

UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2012

THESE N°: 22

APPORTS DES TECHNIQUES MOLECULAIRES
EN BACTERIOLOGIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mr. Fouad CHARAFI
Né le 09 Juillet 1986 à Khenifra

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: Bactérie – Techniques moléculaires– Diagnostic – Avantages.

JURY

Mr. M. ZOUHDI

Professeur de Microbiologie

Mr. Y. SEKHSOKH

Professeur Agrégé de Microbiologie

Mr. A. BELMEKKI

Professeur d'Hématologie

Mme. S. TELLAL

Professeur Agrégé de Biochimie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سورة البقرة: الآية: 31



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLI Abdeslam Neurochirurgie

4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie – Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
12. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire

- | | | |
|-----|------------------------------|----------------------|
| 13. | Pr. BENSOUHA Mohamed | Anatomie |
| 14. | Pr. BENOSMAN Abdellatif | Chirurgie Thoracique |
| 15. | Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma | Physiologie |

Novembre 1983

- | | | |
|-----|-------------------------------|--------------------|
| 16. | Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir* | Pneumo-ptisiologie |
| 17. | Pr. BALAFREJ Amina | Pédiatrie |
| 18. | Pr. BELLAKHDAR Fouad | Neurochirurgie |
| 19. | Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia | Rhumatologie |
| 20. | Pr. SRAIRI Jamal-Eddine | Cardiologie |

Décembre 1984

- | | | |
|-----|----------------------------------|-------------------------|
| 21. | Pr. BOUCETTA Mohamed* | Neurochirurgie |
| 22. | Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil | Radiothérapie |
| 23. | Pr. MAAOUNI Abdelaziz | Médecine Interne |
| 24. | Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi | Anesthésie -Réanimation |
| 25. | Pr. NAJI M'Barek * | Immuno-Hématologie |
| 26. | Pr. SETTAF Abdellatif | Chirurgie |

Novembre et Décembre 1985

- | | | |
|-----|---------------------------------------|---|
| 27. | Pr. BENJELLOUN Halima | Cardiologie |
| 28. | Pr. BENSAD Younes | Pathologie Chirurgicale |
| 29. | Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa | Neurologie |
| 30. | Pr. IHRAI Hssain * | Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale |
| 31. | Pr. IRAQI Ghali | Pneumo-ptisiologie |
| 32. | Pr. KZADRI Mohamed | Oto-Rhino-laryngologie |

Janvier, Février et Décembre 1987

- | | | |
|-----|--------------------------------------|------------------------------|
| 33. | Pr. AJANA Ali | Radiologie |
| 34. | Pr. AMMAR Fanid | Pathologie Chirurgicale |
| 35. | Pr. CHAHED OUZZANI Houria ép.TAOBANE | Gastro-Entérologie |
| 36. | Pr. EL FASSY FIGHRI Mohamed Taoufiq | Pneumo-ptisiologie |
| 37. | Pr. EL HAITEM Naïma | Cardiologie |
| 38. | Pr. EL MANSOURI Abdellah* | Chimie-Toxicologie Expertise |
| 39. | Pr. EL YAACOUBI Moradh | Traumatologie Orthopédie |
| 40. | Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah | Gastro-Entérologie |
| 41. | Pr. LACHKAR Hassan | Médecine Interne |
| 42. | Pr. OHAYON Victor* | Médecine Interne |
| 43. | Pr. YAHYAOUI Mohamed | Neurologie |

Décembre 1988

- | | | |
|-----|---------------------------------|--------------------------|
| 44. | Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib | Chirurgie Pédiatrique |
| 45. | Pr. DAFIRI Rachida | Radiologie |
| 46. | Pr. FAIK Mohamed | Urologie |
| 47. | Pr. HERMAS Mohamed | Traumatologie Orthopédie |

48. Pr. TOLOUNE Farida*

Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNAOUI Mohamed

Médecine Interne

50. Pr. AOUNI Mohamed

Médecine Interne

51. Pr. BENAMEUR Mohamed*

Radiologie

52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali

Cardiologie

53. Pr. CHAD Bouziane

Pathologie Chirurgicale

54. Pr. CHKOFF Rachid

Pathologie Chirurgicale

55. Pr. FARCHADO Fouzia ép.BENABDELLAH

Pédiatrique

56. Pr. HACHIM Mohammed*

Médecine-Interne

57. Pr. HACHIMI Mohamed

Urologie

58. Pr. KHARBACH Aïcha

Gynécologie -Obstétrique

59. Pr. MANSOURI Fatima

Anatomie-Pathologique

60. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Neurologie

61. Pr. SEDRATI Omar*

Dermatologie

62. Pr. TAZI Saoud Anas

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

63. Pr. AL HAMANY Zaïtounia

Anatomie-Pathologique

64. Pr. ATMANI Mohamed*

Anesthésie Réanimation

65. Pr. AZZOUZI Abderrahim

Anesthésie Réanimation

66. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM

Néphrologie

67. Pr. BELKOUCHI Abdelkader

Chirurgie Générale

68. Pr. BENABDELLAH Chahrazad

Hématologie

69. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif

Chirurgie Générale

70. Pr. BENSOUDA Yahia

Pharmacie galénique

71. Pr. BERRAHO Amina

Ophtalmologie

72. Pr. BEZZAD Rachid

Gynécologie Obstétrique

73. Pr. CHABRAOUI Layachi

Biochimie et Chimie

74. Pr. CHANA El Houssaine*

Ophtalmologie

75. Pr. CHERRAH Yahia

Pharmacologie

76. Pr. CHOKAIRI Omar

Histologie Embryologie

77. Pr. FAJRI Ahmed*

Psychiatrie

78. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*

Chirurgie Générale

79. Pr. KHATTAB Mohamed

Pédiatrie

80. Pr. NEJMI Maati

Anesthésie-Réanimation

81. Pr. OUAALINE Mohammed*

Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène

82. Pr. SOULAYMANI Rachida ép.BENCHEIKH

Pharmacologie

83. Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

Décembre 1992

84. Pr. AHALLAT Mohamed

Chirurgie Générale

85. Pr. BENOUDA Amina

Microbiologie

86. Pr. BENSOUDA Adil

Anesthésie Réanimation

87. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
88. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
89. Pr. CHRAIBI Chafiq
90. Pr. DAOUDI Rajae
91. Pr. DEHAYNI Mohamed*
92. Pr. EL HADDOURY Mohamed
93. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
94. Pr. FELLAT Rokaya
95. Pr. GHAFIR Driss*
96. Pr. JIDDANE Mohamed
97. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
98. Pr. TAGHY Ahmed
99. Pr. ZOUHDI Mimoun

Radiologie
 Gastro-Entérologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Anesthésie Réanimation
 Neurochirurgie
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Anatomie
 Gynécologie Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie

Mars 1994

100. Pr. AGNAOU Lahcen
101. Pr. AL BAROUDI Saad
102. Pr. BENCHERIFA Fatiha
103. Pr. BENJAAFAR Noureddine
104. Pr. BENJELLOUN Samir
105. Pr. BEN RAIS Nozha
106. Pr. CAOUI Malika
107. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
108. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT
109. Pr. EL AOUDAD Rajae
110. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
111. Pr. EL HASSANI My Rachid
112. Pr. EL IDRISSI LAMGHARI Abdennaceur
113. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*
114. Pr. ERROUGANI Abdelkader
115. Pr. ESSAKALI Malika
116. Pr. ETTAYEBI Fouad
117. Pr. HADRI Larbi*
118. Pr. HASSAM Badredine
119. Pr. IFRINE Lahssan
120. Pr. JELTHI Ahmed
121. Pr. MAHFOUD Mustapha
122. Pr. MOUDENE Ahmed*
123. Pr. OULBACHA Said
124. Pr. RHRAB Brahim
125. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR
126. Pr. SLAOUI Anas

Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Ophtalmologie
 Radiothérapie
 Chirurgie Générale
 Biophysique
 Biophysique
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Gynécologie Obstétrique
 Immunologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Chirurgie Cardio- Vasculaire
 Chirurgie Générale
 Immunologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Médecine Interne
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique
 Traumatologie – Orthopédie
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie –Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

- 127. Pr. ABBAR Mohamed*
- 128. Pr. ABDELHAK M'barek
- 129. Pr. BELAIDI Halima
- 130. Pr. BRAHMI Rida Slimane
- 131. Pr. BENTAHILA Abdelali
- 132. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
- 133. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
- 134. Pr. CHAMI Ilham
- 135. Pr. CHERKAoui Lalla Ouafae
- 136. Pr. EL ABBADI Najia
- 137. Pr. HANINE Ahmed*
- 138. Pr. JALIL Abdelouahed
- 139. Pr. LAKHDAR Amina
- 140. Pr. MOUANE Nezha

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

- 141. Pr. ABOUQUAL Redouane
- 142. Pr. AMRAoui Mohamed
- 143. Pr. BAIDADA Abdelaziz
- 144. Pr. BARGACH Samir
- 145. Pr. BEDDOUCHE Amokrane*
- 146. Pr. BENAZZOUZ Mustapha
- 147. Pr. CHAARI Jilali*
- 148. Pr. DIMOU M'barek*
- 149. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
- 150. Pr. EL MESNAoui Abbes
- 151. Pr. ESSAKALI HOUSSEINI Leila
- 152. Pr. FERHATI Driss
- 153. Pr. HASSOUNI Fadil
- 154. Pr. HDA Abdelhamid*
- 155. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
- 156. Pr. IBRAHIMY Wafaa
- 157. Pr. MANSOURI Aziz
- 158. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
- 159. Pr. RZIN Abdelkader*
- 160. Pr. SEFIANI Abdelaziz
- 161. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Urologie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie Obstétrique
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

- 162. Pr. AMIL Touriya*
- 163. Pr. BELKACEM Rachid
- 164. Pr. BELMAHI Amin
- 165. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
- 166. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Chirurgie réparatrice et plastique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale

167. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
168. Pr. GAOUZI Ahmed
169. Pr. MAHFOUDI M'barek*
170. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
171. Pr. MOHAMMADI Mohamed
172. Pr. MOULINE Soumaya
173. Pr. OUADGHIRI Mohamed
174. Pr. OUZEDDOUN Naima
175. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Parasitologie
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-phtisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

176. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
177. Pr. BEN AMAR Abdesselem
178. Pr. BEN SLIMANE Lounis
179. Pr. BIROUK Nazha
180. Pr. BOULAICH Mohamed
181. Pr. CHAOUIR Souad*
182. Pr. DERRAZ Said
183. Pr. ERREIMI Naima
184. Pr. FELLAT Nadia
185. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
186. Pr. HAIMEUR Charki*
187. Pr. KANOUNI NAWAL
188. Pr. KOUTANI Abdellatif
189. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
190. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
191. Pr. NAZI M'barek*
192. Pr. OUAHABI Hamid*
193. Pr. SAFI Lahcen*
194. Pr. TAOUFIQ Jallal
195. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
O.R.L.
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Physiologie
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

196. Pr. AFIFI RAJAA
197. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
198. Pr. ALOUANE Mohammed*
199. Pr. BENOMAR ALI
200. Pr. BOUGTAB Abdesslam
201. Pr. ER RIHANI Hassan
202. Pr. EZZAITOUNI Fatima
203. Pr. KABBAJ Najat
204. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-Laryngologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

205. Pr. BENKIRANE Majid*

Hématologie

206. Pr. KHATOURI ALI*
207. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

208. Pr. ABID Ahmed*
209. Pr. AIT OUMAR Hassan
210. Pr. BENCHERIF My Zahid
211. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
212. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
213. Pr. CHAOUI Zineb
214. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
215. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
216. Pr. EL FTOUH Mustapha
217. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
218. Pr. EL OTMANY Azzedine
219. Pr. GHANNAM Rachid
220. Pr. HAMMANI Lahcen
221. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
222. Pr. ISMAILI Hassane*
223. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
224. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
225. Pr. TACHINANTE Rajae
226. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

227. Pr. AIDI Saadia
228. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
229. Pr. AJANA Fatima Zohra
230. Pr. BENAMR Said
231. Pr. BENCHEKROUN Nabiha
232. Pr. CHERTI Mohammed
233. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
234. Pr. EL HASSANI Amine
235. Pr. EL IDGHIRI Hassan
236. Pr. EL KHADER Khalid
237. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
238. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
239. Pr. HSSAIDA Rachid*
240. Pr. LACHKAR Azzouz
241. Pr. LAHLOU Abdou
242. Pr. MAFTAH Mohamed*
243. Pr. MAHASSINI Najat
244. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
245. Pr. NASSIH Mohamed*
246. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2001

