestérol oxydase (*Equi factor*), a également été suggérée comme facteur de virulence en raison de la synergie hémolytique avec d'autres enzymes bactériennes, mais le fait que des souches virulentes et non virulentes sécrètent cette enzyme, rend son rôle spéculatif. Les souches possédant des acides mycoliques avec de longues chaînes carbonées semblent induire des infections expérimentales plus sévères avec de nombreux granulomes, et des résultats similaires sont obtenus avec l'injection de glycolipide purifié (Gotoh *et al.*, 1991). La capacité d'induire des granulomes est semblable à celle obtenue avec le glycolipide de *Nocardia spp.* La capacité de synthétiser des acides mycoliques semble donc liée à la virulence.

En fait, les facteurs essentiels de virulence sont désormais identifiés comme étant les produits du gène *Vap* situés sur un plasmide de virulence (Takai *et al.*, 1991a ; 1991b ; Tkachuk-Saad et Prescott, 1991). Cette partie sera traitée en détail dans le paragraphe consacré à la virulence.

### I.3) Infection chez l'animal

Les infections à *R. equi* touchent essentiellement les jeunes poulains âgés de moins de 6 mois (**Figure 4**), mais il peut infecter également les porcs et les carnivores domestiques âgés. *R. equi* est un agent pathogène intracellulaire facultatif qui se multiplie dans les macrophages de ses espèces cibles. Il cause ainsi des granulomes, qui évoluent de façon chronique vers l'abcédation puis vers la nécrose caséuse. Les principales manifestations cliniques regroupent des pneumonies associées ou non à des abcès du poumon, des lymphadénites mésentériques, ou des glandes sous maxillaires chez le porc. *R. equi* est un agent opportuniste, capable également d'infecter une plaie puis de disséminer dans tous les organes. (von Bargen, 2009)

*R. equi* est l'agent infectieux le plus couramment impliqué dans les pneumopathies du poulain.

L'exposition des poulains dans les 2 premières semaines de vie à des aérosols contenant des souches virulentes de *R. equi* est significativement associée à une hausse de prévalence de rhodococcose. (Cohen, 2013)

Les chevaux adultes ne sont que rarement réinfectés par *R. equi*. En effet ils développent assez tôt une immunité protectrice et durable. Quelques cas d'avortements ont été décrits. (Hondalus, 1997) (Lopez, 2002)

Les souches impliquées dans la rhodococcose équine sont toutes porteuses d'un plasmide de virulence codant pour Vap A.

Figure 4 : Pouliche atteinte de rhodococcose digestive (photographie personnelle)



#### I.4) Infection chez l'homme

Chez l'homme, la rhodococcose est une infection rare. Le 1<sup>er</sup> cas humain a été rapporté en 1967 par Golub. Les détails de ce cas illustrent les principales caractéristiques de l'infection humaine : le patient, un homme de 29 ans qui travaillait dans un parc à bestiaux et nettoyait l'enclos des animaux, souffrait d'hépatite auto-immune et était traité par corticoïdes (prednisone) et 6-mercaptopurine. Il présentait de la fièvre et un abcès du poumon. Les cultures des prélèvements de l'abcès montraient la présence de coccobacilles à Gram positif identifiés comme *R. equi*. Après 8 semaines de traitement par l'érythromycine, les symptômes disparurent. Six semaines plus tard, il présenta un abcès sous-cutané à *R. equi*. Il reçut un traitement complémentaire d'érythromycine pendant 6 semaines sans rechute ultérieure (Golub, 1967).

Depuis, les publications de cas d'infections humaines se sont multipliées. (Yamshchikov *et al.*, 2010).

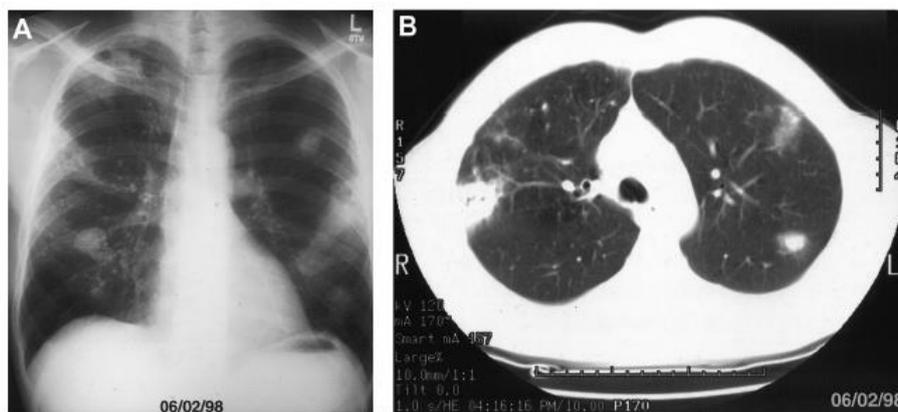
L'incidence des infections à *R. equi* coïncide avec l'ère des infections opportunistes chez les patients infectés par le VIH, des avancées dans les traitements des cancers et des transplantations d'organes avec l'utilisation de traitement immunosuppresseur, ainsi que dans les progrès des techniques de laboratoire et de diagnostic de cette bactérie. [Heudier *et al.*, 1993 (VIH); Meeuse *et al.*, 2007 (Leucémie sous traitement anti CD52) ; El Karoui *et al.*, 2009 (Transplantation rénale)].