247. Pr. ABABOU Adil	Anesthésie-Réanimation
248. Pr. AOUAD Aicha	Cardiologie
249. Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
250. Pr. BELMEKKI Mohammed	Ophtalmologie
251. Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
252. Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
253. Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-phtisiologie
254. Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
255. Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
256. Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
257. Pr. BENYOUSSEF Khalil	Dermatologie
258. Pr. BERRADA Rachid	Gynécologie Obstétrique
259. Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
260. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi	Anatomie
261. Pr. BOUHOUCHE Rachida	Cardiologie
262. Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
263. Pr. CHAT Latifa	Radiologie
264. Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
265. Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
266. Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
267. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira	Gynécologie Obstétrique
268. Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
269. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
270. Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
271. Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
272. Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
273. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil	Radiologie
274. Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
275. Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
276. Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
277. Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
278. Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
279. Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
280. Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
281. Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
282. Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
283. Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
284. Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
285. Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
286. Pr. NABIL Samira	Gynécologie Obstétrique
287. Pr. NOUINI Yassine	Urologie
288. Pr. OUALIM Zouhir*	Néphrologie
289. Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
290. Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique

291. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
292. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Pédiatrie
Urologie

Décembre 2002

293. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
294. Pr. AMEUR Ahmed *
295. Pr. AMRI Rachida
296. Pr. AOURARH Aziz*
297. Pr. BAMOU Youssef *
298. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
299. Pr. BENBOUAZZA Karima
300. Pr. BENZEKRI Laila
301. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
302. Pr. BERNOUSSI Zakiya
303. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
304. Pr. CHOHO Abdelkrim *
305. Pr. CHKIRATE Bouchra
306. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
307. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
308. Pr. EL BARNOUSSI Leila
309. Pr. EL HAOURI Mohamed *
310. Pr. EL MANSARI Omar*
311. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
312. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
313. Pr. HADDOUR Leila
314. Pr. HAJJI Zakia
315. Pr. IKEN Ali
316. Pr. ISMAEL Farid
317. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
318. Pr. KRIOULE Yamina
319. Pr. LAGHMARI Mina
320. Pr. MABROUK Hfid*
321. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
322. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
323. Pr. MOUSTAINE My Rachid
324. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
325. Pr. OUJILAL Abdelilah
326. Pr. RACHID Khalid *
327. Pr. RAISS Mohamed
328. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
329. Pr. RHOU Hakima
330. Pr. SIAH Samir *
331. Pr. THIMOU Amal
332. Pr. ZENTAR Aziz*
333. Pr. ZRARA Ibtisam*

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Rhumatologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Gynécologie Obstétrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

334. Pr. ABDELLAH El Hassan	Ophtalmologie
335. Pr. AMRANI Mariam	Anatomie Pathologique
336. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas	Oto-Rhino-Laryngologie
337. Pr. BENKIRANE Ahmed*	Gastro-Entérologie
338. Pr. BENRAMDANE Larbi*	Chimie Analytique
339. Pr. BOUGHALEM Mohamed*	Anesthésie Réanimation
340. Pr. BOULAADAS Malik	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
341. Pr. BOURAZZA Ahmed*	Neurologie
342. Pr. CHAGAR Belkacem*	Traumatologie Orthopédie
343. Pr. CHERRADI Nadia	Anatomie Pathologique
344. Pr. EL FENNI Jamal*	Radiologie
345. Pr. EL HANCHI ZAKI	Gynécologie Obstétrique
346. Pr. EL KHORASSANI Mohamed	Pédiatrie
347. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*	Cardiologie
348. Pr. HACHI Hafid	Chirurgie Générale
349. Pr. JABOUIRIK Fatima	Pédiatrie
350. Pr. KARMANE Abdelouahed	Ophtalmologie
351. Pr. KHABOUZE Samira	Gynécologie Obstétrique
352. Pr. KHARMAZ Mohamed	Traumatologie Orthopédie
353. Pr. LEZREK Mohammed*	Urologie
354. Pr. MOUGHIL Said	Chirurgie Cardio-Vasculaire
355. Pr. NAOUMI Asmae*	Ophtalmologie
356. Pr. SAADI Nozha	Gynécologie Obstétrique
357. Pr. SASSENOU ISMAIL*	Gastro-Entérologie
358. Pr. TARIB Abdelilah*	Pharmacie Clinique
359. Pr. TIJAMI Fouad	Chirurgie Générale
360. Pr. ZARZUR Jamila	Cardiologie

Janvier 2005

361. Pr. ABBASSI Abdellah	Chirurgie Réparatrice et Plastique
362. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*	Chirurgie Générale
363. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid	Microbiologie
364. Pr. ALLALI Fadoua	Rhumatologie
365. Pr. AMAR Yamama	Néphrologie
366. Pr. AMAZOUZI Abdellah	Ophtalmologie
367. Pr. AZIZ Noureddine*	Radiologie
368. Pr. BAHIRI Rachid	Rhumatologie
369. Pr. BARKAT Amina	Pédiatrie
370. Pr. BENHALIMA Hanane	Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
371. Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
372. Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
373. Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie

374. Pr. BOUKLATA Salwa	Radiologie
375. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
376. Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
377. Pr. EL HAMZAoui Sakina	Microbiologie
378. Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
379. Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
380. Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
381. Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
382. Pr. KENDOOUSSI Mohamed*	Cardiologie
383. Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
384. Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
385. Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
386. Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
387. Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
388. Pr. TNACHERI OUZZANI Btissam	Ophtalmologie
389. Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
424. Pr. AFIFI Yasser	Dermatologie
425. Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
426. Pr. BELGNAoui Fatima Zahra	Dermatologie
427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
428. Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
429. Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio – Vasculaire
432. Pr. CHEIKHAoui Younes	Chirurgie Cardio – Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa	Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibtissam	Cardiologie
437. Pr. FAROUDY Mamoun	Anesthésie Réanimation
438. Pr. GHADOUANE Mohammed*	Urologie
439. Pr. HARMOUCHE Hicham	Médecine Interne
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*	Anesthésie Réanimation
441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine	Microbiologie
442. Pr. JROUNDI Laila	Radiologie
443. Pr. KARMOUNI Tariq	Urologie
444. Pr. KILI Amina	Pédiatrie
445. Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
446. Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*	Médecine Interne
448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique

449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 450. Pr. MANSOURI Hamid*
 451. Pr. NAZIH Naoual
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak
 453. Pr. SAFI Soumaya*
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 455. Pr. SEFIANI Sana
 456. Pr. SOUALHI Mouna
 457. Pr. TELLAL Saida*
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 461. Pr. LALAOU SALIM Jaafar *
 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
 463. Pr. TOUATI Zakia
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra*
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
 469. Pr. EL ABSI Mohamed
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad*
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 473. Pr. GHARIB Nouredine
 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
 475. Pr. ISMAILI Nadia
 476. Pr. MASRAR Azlarab
 477. Pr. RABHI Monsef *
 478. Pr. MRABET Mustapha *
 479. Pr. SEKHSOKH Yessine *
 480. Pr. SEFFAR Myriame
 481. Pr. LOUZI Lhoussain *
 482. Pr. MRANI Saad *
 483. Pr. GANA Rachid
 484. Pr. ICHOU Mohamed *
 485. Pr. TACHFOUTI Samira
 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 487. Pr. MELLAL Zakaria
 488. Pr. AMMAR Haddou *
 489. Pr. AOUI Sarra

Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie
 Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie
 Hématologie biologique
 Médecine interne
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Virologie
 Neuro chirurgie
 Oncologie médicale
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 ORL
 Parasitologie

490. Pr. TLIGUI Houssain
 491. Pr. MOUTAJ Redouane *
 492. Pr. ACHACHI Leila
 493. Pr. MARC Karima
 494. Pr. BENZIANE Hamid *
 495. Pr. CHERKAOUI Naoual *
 496. Pr. EL OMARI Fatima
 497. Pr. MAHI Mohamed *
 498. Pr. RADOUANE Bouchaib*
 499. Pr. KEBDANI Tayeb
 500. Pr. SIFAT Hassan *
 501. Pr. HADADI Khalid *
 502. Pr. ABIDI Khalid
 503. Pr. MADANI Naoufel
 504. Pr. TANANE Mansour *
 505. Pr. AMHAJJI Larbi *

Parasitologie
 Parasitologie
 Pneumo phtisiologie
 Pneumo phtisiologie
 Pharmacie clinique
 Pharmacie galénique
 Psychiatrie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Réanimation médicale
 Réanimation médicale
 Traumatologie orthopédie
 Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes
 Pr. AZENDOUR Hicham *
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. EL OUENNASS Mostapha
 Pr. ZOUHAIR Said*
 Pr. L'kassimi Hachemi*
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia

Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie
 Cardiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Dermatologie
 Gastro-entérologie
 Gynécologie obstétrique
 Hématologie biologique
 Hématologie biologique
 Hématologie clinique
 Médecine interne
 Médecine interne
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Neuro-chirurgie
 Neurologie

Pr. AGADR Aomar *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. BASSOU Driss *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 Pr. KADI Said *

Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phtisiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Rhumatologie
 Traumatologie orthopédique
 Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufik*
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. CHERRADI Ghizlan
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. KANOUNI Lamya
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. BOUSSIF Mohamed*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. RAISSOUNI Zakaria*
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. LEZREK Mounir
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. ZOUAIDIA Fouad
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. CHADLI Mariama*

Médecine interne
 Gastro entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie réanimation
 Radiothérapie
 Radiologie
 Radiologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Médecine aérologique
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Chirurgie pédiatrique
 Urologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 ORL
 Ophtalmologie
 Hématologie
 Anatomie pathologique
 Anatomie pathologique
 Physiologie
 Biochimie chimie
 Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1.	Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
2.	Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie
3.	Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
4.	Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
5.	Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
6.	Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
7.	Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
8.	Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
9.	Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie
10.	Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
11.	Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
12.	Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
13.	Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootéchnie
14.	Pr. FAOUZI Moulay El Abbès	Pharmacologie
15.	Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
16.	Pr. IBRAHIMI Azeddine	
17.	Pr. KABBAJ Ouafae	Biochimie
18.	Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
19.	Pr. REDHA Ahlam	Biochimie
20.	Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
21.	Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
22.	Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
23.	Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

**** Enseignants Militaires***

Dédicaces

A mes très chers parents que j'adore
CHARAFI Mohammed et BERAICH Rquia

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, mon instruction et mon bien être.

Vos prières et vos encouragements, m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours.

En ce jour, j'espère réaliser un de vos rêves et être digne de votre confiance et de votre amour.

Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai vous remercier. Seul dieu tout puissant pourra vous récompenser.

Merveilleux parents, j'espère que j'ai été à la hauteur de vos espérances.

Que Dieu vous garde et vous accorde une longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.

A mon ch  r grand-père et ma chère grand-mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'amour, l'attachement, la reconnaissance et l'admiration que j'éprouve pour vous.

A mes ch  rs frères

Mohammed, Salim, Othman, Soufyane et le petit isma  l

Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour votre soutien, votre compréhension et vos encouragements.

Veillez trouver dans ce travail, le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux,

Que Dieu vous b  n  isse et vous offre un avenir prospère.

A la mémoire de mon frère Drissi, mon grand-père et ma grand-mère

Que Dieu les b  n  isse

A ma belle famille

Que ce travail soit le témoin de toute mon affection, ma gratitude, mon estime et mon attachement.

A mes chers amis

Zyad E, Abdelmalek Z, Youness B, Abdessamad J, Abdessamad E, Rachid B, Oussama S, Hicham M, Ismail B, Rida E, Mohammed I, Abdelhadi R, Khalid B, et Mohammed B

Je vous dédie ce travail en hommage à tous les moments agréables, inoubliables que nous avons vécu ensemble, veuillez trouver l'expression de ma tendre affection et mes sentiments les plus respectueux avec mes vœux de succès, de bonheur et de bonne santé.

A tous ceux que j'aime...

A tous mes enseignants tout au long de mes études

A toute ma promotion 2006/2011

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

A tous ceux qui ont cette pénible tâche de soulager les gents et diminuer leurs souffrances

Enfin à tous ceux que j'ai omis de citer

Remerciements

A notre maître et président de thèse

Monsieur le professeur M. ZOUMDI

Professeur de Microbiologie

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant la présidence du jury de cette thèse avec plaisir et sans condition.

Votre compétence pédagogique, votre modestie et votre gentillesse nous ont énormément marqué.

Veillez trouver ici Monsieur l'expression de notre haute considération, de notre profond respect et de notre profonde gratitude.

A notre maître et rapporteur de thèse
Monsieur le professeur Y. SEKHSOKH
Professeur agrégé de Microbiologie

Vous m'avez fait le grand honneur et le plaisir d'être le rapporteur de mon travail.

Vous m'avez guidé et conseillé tout au long de l'élaboration de ce travail avec la compétence, la rigueur scientifique et l'extrême gentillesse qui vous caractérisent.

Que ce travail, si modeste qu'il soit, puisse être message de mes sentiments les plus respectueux et de toute ma reconnaissance.

A notre maître et juge de thèse
Monsieur le professeur A. BELMEKKI
Professeur agrégé d'Hématologie

Nous vous remercions du grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre modeste travail.

Votre compétence pédagogique et votre gentillesse nous ont énormément marqué.

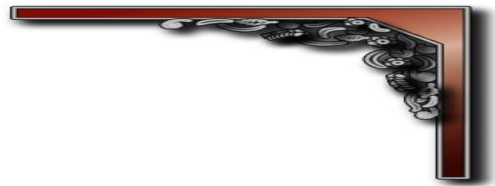
Veillez accepter, l'assurance de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

À notre maître et juge de thèse
Madame le professeur S. TELLAL
Professeur agrégé de Biochimie

*Je vous remercie vivement de l'intérêt que vous avez bien voulu accorder
à notre travail en acceptant de siéger parmi le jury de thèse.*

Votre compétence et votre modestie nous ont énormément marqué.

*Veillez accepter Madame, l'expression de notre profond respect et notre
profonde gratitude.*



Sommaire



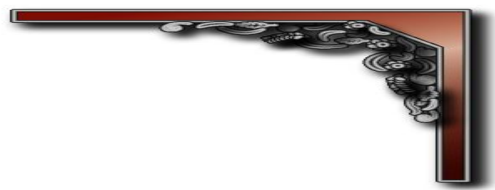
Introduction	1
Chapitre I : Rappels	3
1. Biologie moléculaire	4
1.1. Historique	4
1.2. Définition	7
1.3. Structure et fonctions des acides nucléiques	8
1.3.1. Acides nucléiques	8
1.3.1.1. Acide désoxyribonucléique	8
1.3.1.2. Acide ribonucléique	9
1.3.2. Fonctionnement du génome eucaryote	10
1.3.2.1. Transcription génique	10
1.3.2.2. Régulation post-transcriptionnelle	11
2. Bactéries et infections bactériennes	11
2.1. Définition et structure	11
Chapitre II : Techniques de biologie moléculaire	14
1. Préparation des échantillons	16
1.1. Techniques de lyse bactérienne	17
1.1.1. Méthodes physiques	17
1.1.2. Méthodes chimiques	17
1.1.3. Méthodes enzymatiques	17
1.1.4. Méthodes utilisant les tensioactifs	17
1.2. Techniques d'extraction	18
1.2.1. Méthodes manuelles	18
1.2.2. Méthodes automatisées	19
2. Techniques d'amplification	21
2.1. Amplification par cycles thermiques	21
2.1.1. Réaction de polymérase en chaîne ou PCR	21
2.1.2. Ligase Chain Reaction	24
2.2. Techniques isothermes	25
2.2.1. Nucleic acid sequence-based amplification	25

2.2.2. Transcription-mediated amplification	26
2.2.3. Strand displacement amplification	26
2.2.4. Rolling circle amplification	27
2.2.5. Cycling probe technology	27
2.2.6. ADN branché ou b-DNA.....	27
2.2.7. Système de capture d'hybrides.....	28
2.2.8. Autres techniques	29
2.3. Techniques de détection.....	29
2.3.1. Billes magnétiques	29
2.3.2. Puces d'ADN.....	29
2.3.3. Techniques de séquençage	31
2.3.4. Techniques d'hybridation directe	34
2.3.4.1. Hybridation in situ (FISH)	34
2.3.4.2. Reverse dot-blot (système line probe assay (LIPA))	34
2.3.4.3. Technique Hybridization Protection Assay (HPA).....	35
2.3.5. Spectrométrie de masse	35
3. Bases de l'installation d'un laboratoire de biologie moléculaire.....	36
3.1. Sécurité contre les agents infectieux	36
3.2. Contrôles de qualité	36
3.3. Contrôles positifs et négatifs	37
3.4. Contrôles internes et externes	37
3.5. Risque de contamination	37
3.6. Logistique	38
3.7. Obligations à respecter	38
4. Contrôle qualité en biologie moléculaire	38
4.1. Prévention des erreurs	38
4.1.1. Faux positifs	38
4.1.2. Faux négatifs	39
5. Avantages et inconvénients de la biologie moléculaire	39
6. Quelle technique utiliser ?	40
7. Quel résultat attendre ?.....	41

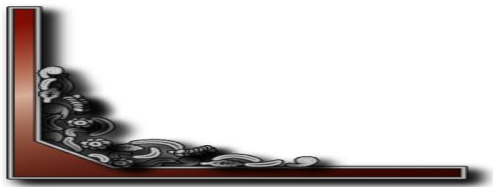
7.1. Résultat qualitatif	41
7.2. Résultat quantitatif	41
Chapitre III : Applications des techniques de biologie moléculaire	42
1. Diagnostic et suivi des infections à mycobactéries	43
1.1. Détection de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
1.2. Identification des mycobactéries	46
2. Diagnostic des infections bactériennes du système nerveux central	48
2.1. Techniques monoplexes.....	49
2.1.1. <i>Neisseria meningitidis</i>	49
2.1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	49
2.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	49
2.2. Techniques multiplexes	50
3. Les infections bactériennes des voies respiratoires basses	51
3.1. Techniques monoplexes.....	52
3.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	52
3.1.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	53
3.1.3. <i>Legionella pneumophila</i>	54
3.1.4. <i>Chlamidophila pneumoniae</i>	56
3.1.5. <i>Bordetella pertussis</i>	57
3.2. Techniques multiplexes.....	58
4. Les infections bactériennes gastro-intestinales :	60
4.1. <i>Clostridium difficile</i>	60
4.1.1. Les techniques de PCR en temps réel.....	61
4.1.2. La technologie LAMP	62
4.2. <i>Campylobacter</i>	62
4.3. <i>Escherichia coli</i>	63
4.4. <i>Helicobacter pylori</i>	64
5. Les infections bactériennes uro-génitales :	66
5.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	66
5.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	68
5.3. <i>Treponema pallidum</i>	68

5.4. <i>Mycoplasma genitalium</i>	69
5.5. <i>Haemophilus ducreyi</i>	69
5.6. <i>Yersinia enterocolitica</i>	69
6. Intérêt pour les infections bactériennes en dermatologie	70
6.1. <i>Borrelia burgdorferi</i>	70
6.2. <i>Bartonella henselae</i>	72
6.3. Les Rickettsies	73
6.4. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)	74
6.5. <i>Mycobactérium leprae</i>	75
7. Intérêt des techniques moléculaires en septicémies bactériennes	76
7.1. Techniques de diagnostic moléculaire :	77
7.1.1. Techniques d'hybridation sur hémocultures positives :	77
7.1.2. Techniques d'amplification sur hémocultures positives	78
7.1.2.1. Essais à large spectre	79
7.1.2.2. Essais multiplex :	80
7.1.3. Techniques d'amplification pour les échantillons de sang total	82
7.1.3.1. PCR pathogène-spécifique	82
7.1.3.2. PCR à large spectre	83
7.1.3.3. PCR multiplex :	83
8. Endocardites infectieuses	86
8.1. Techniques moléculaires utilisées au diagnostic des endocardites :	87
8.2. Limites des techniques de biologie moléculaire	89
8.3. Quand demander une analyse moléculaire pour le diagnostic	89
9. Autres domaines d'application des techniques moléculaires :	90
9.1 Antibiorésistance :	90
9.1.1. Intérêt de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques	90
9.1.2. Exemples d'applications :	91
9.1.2.1. Détection génotypique des résistances des staphylocoques	91
9.1.2.2. <i>Mycobactérium tuberculosis</i>	92
9.1.2.3. <i>Enterococcus faecium</i>	94
9.2 Epidémiologie :	95

9.2.1. Analyse microbiologique et typage de l'agent responsable	95
9.2.2. Techniques de typage	95
9.2.2.1. Typage basé sur les empreintes génétiques	95
9.2.2.2. Typage basé sur la PCR	98
9.2.2.3. Typage basé sur la séquence	100
9.3 Urgences diagnostiques	101
9.4 Bioterrorisme	102
9.4.1. Classification des agents potentiels du bioterrorisme (classes A, B et C).....	103
9.4.2. Les différents outils moléculaires de détection des bactéries potentielles du bioterrorisme :.....	104
9.4.3. Nouvelles technologies :.....	106
9.5 Applications au chevet du patient ou POC	107
9.5.1. Les technologies actuelles d'analyse des acides nucléiques	108
9.5.2. Certaines applications.....	110
9.5.2.1. La tuberculose.....	110
9.5.2.2. Streptocoque du groupe B	111
9.5.2.3. Surveillance et diagnostic du SARM :	111
9.6 Génétique, infections et biologie moléculaire	111
10. Perspectives d'évolution du diagnostic moléculaire en bactériologie :	112
10.1. Appareillage	112
10.2. Miniaturisation	113
10.3. Limite de détection	114
10.4. Précision	115
10.5. Quantification	115
10.6. Disponibilité sur site, la portabilité (par exemple, pour POC)	115
10.7. Coût	116
Conclusion	117
Résumés	
Annexes	
Bibliographie	



Liste des abréviations



ADN	: Acide désoxyribonucléique
AN	: Acide nucléique
ARN	: Acide ribonucléique
BSI	: Bloodstream infection
CDC	: Center for disease control and prevention
DGGE	: Denaturing gradient gel electrophoresis;
DHPLC	: Denaturing high performance liquid chromatography
EI	: Endocardite infectieuse
FDA	: Food and drug administration
HPA	: Hybridization protection assay
LAMP	: Loop mediated isothermal amplification
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LCRe	: Ligase chain reaction
MALDI-TOF	: Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
MIRU	: <i>Mycobacterium</i> intespersed repetitive units
NASBA	: Nucleic acid sequence-based amplification
PAC	: Pneumonie aigue communautaire
PCR	: Polymerase chain reaction
PFGE	: Electrophorèse en champ pulsé
PNA-FISH	: Peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridisation
POC NAT	: Point of care nucleic acid test
RCA	: Rolling circle amplification
REA	: Restriction endonuclease analysis

RT-PCR	: Reverse-transcription PCR
SCoN	: <i>Staphylococcus</i> coagulase-négative
SDA	: Strand displacement amplification
SNP	: Single-nucléotide polymorphism
TMA	: Transcription-mediated amplification
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VNTR	: Variable number tandem repeat

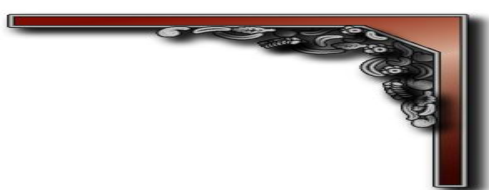


Liste des figures



Figure 1 : James D. Watson (à gauche) et Francis Crick (à droite) devant leur modèle tridimensionnel de la double hélice d'ADN.....	6
Figure 2 : Ultrastructure de l'ADN.	6
Figure 3 : Principe de l'hybridation moléculaire.....	7
Figure 4 : Structure et morphologie bactérienne	12
Figure 5 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif.....	13
Figure 6 : Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif.....	13
Figure 7 : Évolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR à nos jours.....	15
Figure 8 : Principales étapes d'analyse d'un échantillon en biologie moléculaire.	16
Figure 9 : Plateformes disponibles sur le marché les plus utilisées actuellement pour l'extraction des acides nucléiques en routine diagnostique.....	21
Figure 10 : Polymerase chain reaction.	22
Figure 11 : Ligase chain reaction.	24
Figure 12 : La technique nucleic acid sequence-based amplification (NASBA).	25
Figure 13 : Transcription-mediated Amplification.....	26
Figure 14 : Technique d'ADN branché.	28
Figure 15 : Système de capture d'hybrides.	28
Figure 16 : Aspect d'un microarray.....	30
Figure 17 : Caractéristiques d'une puce GeneChip®.	31
Figure 18 : Principe d'analyse sur microarray.....	31
Figure 19 : Technique de Maxam-Gilbert.	32
Figure 20 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger.	33
Figure 21 : Exemple d'application de l'hybridation moléculaire : l'hybridation in situ ou FISH (fluorescent in situ hybridization).	34
Figure 22 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	35

Figure 23 : Spectromètre de masse MALDI-TOF.....	36
Figure 24: La détection visuelle de la réaction LAMP en utilisant l'indicateur de métal fluorescent.	44
Figure 25 : Plateforme Xpert MTB/RIF de Cepheid.....	45
Figure 26 : INNO-LIPA Rif.TB.	47
Figure 27 : GenoQuick1 Bordetella.	58
Figure 28 : Représentation schématique des alternances de séquences conservées et variables dans les gènes codant pour l'ARN 16S.	88
Figure 29 : Genotype® MTBDRplus : détection des résistances de M. tuberculosis à la rifampicine et à l'isoniazide.	93
Figure 30 : Principe de la RFLP.....	96
Figure 31 : Exemple de polymorphisme des fragments de restriction sondés pour l'élément IS6110.	96
Figure 32 : Électrophorèse en champ pulsé (PFGE).	98
Figure 33 : Mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU).....	100
Figure 34 : Représentation schématique de la détection par hybridation d'ADN avec les nanobareaux d'or.	114



Liste des tableaux



Tableau 1 : Extraction automatique des acides nucléiques à partir des bactéries.	20
Tableau 2 : Principales techniques d'amplification et gammes de kits utilisées en microbiologie clinique.....	29
Tableau 3 : Exemples de critères de décision pour choisir une technique.	40
Tableau 4 : Apport de la PCR dans le diagnostic des méningites bactériennes.	51
Tableau 5 : Sensibilité et spécificité des méthodes diagnostiques de la légionellose.	55
Tableau 6 : Méthodes de diagnostic des infections à <i>C. difficile</i> . Avantages et inconvénients.....	61
Tableau 7 : Avantages et inconvénients des tests à la recherche d' <i>Helicobacter pylori</i>	65
Tableau 8 : Techniques de détection de <i>C. trachomatis</i>	67
Tableau 9 : Sensibilité comparée des méthodes biologiques en fonction de la forme clinique.	72
Tableau 10 : Intérêt des différentes méthodes de diagnostic en fonction du tableau clinique.	73
Tableau 11 : Techniques d'hybridation pour la détection des bactéries sur hémocultures positives.	78
Tableau 12 : Techniques d'amplification pour la détection des agents pathogènes en hémocultures positives.....	81
Tableau 13 : résumé des principales propriétés des techniques d'amplification sur sang total.	86
Tableau 14 : Nombre de copies, par chromosome, d'opéron codant pour les ARN ribosomaux de quelques espèces bactériennes.	89
Tableau 15 : Gènes de résistance utiles pour la détection de la résistance aux antibiotiques par test génotypique.	94
Tableau 16 : Liste du CDC des agents du bioterrorisme catégorie A, B et C.	103
Tableau 17 : Exemple des plateformes TAN POC commercialisées ou proches d'être sur le marché.....	109
Tableau 18 : technologies innovatrices pour le diagnostic en bactériologie.	116



Liste des annexes

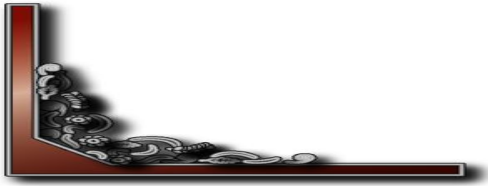


Annexe 1 : Principales gammes de kits commercialisées pour la microbiologie clinique.