Les sujets infectés les plus atteints présentent les signes d'infections pulmonaires récidivantes et chroniques incluant une toux et des douleurs thoraciques. D'autres manifestations ont été rapportées (méningites, péricardites, surinfections de plaies, affections digestives, infections de cathéter ...).

Le diagnostic repose principalement sur la clinique, et l'isolement de la bactérie par culture des prélèvements pulmonaires.

Chez l'homme, l'infection chez le sujet immunocompétent est assez rare (19 cas répertoriés sur plus de 300 cas au total) et se présente le plus souvent sous forme localisée (47 % des cas contre 16 % des cas chez les patients immunodéprimés Keglava *et al.*, 2001). L'évolution est souvent chronique avec des rechutes.

Figure 5 : Image radiographique pulmonaire chez un patient atteint de rhodococcose d'après Keglava *et al.*, 2001



## I.5) Epidémiologie et Habitat

*R. equi* est présent de façon ubiquiste sur les 5 continents : Europe, Japon, Australie, Amérique latine, Etats Unis,... (Von Bargen, 2009)

L'Anses (station de Dozulé) estimait en 2004 à 1,2% la prévalence de la rhodococcose chez le cheval en Basse Normandie, avec 2,5 % dans le Calvados, 1 % dans l'Orne et 0,3 % dans la Manche.

*R. equi* est un organisme présent de façon ubiquiste dans le sol, plus précisément dans la couche superficielle (<5cm) où il survit et se multiplie. (Muscatello, 2012)

En outre, l'implication avec multiplication intracellulaire des protozoaires saprophytes du caecum ou du sol dans la survie de *R. equi* est en cours d'étude mais semble déterminante pour Muscatello (2012).

*R. equi* est ingéré par le poulain au moment de la mise à la pâture ou au travers des crottins maternels, il colonise ensuite le tractus digestif et est excrété avec les crottins. C'est un hôte normal du tube digestif de la plupart des chevaux adultes qui excrètent alors moins de 2000 cfu/g de faeces. De façon inverse l'excrétion chez le poulain est beaucoup plus forte - l'immunité n'étant pas encore optimale- et les crottins sont ainsi plus contaminants ; l'excrétion peut aller jusqu'à 10 000 cfu/g pour le foal sain et  $10^8$  cfu/g chez le foal atteint de rhodococcose.

Au niveau des sols, *R. equi* préfère un sol de pH neutre (7,3) enrichi en matière fécale, et donc en acides gras volatils. Au vue des études, la nature du sol, argileux vs sableux, influencerait la survie des souches virulentes et le mode de transmission de la maladie au poulain. Un sol acide (pH <5,5) ou un sol sableux plus pauvre en eau et en nutriment, limiteront la prolifération des souches avirulentes mais non celle des souches possédant le plasmide portant Vap A. Il est intéressant de rappeler à ce stade qu'un cousin proche, *Rhodococcus coprophilus*, a la capacité de survivre 8 mois dans de l'eau distillée stérile et que la plupart des bactéries du genre *Rhodococcus* sont très résistantes dans le milieu extérieur.

Les facteurs de risque et les moyens de prévention ont été résumés par Ferry et Tapprest (2012).

La surpopulation en poulinières et en poulains, au même titre que tout ce qui favorise la formation d'aérosols, sols poussiéreux conditions climatiques trop sèches, forte activité humaine, sont des facteurs de risque importants de contamination. En effet, on admet que les aérosols sont le moyen par lequel les poulains se contaminent.

Les mesures de contrôle des enzooties de rhodococcose reposent sur quatre aspects : diminuer le challenge infectieux pour les poulains (bonne ventilation, accès à l'herbe, diminuer la formation de poussières, réduction de l'effectif) ; détection précoce de la maladie (prise de température, observation de la respiration du poulain quand il dort, mise en quarantaine des animaux infectés); bonne immunisation passive (prise de colostrum et sérum hyperimmun au besoin); mesures de contrôle des autres challenges infectieux et parasitaires. La désinfection ou l'alcalinisation par addition de chaux des sols sont controversées à l'heure actuelle en raison du manque de produits non toxiques pour les sols ou les animaux alors que *R. equi* reste sensible aux désinfectants et antiseptiques courants.