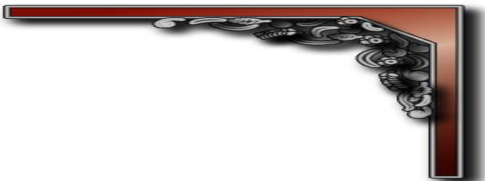
Annexe 2 : Exemples de polymorphismes génétiques liés à la réponse aux infections.



Introduction



Au cours de la dernière décennie, l'activité des laboratoires de microbiologie clinique a été bouleversée par l'introduction des techniques de biologie moléculaire et l'automatisation des laboratoires. La biologie moléculaire est omniprésente en biologie médicale et plus particulièrement en bactériologie. De nombreux articles démontrent son importance tant dans le domaine du diagnostic que du pronostic, de l'évaluation thérapeutique, de l'épidémiologie ou des risques biologiques naturels ou non. La quantité considérable d'articles sur ce sujet, n'apporte pas toujours une réponse évidente sur le rôle de la biologie moléculaire dans un laboratoire de bactériologie qu'il soit hospitalier ou non. Les techniques de biologie moléculaire pour la détection et la caractérisation des microorganismes ont révolutionné le diagnostic en bactériologie et font maintenant partie intégrante de l'activité de routine de nombreux laboratoires hospitaliers. En particulier la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le séquençage et la PCR en temps réel ont permis d'ouvrir la voie d'une nouvelle ère qui permet une détection rapide des microorganismes dits fastidieux ou émergents qui n'étaient pas habituellement détectés par les techniques traditionnelles, grâce aux techniques moléculaires on vient de raccourcir le temps requis pour la sortie des résultats d'analyses microbiologiques en passant de l'échelle du jour à l'heure voire la minute (*Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*). De la même manière, l'utilisation de ces techniques, en particulier le séquençage, permettent dorénavant de détecter et d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques et donnent des informations épidémiologiques sur les épidémies à l'aide des techniques de génotypage. Les traitements de certaines bactéries ont été améliorés par la détection de la résistance aux antibiotiques et à l'utilisation de la PCR quantitative qui permet de calculer la charge bactérienne et ainsi de surveiller le suivi thérapeutique des patients au cours de leurs traitements. Enfin, l'utilisation de PCR dite multiplex, en temps réel, ainsi que l'amélioration des performances des automates conduisent à une diminution considérable du coût des techniques moléculaires. Cette présentation vise à évaluer l'utilité des méthodes moléculaires utilisées dans les laboratoires de bactériologie clinique.



Chapitre I : *Rappels*

1. Biologie moléculaire

1.1. Historique [1]

Le 25 avril 1953 la revue *Nature* publiait un court article de James D. Watson et Francis H. Crick proposant un modèle de structure en double hélice pour l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'ADN lui-même avait été découvert presque un siècle auparavant, en 1869, par un scientifique suisse, Johan Friedrich Miescher qui observait les noyaux des globules blancs dans du pus collecté sur des bandages de malades infectés. Il lui donna le nom de nucléine. C'est seulement en 1944 que l'équipe d'Oswald Avery, Colin McLeod et McLyn McCarthy à l'institut Rockefeller de New York, réalise une expérience de transformation bactérienne déjà décrite en 1928 par l'anglais Fred Griffith, et démontre que le facteur transformant est de l'ADN, ce qui faisait de cette molécule le support de l'information génétique. Mais la composition particulièrement pauvre de cette molécule (quatre bases azotées, un sucre et du phosphate) ainsi que sa structure très répétitive rendent sceptique la communauté scientifique qui se fait une idée plus sophistiquée du support de l'hérédité. Du fait de leur plus grande complexité et de leur activité biologique déjà connue, les protéines sont alors de meilleurs candidats pour tenir ce rôle. L'importance des travaux d'Avery n'échappera cependant pas au biochimiste Erwin Chargaff qui s'intéresse alors à l'ADN et montre en 1950 que cette molécule contient toujours autant d'adénine (A) que de thymine (T) et autant de cytosine (C) que de guanine (G), même si d'une espèce à l'autre, le rapport $A+T/G+C$ peut varier. Ces résultats permettront à Watson et à Crick (Fig. 1) de comprendre que dans l'ADN, l'adénine est toujours appariée à la thymine et que la cytosine est toujours appariée à la guanine (Fig. 2). L'autre élément décisif fut le travail de Rosalind Franklin, cristallographe, qui en décembre 1951 obtint par diffraction aux rayons X des images d'un cristal d'ADN suggérant une structure en hélice. En janvier 1953, James Watson obtiendra de Maurice Wilkins, responsable du laboratoire où travaille Rosalind Franklin, de voir ces images. Un peu plus tard, Watson et Crick obtiendront un résumé pourtant confidentiel du travail de Rosalind Franklin, qui fera réaliser à Crick que la structure de l'ADN pourrait être une double hélice formée de deux molécules antiparallèles (Fig. 2). Ils publieront cette structure dans la revue *Nature* le 25 avril 1953. Comme le fait remarquer Axel Kahn, les circonstances dans lesquelles Watson et Crick ont obtenu ces informations puis publié leur modèle ne sont sans

doute pas conformes aux standards admis de la déontologie, de l'éthique ni même de la rigueur scientifique, mais il n'en reste pas moins qu'il s'agit là d'un des textes les plus importants de l'histoire de la science, et de l'événement fondateur de la biologie moléculaire. James Watson et Francis Crick obtiendront avec Maurice Wilkins le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1962.

Les 20 années qui suivirent la publication de 1953 consistèrent essentiellement à élucider le code génétique et les mécanismes par lesquels les gènes sont exprimés (transcription et traduction). Les années 1956-1958 furent particulièrement riches, apportant la preuve expérimentale du modèle de Watson et Crick, la découverte des enzymes assurant la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et acide ribonucléique (ARN)), et la découverte de l'ARN de transfert. C'est aussi en 1958 que Francis Crick formula ce qu'il appela le « dogme central de la biologie moléculaire » : l'information génétique est transmise des acides nucléiques (AN) aux protéines, et l'ADN est le support moléculaire d'une information qui s'exprime à travers les protéines.

L'universalité du code génétique avait fait entrevoir la possibilité de manipuler des gènes en les faisant s'exprimer dans des cellules étrangères, voire de les modifier. La découverte en 1970 de la transcriptase inverse, une enzyme utilisée par certains virus pour faire une copie ADN de leur ARN, et la découverte des enzymes de restriction, capables de fragmenter la molécule d'ADN à des endroits précis, rendit possible cette idée et marqua la naissance du génie génétique.

La structure en double hélice de la molécule d'ADN et la nature des liaisons qui relient ses deux brins (liaisons hydrogène non covalentes) permettent une répllication fidèle de l'information génétique d'une cellule à ses cellules filles, elle est aussi la base du concept d'hybridation moléculaire dont les deux propriétés, spécificité et réversibilité, sont les principes fondateurs des outils développés par les biologistes moléculaires (Figure 3). Apparurent ainsi des méthodes qui rendirent possible l'analyse du polymorphisme dans des génomes aussi complexes que le génome humain, les plus célèbres d'entre elles étant la méthode de Southern proposée en 1975 par E.M. Southern qui permet de classer, détecter et visualiser des fragments d'ADN de toute portion précise du génome ; et la polymérase chain

reaction (PCR), inventée en 1985 par Kary B. Mullis qui permet d'analyser un court fragment d'ADN en le multipliant in vitro. En 1977, les chimistes Allan Maxam et Walter Gilbert d'une part, et Frederic Sanger d'autre part inventent chacun une méthode de séquençage de l'ADN, c'est-à-dire de lecture base par base de la séquence d'ADN. La méthode proposée par Frederic Sanger, fondée sur l'utilisation de didésoxynucléotides, se généralisera ensuite grâce à ses possibilités d'évolution et d'automatisation.



Figure 1 : James D. Watson (à gauche) et Francis Crick (à droite) devant leur modèle tridimensionnel de la double hélice d'ADN [1].

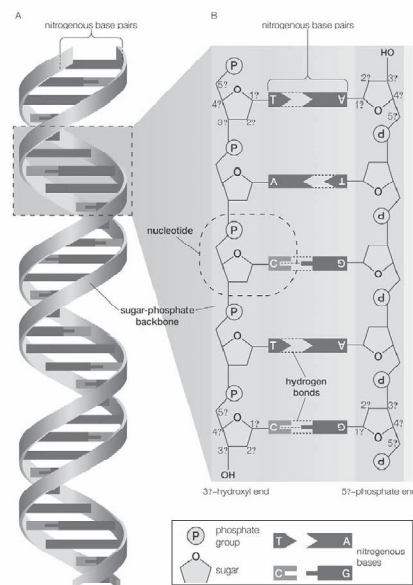


Figure 2 : Le génome humain est constitué d'environ trois milliards de paires de bases d'acide désoxyribonucléique (ADN). Les bases de l'ADN sont l'adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C) [2].

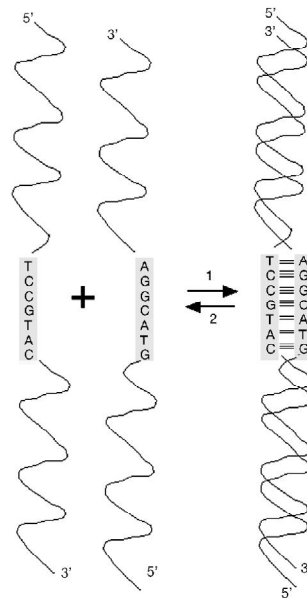


Figure 3 : Principe de l'hybridation moléculaire qui peut être définie comme la propriété que présente une molécule d'ADN monobrin de s'associer spontanément et de façon spécifique et réversible à une autre molécule monobrin si celle-ci lui est complémentaire et antiparallèle (orientation 5'-3' inverse) [1].

Enfin, au début des années 1990, apparaissent les biopuces ou puces à ADN dont le principe de fonctionnement reste l'hybridation moléculaire mais dont la technologie fait appel à la micro-électronique, la chimie combinatoire, l'informatique et le traitement du signal. Elle permet d'analyser en quelques heures des milliers de séquences d'ADN ou d'ARN et devrait s'imposer rapidement dans tous les domaines où la biologie moléculaire est déjà présente, notamment le séquençage de l'ADN et le diagnostic des maladies génétiques.

1.2. Définition [3]

La biologie moléculaire est un terme très large qui peut se définir comme la section de la biologie qui étudie les macromolécules extra et intracellulaires, tant d'un point de vue fondamental que des applications qui peuvent en découler en pathologie, voire en thérapeutique, notamment humaines. Cette définition très vaste et nécessairement assez vague inclut en fait l'étude des différents AN, ADN et ARN, et des protéines, mais aussi celle des vastes complexes moléculaires associant lipides complexes, polysaccharides, protéines et AN. Toutefois, le terme de biologie moléculaire est surtout utilisé pour l'étude de la structure, du

fonctionnement et des anomalies des AN, ensemble également appelé génétique moléculaire, même si la «génétique», au sens mendélien du terme, est souvent absente. L'acte de naissance de la biologie moléculaire, en ce sens un peu restreint, peut être fixé sans ambiguïté en 1953, année de la découverte de la structure de l'ADN.

1.3. Structure et fonctions des acides nucléiques

1.3.1. Acides nucléiques

1.3.1.1. Acide désoxyribonucléique [3]

L'acide désoxyribonucléique (ADN) a une structure en double hélice (aspect en «échelle tordue»), formée de deux brins antiparallèles et strictement complémentaires en ce qui concerne la séquence des «barreaux» ou bases (complémentarité adénine-thymine et guanine-cytosine) portées par les «montants» phosphodésoxyribosiques. L'ADN est le support de l'information génétique des procaryotes (cellules ne possédant pas de noyaux vrais, telles les bactéries) et des eucaryotes (cellules disposant de noyaux individualisés). Cette information est représentée par l'ordre de succession ou séquence des bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (cytosine et thymine) le long de la molécule, avec un code nucléotides-acides aminés bien connu et universel. L'ADN est surtout nucléaire chez les eucaryotes, organisé au sein des chromosomes, mais une faible partie est contenue dans les mitochondries. L'ADN nucléaire est intimement associé à diverses protéines qui interviennent dans la structure des chromosomes (histones essentiellement, formant des unités appelées nucléosomes) ou dans la régulation de l'activité génique. Sur le plan fonctionnel, l'ADN est réparti en régions codantes (2 % de l'ADN total) pour des protéines ou des acides ribonucléiques, régions contenues dans les gènes, et en régions non codantes, majoritaires quantitativement, qui comprennent notamment les régions régulatrices. Un gène peut être défini comme une unité fonctionnelle d'ADN (ensemble de séquences) contenant l'information nécessaire à la production d'un ARN particulier ou d'une protéine particulière. Dans le cas des gènes codant pour une protéine, les plus nombreux, ils sont constitués de séquences représentées dans l'ARN messager mature ou exons, en général (mais non obligatoirement) codantes, séparées par des séquences régulatrices sont situées en amont du premier exon, notamment la région dite promotrice. D'autres parts, seul un brin de la

molécule d'ADN est transcrit. Enfin, une grande partie de l'ADN n'a pas de fonction encore bien définie et est notamment constituée de séquences hautement répétées comme les microsatellites, très utilisés en recherche car «balisant» l'ADN au même titre que les sites de restriction. L'ADN peut être coupé in vitro par des enzymes particulières d'origine bactérienne, les enzymes de restriction, qui agissent sur des séquences d'ADN spécifiques appelées sites de restriction. La topographie et même la présence de ces sites de restriction sur l'ADN, situés dans ou en dehors des gènes, peut varier entre deux individus d'une même espèce, introduisant un certain polymorphisme dont on peut tirer partie en recherche et pour certaines applications diagnostiques. D'autres sites sont fixes, permettant d'établir une véritable cartographie de l'ADN. Les distances sur la molécule d'ADN sont actuellement mesurées en kilobases (10^3 bases = 1kb) ou en mégabases (10^6 bases = 1mb). Par exemple, l'ADN d'une cellule humaine mesure environ 3000 mb et on estime qu'il contient environ 100 000 gènes.

1.3.1.2. Acide ribonucléique [3]

Les acides ribonucléiques (ARN) ont une structure primaire très proche de celle de l'ADN, à ceci près que la thymine est remplacée par l'uracile et qu'ils ne sont le plus souvent constitués que d'un seul brin. Ils sont surtout impliqués dans la synthèse des protéines et sont de trois types : ARN ribosomaux (ARNr) intervenant dans la traduction des ARN messagers (ARNm), ARN de transfert (ARNt) permettant le transfert des acides aminés intracellulaires sur la chaîne polypeptidique en cours d'élongation, et ARNm destinés à être traduits en protéines dans les complexes ribosomaux, en suivant le code génétique. Tous ces ARN sont synthétisés en regard du brin codant d'un gène, dans le noyau, par une machinerie très complexe utilisant des ARN polymérases diverses (type I à III selon le type d'ARN). Ils sont toujours associés à des protéines très diverses, encore incomplètement connues, sous forme de particules ribonucléoprotéiques ; ils sont toujours monocaténaux sauf chez certains virus et sont souvent repliés sur eux-mêmes par hybridation intramoléculaire (structures secondaires). Dans le cas des ARNm, les plus nombreux, l'ensemble du brin «actif» d'ADN, exons et introns, est d'abord copié ou transcrit, donnant naissance à un transcript primaire d'ARN. Les régions de ce transcript primaire correspondant aux introns sont ensuite excisées (épissage)

aboutissant à un ARNm «mature», prêt à être traduit, après diverses autres modifications de structure. A la différence de l'ADN, molécule remarquablement stable dont la quantité par cellule est fixe en dehors de la mitose, le contenu et la composition en ARN, notamment messagers, sont très variables selon l'activité des gènes cellulaires, d'autant plus qu'il s'agit souvent de molécules instables à demi-vie courte. Leur étude quantitative permet donc celle de l'activité récente des gènes du tissu étudié, nécessairement très variable selon le type de tissu étudié. Enfin, les ARNm matures sont «traduits», c'est-à-dire qu'ils permettent la synthèse d'une protéine particulière dans les complexes ribosomiaux associés au réticulum endoplasmique «rugueux» ou granuleux.

1.3.2. Fonctionnement du génome eucaryote

Il est extrêmement complexe et encore fort loin d'être complètement compris, notamment en ce qui concerne sa régulation. Certains éléments fondamentaux sont toutefois bien connus.

1.3.1.1. Transcription génique [3]

Elle s'effectue à partir des brins codants d'ADN grâce à l'action d'un complexe moléculaire constitué autour de l'ARN polymérase III (complexe de transcription). Ce complexe se fixe sur une région plus ou moins étendue, située sur le brin codant, en amont du premier exon du gène à transcrire, région appelée promoteur. Celui-ci comporte des séquences universelles appelées «boîtes» (*TATA box* ; *CAAT box*) situées très près du début de l'exon, mais aussi des séquences plus spécifiques parfois plus éloignées, variables en fonction du gène en cause, appelées séquences régulatrices. Ces séquences ou éléments en «cis», car situés sur le même brin d'ADN que le brin codant, sont en fait des sites de fixation de protéines spécifiques, régulatrices, appelées éléments en «trans». On peut subdiviser ces éléments régulateurs en séquences *enhancer* et *silencer* selon l'impact sur l'activité transcriptionnelle de la liaison protéine-séquence régulatrice, liaison qui interfère avec la fixation et l'activité du complexe de transcription. Un certain nombre de protéines régulatrices sont assez ubiquitaires, participant à la régulation d'un grand nombre de gènes. On les appelle facteurs de transcription ; ils servent par exemple de deuxième ou troisième messager, nucléaire, relayant un message reçu par la cellule, message qui doit finalement aboutir à une

régulation de l'activité génique. De nombreux proto-oncogènes et certains gènes suppresseurs de tumeurs codent pour de tels facteurs de transcription, notamment les produits des gènes *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *p53*, *NF/KB*, etc.

1.3.1.2. Régulation post-transcriptionnelle [3]

Elle peut concerner les éléments affectant la stabilité des ARNm, la traduction elle-même, et les modifications protéiques post-traductionnelles qui modulent l'activité et la stabilité des protéines (phosphorylations, sulfurations, glycosylations, etc). Elle est parfois essentielle dans la régulation de la quantité et/ou de l'activité de la protéine finale.

2. Bactéries et infections bactériennes

2.1. Définition et structure [4]

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement et certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. Un grand nombre parasite les animaux, et n'infecte l'Homme que par hasard. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte humain. Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter. En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques.

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau (figure 4). Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autre organelle dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. À l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram

positif ou négatif. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi.

Aussi bien les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif ont une membrane cytoplasmique formée d'une bicouche lipidique associée à des protéines. Dans les deux cas, le composant principal de structure de la paroi est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel de chaînes polysaccharidiques (composées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique) et d'acides aminés.

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la, couche de peptidoglycane, à laquelle sont associés des polymères d'acide teichoïque (figure 5). Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe. La couche de peptidoglycane est plus fine que celle des Gram positif, et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines (figure 6). La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérien.

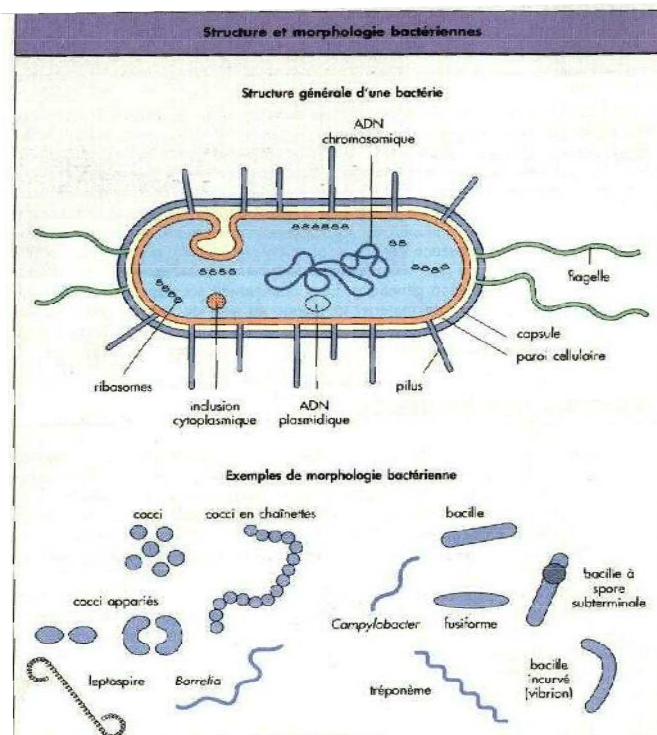


Figure 4 : Structure et morphologie bactérienne [4]

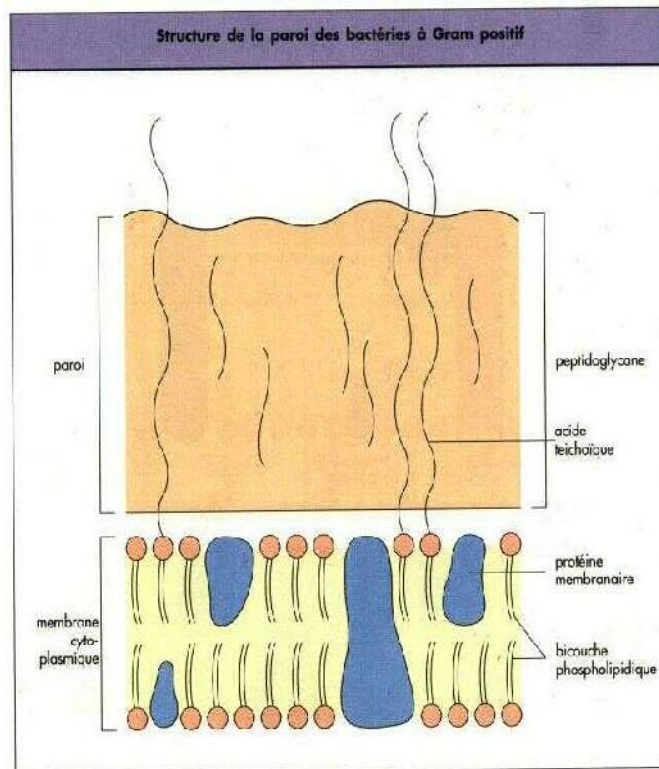


Figure 5 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif [4]

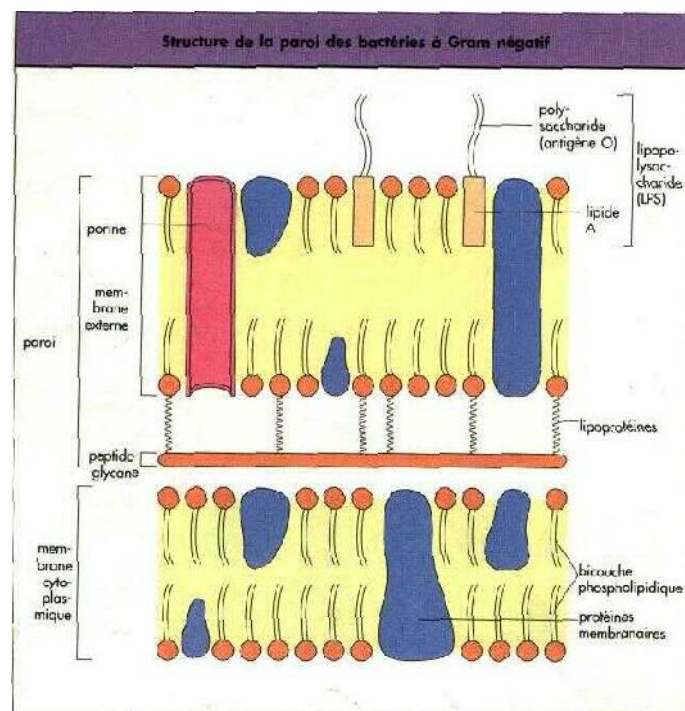


Figure 6 : Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif [4]

Chapitre II :
Techniques de biologie
moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire évoluent rapidement (figure 7). Leurs principes et indications varient selon les applications. Bien que ces nombreuses techniques soient différentes, elles présentent toutes des avantages et des inconvénients communs.