Néanmoins, la quantification de *R. equi* dans les sols dans un élevage ne préjugerait en rien du taux d'infections dans l'élevage. En effet, le cycle de vie saprophyte de *R. equi* entraîne une contamination progressive des fermes et centres d'élevage, qui ne devient pertinente que lorsque les conditions climatiques, la nature du sol ou tout autre facteur contribuent à rendre possible des inhalations répétées. (Muscatello, 2006) (Philipot, 2012)

L'incidence est maximale en été plus particulièrement en juillet, période doublement critique, d'une part à cause de la fin de l'immunité maternelle, et d'autre part à cause du temps chaud et sec favorisant les aérosols. La virulence de certaines souches contribue à l'infectivité accrue et au pouvoir pathogène. La transmission se fait principalement par voie aérienne, par les poussières. (Tamsin *et al.*, 2010).

De nouvelles méthodes développées sous l'égide de l'Anses rendront possibles dans les années à venir une mesure facile de la concentration de *R. equi* dans l'air inhalé par les poulains. (Phillipot, 2012)

On suppose que l'infection humaine à *R. equi* a pour origine l'inhalation à partir du sol, l'inoculation par une blessure, ou l'ingestion par le tractus digestif. L'exposition aux animaux domestiques (chevaux, porcs) peut aussi jouer un rôle. *R. equi* est présent dans le sol de 50-95 % des fermes et les concentrations sont élevées dans les fèces de chevaux (Takai *et al.*, 1991). Les autres voies d'infection comme la colonisation ou la transmission interhumaine sont mal connues. Des *Rhodococcus* présentant des caractères biochimiques voisins de ceux

de *R. equi* sont présents dans le microbiote nasal des adultes sains (Rasmussen *et al.*, 2000) suggérant que la colonisation nasale joue un rôle dans la maladie. Plusieurs cas d'infections nosocomiales à *R. equi* ont été rapportés (Scotton *et al.*, 2000) et la transmission de patient à patient a été impliquée chez 2 patients HIV. (Arlotti *et al.*, 1996)

## I.6) Virulence et réactions immunitaires

La compréhension des mécanismes de virulence et de défense immunitaire s'est grandement améliorée depuis la fin des années 90, bien que de nombreuses zones d'ombre persistent. Il est important de distinguer les cas animaux, survenant sur des individus aux systèmes immunitaires immatures ou sur des animaux de laboratoire immunocompétents, et les cas humains plus généralement sur des individus immunodéprimés sévères. (Yamshchikov *et al.*, 2010)

### a) Généralités sur la virulence chez *R. equi*

Chez le poulain, la rhodococcose est la conséquence de plusieurs facteurs concomitants : la pression bactérienne, la perte de l'immunité maternelle, la présence de souches de *R. equi* particulières et la sensibilité individuelle.

*R. equi* est un organisme intracellulaire infectant préférentiellement les macrophages. Son aptitude à persister dépend de son aptitude à survivre et à se multiplier dans le macrophage et à moduler la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

### b) Plasmides de virulence et gènes impliqués

Toutes les souches virulentes isolées des poulains infectés (et éventuellement des humains) possèdent un plasmide indispensable pour l'infection. 12 plasmides ont été caractérisés avec des profils de virulence différents. (Muscatello, 2012)

2 plasmides principaux (79-100kB) sont étudiés car considérés comme les pertinents : « VapA » et « VapB », nommés en fonction de la présence de gènes codant entre autres pour des lipoprotéines proches VapA ou VapB. Les souches possédant VapB sont peu virulentes chez le cheval, et sont majoritairement isolées chez le porc. (Takai *et al.*, 2000)

Les souches VapA sont virulentes chez le cheval. Outre une région conservée indispensable à la réplication et à la conjugaison, ce plasmide contient une région hautement variable, présumée originaire d'une souche différente par transfert latéral de gènes. Cette région variable contient des gènes fortement exprimés après phagocytose et correspond à un îlot de pathogénicité (Ren et Prescott, 2003). Les gènes les plus significatifs pour la virulence codent pour les lipoprotéines Vap (virulence associated protein), Vap C, D ; E, F ; G et H mais surtout Vap A dont la délétion rend la souche avirulente. (Jain *et al.*, 2003) (**Figure 6**) Ces gènes sont regroupés en îlot de pathogénicité sur les différents plasmides de virulence (70 kB, 80kB, 95 kB, 100kB) (Sutcliffe *et al.*, 1997) (Takai *et al.*, 2000). Même si on ne connaît pas de fonction précise à ces protéines ancrées sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique, elles contribuent à empêcher le phagosome de s'acidifier (Kristine von Bargen 2009), de fusionner avec les lysosomes, aux lymphocytes CD4 de produire de l'IFN $\gamma$  et principalement pour Vap A la survie au sein du phagosome, milieu acide et oxydant et pauvre en micro nutriment comme le fer.

L'îlot de pathogénicité, outre vap A, code pour 5 autres homologues vap, un gène tronqué *vap* et deux pseudo-gènes *vap*. En plus de ces gènes, l'îlot contient des gènes impliqués dans sa régulation notamment dans l'expression de vap A: VirR et Orf8. Quelques enzymes dont la fonction demeure mystérieuse sont aussi codées.

Figure 6 : Carte du Plasmide de virulence et liens de parenté entre les protéines Vap d'après Takai *et al.*, 2000