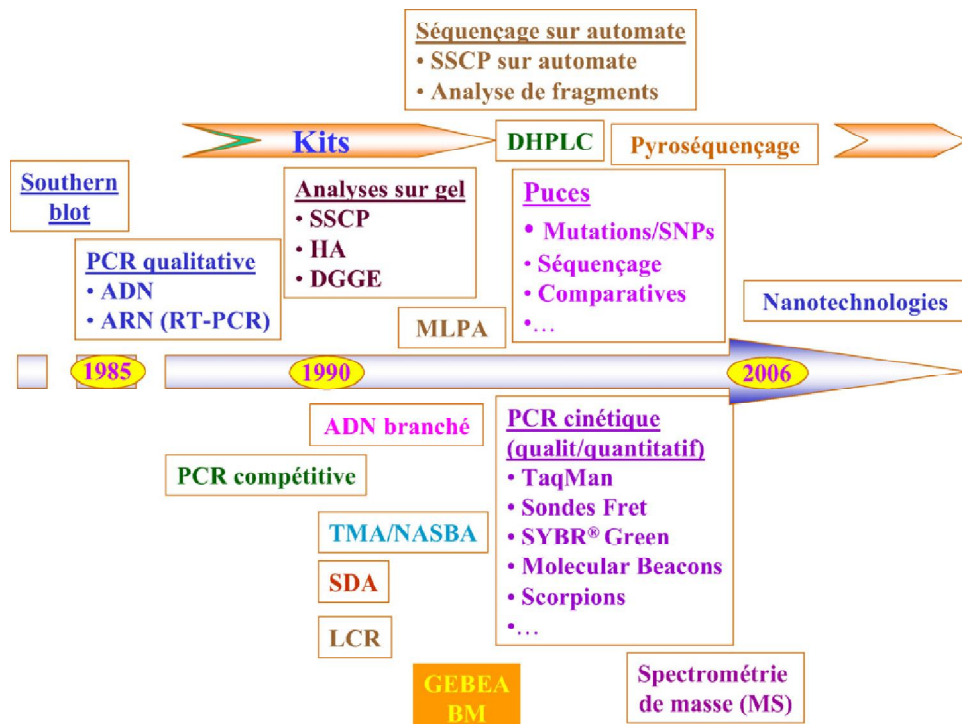


Figure 7 : Évolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR à nos jours [5].

SSCP: single strand conformation polymorphism; DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis;

HA: heteroduplex analysis; DHPLC: denaturing high performance liquid chromatography.

De manière générale, après l'extraction des AN, ces derniers doivent être amplifiés avant d'être analysés (figure 8). Nous allons donc brièvement rappeler les techniques d'extraction.



Figure 8 : Principales étapes d'analyse d'un échantillon en biologie moléculaire [5].

1. Préparation des échantillons [5, 6]

Divers échantillons biologiques peuvent être utilisés en biologie moléculaire. La libération des AN des bactéries à détecter est un préalable indispensable. Par ailleurs, il faut empêcher la dégradation des AN libres, éliminer les inhibiteurs des réactions d'amplification ou d'hybridation et utiliser un tampon approprié aux réactions de biologie moléculaire à effectuer.

Il est nécessaire d'adapter le volume d'échantillon et de le concentrer éventuellement selon la sensibilité de la technique utilisée et selon le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon s'il est connu.

- ❖ **Prélèvements sanguins** : L'anticoagulant généralement utilisé est l'éthylène-diamine-tétra-acétate (EDTA) ou le citrate trisodique. Il faut éviter l'héparine qui inhibe les polymérases.
- ❖ **Urines** : Les urines contiennent fréquemment des inhibiteurs dont la nature exacte n'est pas connue.
- ❖ **Liquide céphalo-rachidien (LCR)** : Des inhibiteurs des ADN polymérases qui sont souvent présents dans ce type de prélèvement.
- ❖ **Selles**
- ❖ **Prélèvements respiratoires**

- ❖ **Autres prélèvements :** De nombreux autres prélèvements (biopsies, pus, abcès, ulcères...) peuvent faire l'objet d'une détection d'ADN spécifique. Il est possible de réaliser des tests de biologie moléculaire sur des prélèvements fixés, formolés ou paraffinés.

1.1. Techniques de lyse bactérienne [6]

La procédure de lyse bactérienne doit être adaptée à l'espèce cible. Des techniques spécifiques doivent être utilisées pour les bactéries résistantes comme les mycobactéries ou pour certaines bactéries à coloration à Gram positif. Il faudra également tenir compte de la nature du matériel génétique cible, ARN ou ADN, et éviter les réactions non spécifiques en réalisant une extraction adaptée des AN, l'ébullition ou la lyse alcaline peut entraîner la formation d'ADN simple brin, plus sujet à se fixer de manière non spécifique dans des conditions de basse stringence.

1.1.1. Méthodes physiques

Le choc thermique est encore employé, les autres techniques comme les ultra-sons, les billes de verre ; le broyage en gel d'alumine, four à micro-ondes, presse de French restent anecdotiques.

1.1.2. Méthodes chimiques

La lyse alcaline permet en deuxième intention de lyser des bactéries résistantes par des protocoles utilisant la soude à basse molarité à des températures élevées.

1.1.3. Méthodes enzymatiques

Ces méthodes s'effectuent en utilisant plusieurs enzymes tels que la protéinase K, le lysozyme, l'achromopeptidase, la pronase, et la lysostaphine.

1.1.4. Méthodes utilisant les tensioactifs

Les tensio-actifs comme le sodium-dodécyl-sulfate (SDS) à 0,5%, le Tween 20 ou le Nonidet P40 sont utilisés dans les autres protocoles agissent en déstabilisant les édifices lipido-protéiques des enveloppes bactériennes et en sensibilisant les micro-organismes aux traitements lytiques.

1.2. Techniques d'extraction [7, 8, 9]

Il est nécessaire de fournir au système d'analyse des AN dont la qualité est compatible avec les tests de biologie moléculaire à effectuer. Il n'existe pas de procédé universel et simple de préparation du spécimen : la méthode optimale n'est en fait qu'un compromis prenant en compte la nature de l'échantillon ainsi que celle de l'AN cible et la méthode d'analyse qui sera utilisée en aval. De plus, elle doit pouvoir garantir la sensibilité du test, ce qui est primordial dans les applications où l'on cherche à détecter de faibles concentrations d'AN (bactériologie, virologie, maladie résiduelle). Un certain nombre de facteurs jouent sur cette sensibilité en particulier la présence possible au sein du spécimen de substances à l'origine d'interférences, d'inhibiteurs des enzymes utilisées (inhibiteurs de la taq polymérase), de nucléases pouvant dégrader les AN, l'ARN y étant particulièrement sensible. Un autre élément est essentiel dans ce domaine : il s'agit du volume (ou de la taille) de l'échantillon à analyser. En effet le nombre de copies obtenues après la phase de préparation du spécimen conditionne la sensibilité globale de la méthode. La procédure de lyse bactérienne doit être adaptée à l'espèce cible, des techniques spécifiques doivent être utilisées pour les bactéries résistantes comme les mycobactéries ou pour certaines bactéries à coloration Gram positif.

1.2.1. Méthodes manuelles

Les protocoles manuels classiques d'extraction des AN développés aux laboratoires étaient généralement trop lents, difficiles à effectuer et sensibles à la contamination. Il est bien connu que la probabilité de résultats faussement positifs en raison de la contamination augmente par rapport au nombre de manipulations effectuées dans le traitement des échantillons. En outre ces protocoles impliquent des réactifs dangereux. Il existe plusieurs méthodes mais la plus utilisée est l'extraction au phénol-chloroforme, avec ou sans digestion par protéinase K, et l'alcool pour la précipitation. Si l'éthanol pour la précipitation des AN n'a pas été correctement éliminé, les résidus d'éthanol ont été responsables de l'inhibition de l'amplification ultérieure. Les protocoles d'extraction d'ARN ont été encore plus laborieux que ceux de l'ADN. Pour ces raisons ces protocoles ont ainsi été largement remplacés par des kits disponibles en commerce.

Les méthodes classiques d'extraction des AN sont nombreuses et chaque laboratoire choisi celle qui répond le plus à ces exigences, on citera seulement les méthodes les plus utilisées (Extraction au guanidinium-thiocyanate-phénol-chloroforme, Extraction alcaline, Extraction à l'éthidium (EtBr)-Césium chloride (CsCl) et la Purification du Poly (A)⁺ ARN par chromatographie à l'Oligp (dt)-cellulose).

1.2.2. Méthodes automatisées

Aujourd'hui, on trouve l'extraction des AN en phase solide dans la majorité des kits commercialisés au marché. Comparées aux méthodes classiques, elles permettent une purification rapide et efficace. Elles fournissent une diminution significative du temps de manipulation, évitent les risques potentiels causés par des réactifs toxiques et montrent de manière significative une plus grande commodité et facilité d'utilisation. Idéalement, la plateforme automatisée permet d'éviter les tâches manuelles à partir du moment du chargement de l'échantillon du patient jusqu'à l'extrait complet de l'AN permettant à l'opérateur de faire d'autres tâches. Une préoccupation majeure dans la mise en œuvre des plateformes d'extraction automatisées des AN est le risque potentiel de contamination croisée à la suite des aérosols, des fuites pipette, de la robotique défectueuse, ou d'erreur robotique. Toutefois, les plateformes de dernière génération gardent la manipulation d'échantillon à un minimum et beaucoup d'entre eux offrent des conditions fermées, la preuve de la contamination croisée n'a pas été observée à ce jour. Dans la routine du diagnostic de laboratoire, les plateformes automatisées d'extraction des AN commercialement disponibles fournissent une fiabilité accrue et une répétitivité en comparaison avec les protocoles manuels.

Ces appareils font l'objet de nombreux achats car ils se substituent à une méthode manuelle pratiquée sous hotte, ils se caractérisent par quelques caractéristiques principales :

- Degré d'automatisation : certains modèles peuvent être qualifiés de «semi-automates» car ils ne permettent pas de travailler à partir du tube primaire et ils ne préparent pas le mélange de réactifs nécessaires à l'étape suivante (PCR grâce à un mix PCR).

- Volume d'échantillon autorisé : un volume faible (0,25 à 2 ml) est requis pour les extractions en infectiologie alors que des volumes plus élevés (5 à 10 ml) sont requis pour des applications sur les banques de cellules en génétique ou en hématologie.
- Importance de l'activité traitée : le nombre d'échantillon extrait en parallèle peut varier de 6 jusqu'à 96 (format microplaques) ; dans le groupe des appareils à microplaques, ceux dont les aiguilles de prélèvement sont indépendantes offrent une souplesse et une productivité plus importante.
- Polyvalence : certains appareils n'offrent pas le choix de la technologie d'extraction (billes de silice magnétiques ou gel de silice en colonne) ; dans le cas des colonnes, un module pompe à vide est requis afin d'assurer la dépression à travers la colonne.

Sur la figure 9 et le tableau 1 figurent quelques exemples d'automates d'extraction des AN à partir des bactéries :

Tableau 1 : Extraction automatique des AN à partir des bactéries [10].

Fabricant	Appareil	Modèle	Méthode de capture	Nombre maximum des échantillons	Délai du travail pour le maximum d'échantillons	Coût approximatif en Dollar américain
Applied biosystems	ABI Prism	6100	Silice/filtration	96	0,5 h	150.000
		6700	Silice/filtration	96	1,5 h	154.500
Autogen	AutoGenPrep	245	Centrifugation	24	3,5 h	---
		965	Centrifugation	384	4-6 h	---
		AutoGenFlex	Centrifugation	40	5 h	---
Biomérieux	NucliSens	Extractor	Silice/filtration	10	45 min	80.000
		Mini-Mag	Silice/magnétique	12	< 1 h	12.000
Qiagen	BioRobot	EZ-1	Silice/magnétique	6	0,33 h	29.000
		M48	Silice/magnétique	48	3,5 h	73.450
		M96	Silice/magnétique	96	3,5 h	93.150
		MDx	Silice/filtration	96	2,5 h-4 h	170.000
		9604	Silice/filtration	96	2 h	70.000
Roche	MagNA Pure	LC	Billes en verre magnétiques	32	1,5 h	84.500
		Compact	Billes en verre magnétiques	8	35 min	35.000



Figure 9 : Plateformes disponibles sur le marché les plus utilisées actuellement pour l'extraction des AN en routine diagnostique. Rangée supérieure (de gauche à droite) : m2000sp (Abbott), NucliSens easyMAG (bioMerieux), et QIAAsymphony (Qiagen). Rangée du bas (de gauche à droite): COBAS AmpliPrep (Roche), MagNA PureCompact (Roche), et kPCR SP (Siemens) [7].

2. Techniques d'amplification

2.1. Amplification par cycles thermiques

2.1.1. Réaction de polymérase en chaîne ou PCR [5]

La PCR (figure 10) déjà bien connue a été largement décrite dans de nombreux articles. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une enzyme thermorésistante, l'ADN polymérase (la plus connue étant la Taq ADN polymérase) qui recopie en de nombreux exemplaires l'ADN cible à l'aide de deux amorces complémentaires respectivement des brins sens et antisens. Le processus d'amplification est exponentiel. Chaque cycle aboutit à la formation de deux copies par brin.

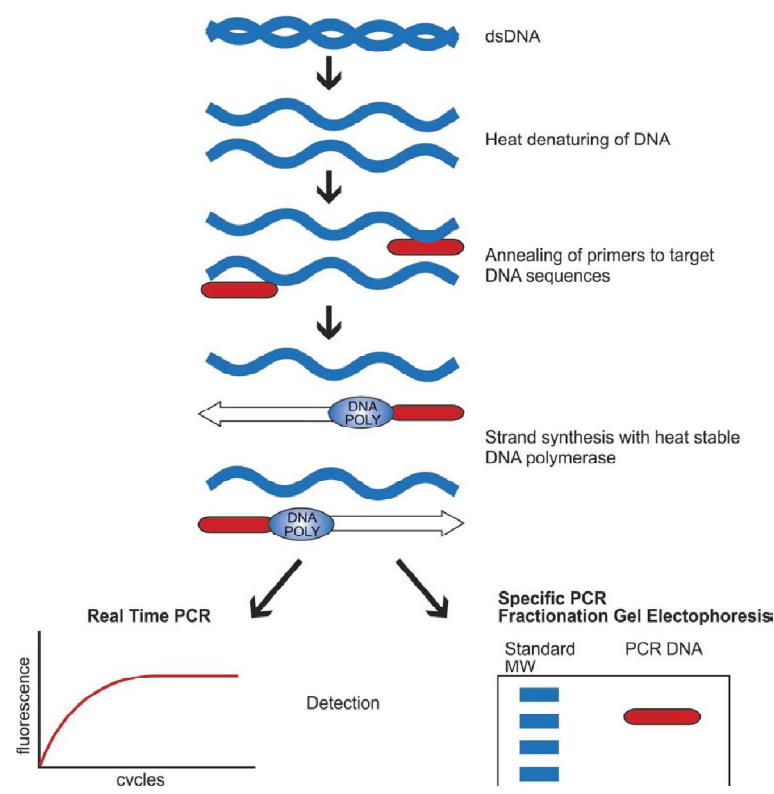


Figure 10 : Polymerase chain reaction. MW: Molecular weight marker [11].

La PCR a été déclinée de différentes manières. Nous donnerons quelques exemples sans être exhaustifs :

- La PCR classique : il s'agit de la PCR telle qu'elle a été initialement décrite. Après amplification, la cible est détectée sur un gel d'agarose après addition d'un agent intercalant (bromure d'éthidium) et exposition aux UV.
- La RT-PCR (reverse-transcription PCR) : après extraction d'un ARN, celui-ci est transformé en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse. Dans un second temps, l'ADNc est amplifié par PCR.
- La nested-PCR (n-PCR) : il s'agit d'une PCR avec deux couples d'amorces, un couple d'amorces (couple externe) effectuant une première PCR suivie d'une seconde PCR à l'aide d'un second couple d'amorces (couple interne) s'hybridant à l'intérieur du premier couple. Deux PCR successives sont donc réalisées. Cette PCR « nichée » (nested) permet

d'augmenter la sensibilité du système mais augmente également considérablement le risque de contamination.

- La PCR multiplex : plusieurs couples d'amorces sont ajoutés dans un même tube et la PCR s'effectue en même temps pour chaque couple d'amorces. La PCR multiplex permet donc la mise en évidence de plusieurs cibles dans un seul tube. Elle peut être réalisée de manière conventionnelle (PCR classique), par PCR-ELISA ou par PCR en temps réel.

- La PCR-ELISA : le produit amplifié est marqué au cours de la PCR grâce à une des deux amorces marquées (par un résidu de digoxigénine). Après fixation en microplaque à l'aide d'une sonde capture, la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique (antidigoxigénine). La société BAG (Biologische Analysensystem GmbH) commercialise en Allemagne une PCR-ELISA multiplex.

- La PCR compétitive : il s'agit d'une technique de quantification des AN par PCR développée avant la description de la PCR en temps réel. Dans cette technique, la cible est coamplifiée en présence d'un AN titré de même nature et de séquence proche qui fait office de standard interne. Cette technique est encore utilisée dans certains kits de biologie moléculaire (par exemple, les kits de la gamme Amplicor™, société Roche).

- La PCR en temps réel : En sus des amorces utilisées pour la PCR proprement dite, une ou deux sondes (selon la technique utilisée) sont ajoutées(s) au milieu réactionnel. La/les sonde(s) est/sont marquée(s) par un fluorophore permettant la détection directe du produit amplifié. Plusieurs systèmes ont été décrits. Nous en citerons quelques-uns : les sondes FRET (fluorescence resonance energy transfert, sondes d'hybridation), le SYBR® Green (agent intercalant fluorescent), les sondes TaqMan® ou équivalent (appelées aussi sondes double marquage), les balises moléculaires (molecular beacons), les sondes Scorpion™, les sondes LightUp™. La PCR en temps réel présente également l'intérêt de pouvoir être effectuée en PCR multiplex. Par ailleurs, la PCR en temps réel utilise un système fermé. Après addition du mélange réactionnel et de l'AN recherché, le tube reste fermé jusqu'à la détection. Le risque de contamination est donc diminué, avantage important par rapport aux autres techniques de PCR. Enfin, dans la majorité des cas, une enzyme l'uracile N-ADN glycosylase est ajoutée

dans le tube ce qui diminue encore le risque de contamination. Cette technique a pris un essor considérable dans les laboratoires de biologie moléculaire depuis quelques années.

2.1.2. Ligase Chain Reaction (figure 11) [5]

La ligase chain reaction (LCRe) est une technique d'amplification de sondes. Après hybridation de quatre sondes adjacentes (deux sondes spécifiques du brin sens et deux spécifiques du brin antisens), les sondes sont collées à l'aide d'une ligase à condition que la complémentarité soit absolue (absence de misappariement). Plusieurs cycles permettent ainsi l'amplification des sondes « collées ». Ses performances sont similaires à celles de la PCR. Cette technique n'existe plus en France (sa commercialisation par la société Abbott a été arrêtée en 2003). Elle est cependant encore décrite et utilisée dans d'autres pays.

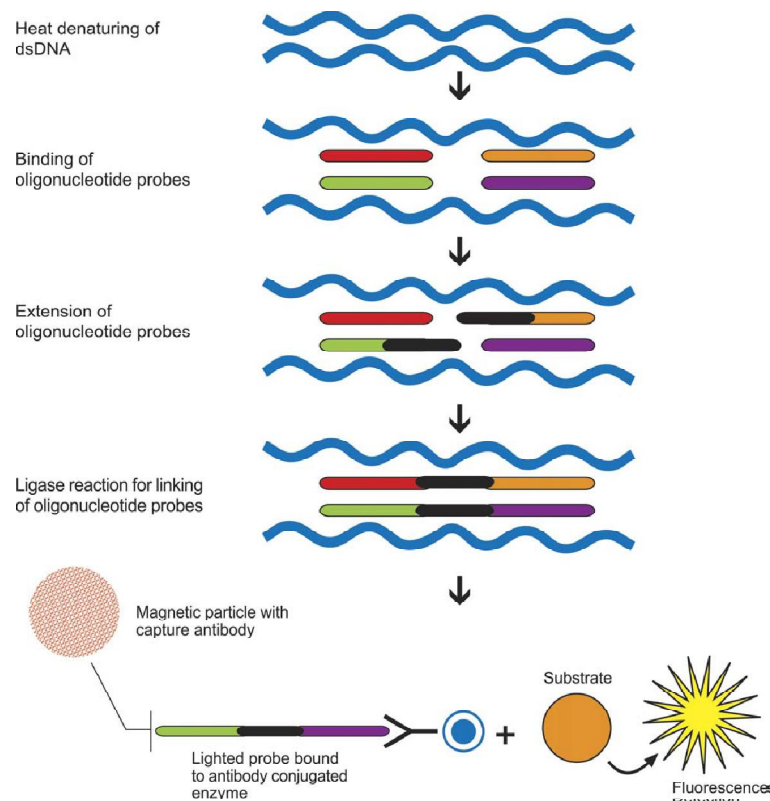


Figure 11 : Ligase chain reaction [11].

2.2. Techniques isothermes

2.2.1. Nucleic acid sequence-based amplification (figure 12) [5]

La Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) permet l'amplification à partir d'ADN ou d'ARN. Son principe est basé sur la transcription d'ARN produit en de nombreux exemplaires au cours de la réaction. Trois enzymes sont utilisées à cet effet, une transcriptase inverse, une RNase H et une T7 ARN polymérase. Cent à 1000 copies d'ARN sont obtenues à chaque cycle (la PCR ou la LCR en produisent deux à chaque cycle). La sensibilité de la NASBA est similaire à celle de la PCR. Cette technique a été couplée à la détection par des balises moléculaires (molecular beacons) et commercialisée par la société Bio-Mérieux sous le nom EasyQ™

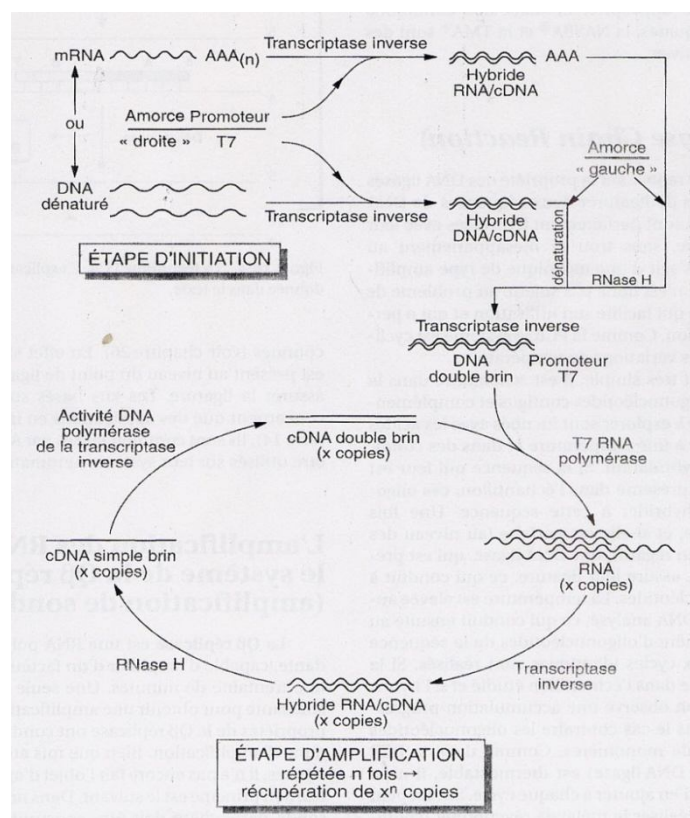


Figure 12 : La technique nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [12].

2.2.2. Transcription-mediated amplification (figure 13) [5]

La Transcription-mediated amplification (TMA) est proche de la NASBA et donne des performances similaires. Elle utilise le même principe, la différence résidant dans l'utilisation de deux enzymes au lieu de trois, la reverse transcriptase possédant aussi une activité RNase H. Cette technique est commercialisée en France par Bayer sous la dénomination Gen-Probe[®].

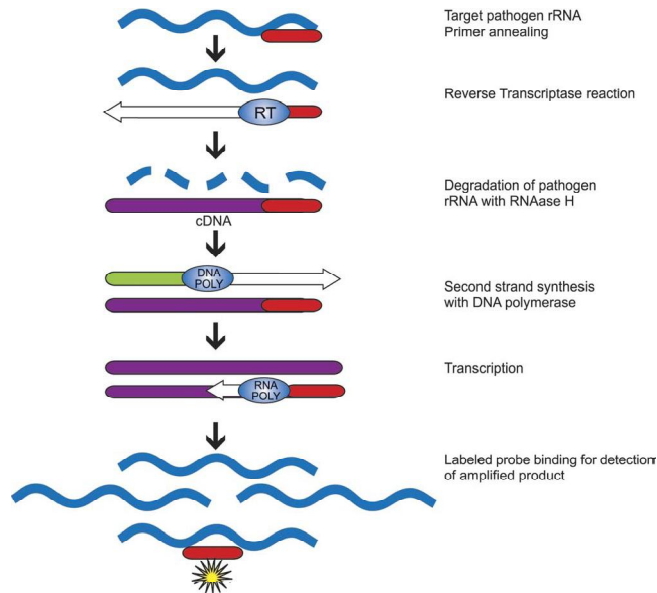


Figure 13 : Transcription-mediated Amplification [11].

2.2.3. Strand displacement amplification [5]

La strand displacement amplification (SDA) est réalisée à l'aide de deux enzymes thermorésistantes, une enzyme de restriction et une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléasique. Le principe est complexe. Il est basé sur la coupure partielle de l'ADN par l'enzyme de restriction (après incorporation d'un phosphorothiate nucléotide qui n'existe pas à l'état naturel) puis le déplacement du brin ainsi formé par l'ADN polymérase. De nombreux brins sont ainsi néoformés de manière cyclique. À la fin de la réaction, environ 10^9 copies sont obtenues après amplification de l'ADN cible. Les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec la PCR. La société Becton Dickinson a développé un automate et des tests basés sur cette technique sous le nom BD ProbeTec[™].

2.2.4. Rolling circle amplification [5]

Brièvement, la technique rolling circle amplification (RCA) est basée sur l'extension d'une amorce spécifique d'une cible en cercle « rolling circle » à l'aide d'une ADN polymérase. Cette extension est associée à un déplacement du fragment recopié produisant alors une longue séquence constituée de nombreuses unités répétées et aboutit à la constitution de millions de copies de la séquence en cercle (RCA linéaire). Dans la RCA à caractère exponentiel, une paire d'amorces est utilisée. La seconde amorce s'hybride à l'ADN cible, produit amplifié à partir de la première amorce et initie la formation d'ADN « en branches » au cours de la réplication de l'ADN cible. Jusqu'à 10^{12} copies peuvent être obtenues en une heure. De nombreuses variantes de ce principe d'amplification ont été décrites. Bien que le principe soit complexe, cette technique est beaucoup plus simple à réaliser que la PCR. Elle ne nécessite pratiquement pas d'optimisation, n'utilise pas d'instrumentation spécifique et présente peu de risques de contamination.

2.2.5. Cycling probe technology [5]

La cycling probe technology (CPT) est une technique d'amplification de signal. Dans son principe, elle amplifie l'ADN cible à partir d'une sonde chimérique ARN-ADN (une séquence ARN limitée de chaque côté par une séquence ADN). Sur chaque brin d'ADN adjacent à l'ARN se trouvent respectivement un fluorophore (appelé rapporteur) et un quencher (fluorophore répresseur). Ce dernier empêche l'émission d'un signal lumineux par le rapporteur. Cette sonde s'hybride à l'ADN cible et l'ARN hybridé à l'ADN est lysé par une RNase H (qui lyse l'ARN des duplex ARN/ADN). Après clivage de la sonde, le rapporteur émet un signal lumineux, le rapporteur étant séparé du quencher. Plus le nombre de sondes lysées est important, plus le signal fluorescent émis sera fort. Ce système initialement commercialisé par la société ID Biomedical aux États-Unis n'est plus commercialisé pour le moment.

2.2.6. ADN branché ou b-DNA (figure 14) [5]

Autre technique d'amplification de signal, cette technique est basée sur l'hybridation spécifique à partir de l'ADN ou de l'ARN cible d'un certain nombre de sondes dont certaines sont chimiquement branchées (elles n'existent pas à l'état naturel). Le signal est révélé à l'aide de sondes marquées à la phosphatase alcaline. Ce système est commercialisé par la société Bayer sous la marque Versant[®].

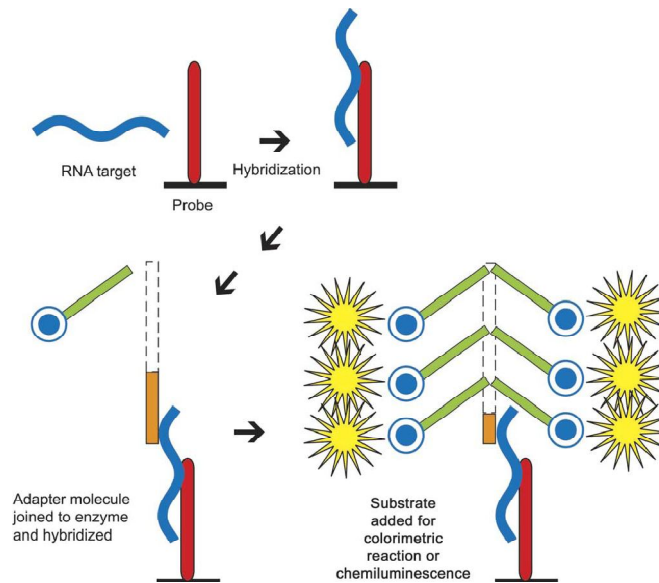


Figure 14 : Technique d'ADN branché [11].

2.2.7. Système de capture d'hybrides (figure 15) [5]

Dans cette technique d'amplification de signal, l'ADN cible est hybridé à une sonde ARN spécifique. L'hybride ADN-ARN ainsi constitué est capturé par des anticorps spécifiques sur un support solide. L'hybride est détecté par un deuxième anticorps marqué à la phosphatase alcaline. Cette technique est commercialisée par la société Digene.

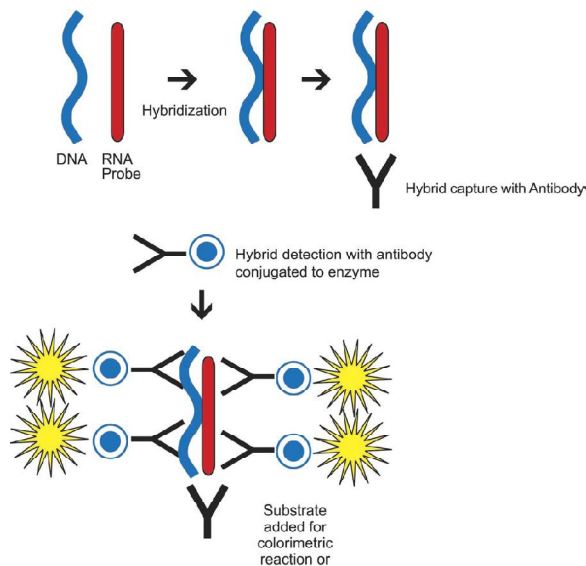


Figure 15 : Système de capture d'hybrides [11].

2.2.8. Autres techniques [5]

D'autres techniques d'amplification ont été décrites pour la recherche d'agents infectieux, nous les citerons simplement :

- Amplification isotherme à l'aide d'une hélicase, l'HDA (helicase-dependent amplification)
- La MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).

Le tableau 2 rappelle les principales techniques d'amplification et les sociétés commercialisant celles-ci.

Tableau 2 : Principales techniques d'amplification et gammes de kits utilisées en microbiologie clinique [5].

Techniques	Gamme de kits	Sociétés
PCR	Cobas Amplicor	Roche
RT-PCR	AmpliScreen	Roche
PCR compétitive		Roche
PCR en temps réel		
TaqMan	Cobas TaqMan	Roche
	Real Art Artus	Qiagen/RealArt Artus
Sondes FRET	LightCycler	Roche
Sondes LightUP	LightUp	LightUp Technologies
NASBA	NucliSens	BioMérieux
TMA	Aptima	Gen-Probe
ADN branché	Versant	Bayer
Hybrid Capture	Hybrid capture	Digene
SDA	BDProbeTec ET	Becton Dickinson

2.3. Techniques de détection

2.3.1. Billes magnétiques [5]

La société Luminex commercialise une méthode de détection de séquences amplifiées par PCR multiplex sur billes magnétiques (système xMAP™). Ce système semble actuellement peu développé dans le domaine de la biologie moléculaire appliquée aux agents infectieux. Elle a été décrite pour le moment dans les applications de génétique humaine.

2.3.2. Puces d'ADN [5, 13]

Un *microarray* est une surface solide et généralement plane sur laquelle sont fixées des molécules. Ces molécules sont le plus souvent des AN : ARN, ADN, ADNc, ARNc.

L'appellation microarray, signifiant microalignement ou microarrangement, provient de la manière ordonnée de la répartition de sondes sur un support. Le mot ordonné est important : on sait ce que l'on fixe sur le support et où on le fixe (figure 16). La nature du support est variable, mais il s'agit de verre dans la grande majorité des cas. Enfin, le fait que certains supports soient en silicium et que les systèmes d'hybridation soient miniaturisés ont amené les chercheurs à utiliser le terme « puces à ADN » (DNA chips) pour qualifier ces microarrays. Schématiquement, ces sondes peuvent être synthétisées et de petite taille environ 25 nucléotides (par exemple, celles commercialisées par la société Affymetrix (figure 17)) ou de grande taille, environ 60–80 nucléotides (commercialisées par exemple par la société Nanogen). Certaines puces peuvent aussi être dessinées à façon et commandées. Les ADN cibles marqués sont hybridés à la puce puis révélés par un automate dédié et analysés par un logiciel adapté (figure 18). Les microarrays ne sont pas encore passés dans le domaine de la routine de biologie moléculaire. Le coût élevé de fabrication des puces, des appareils et logiciels, l'interprétation délicate, l'absence de contrôle de qualité rendent le passage à la routine encore difficile. Cette instrumentation est cependant promise à un bel avenir dans les laboratoires de microbiologie spécialisée.

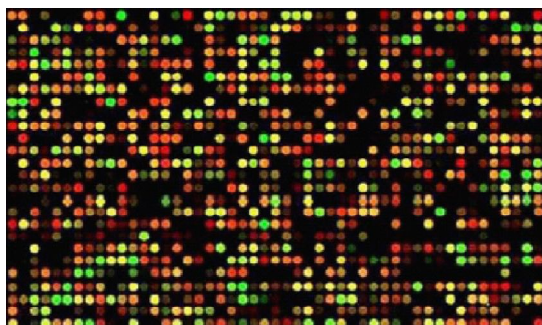


Figure 16 : Aspect d'un microarray. Sur cet exemple, 1248 (48×26) spots correspondent à autant de sondes différentes. Ce microarray a été réalisé avec la technologie du jet d'encre [13].

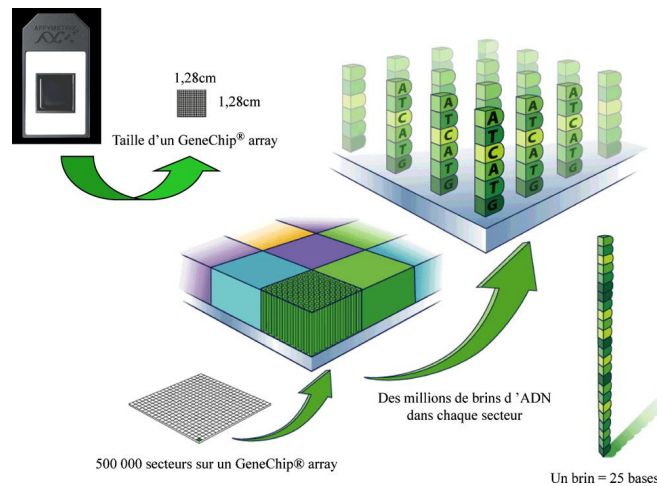


Figure 17 : Caractéristiques d'une puce GeneChip®. Commercialisée par Affymetrix, cette puce mesure 1,28 cm×1,28 cm. Elle comprend 500 000 secteurs. Chaque secteur contient des milliers de sondes identiques d'une longueur de 25 bases. C. Reproduit avec l'aimable autorisation d'Affymetrix [13].

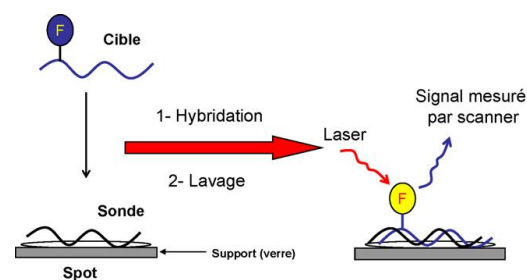


Figure 18 : Principe d'analyse sur microarray. La technique consiste en une hybridation inverse : la sonde est fixée sur le support et la cible capturée est marquée par un fluorophore. L'excitation du fluorophore par un laser a pour effet l'émission d'un signal qui est quantifié, si la cible est présente dans le milieu analysé [13].

2.3.3. Techniques de séquençage [5, 14]

Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, celle de Maxam-Gilbert (figure 19) et celle de Sanger (figure 20) ont été décrites en 1977, cette dernière a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes. Le séquençage est utilisé pour caractériser un agent infectieux notamment lorsque la culture est difficile, l'identification problématique ou dans certaines études épidémiologiques.

Dans le cas des bactéries, la cible est souvent constituée par un (ou plusieurs) gène(s) codant pour l'ARN 16S ou la région séparant les gènes codant pour les ARN 16S-23S « interspacer ». D'autres régions ont parfois été utilisées par exemple, le gène codant pour une protéine de choc thermique, hsp65. La société Applied Biosystem commercialise le kit MicroSeq™ permettant l'identification bactérienne. Le séquençage dans cette indication est très efficace. Cette technique présente cependant deux inconvénients. Les banques de données à partir desquelles sont effectuées les identifications par comparaison contiennent parfois des erreurs. Par ailleurs, le gène ARN 16S étant ubiquitaire dans le monde bactérien, une contamination par une autre bactérie peut amener à une erreur de diagnostic. Le séquençage précédemment évoqué utilise la plus courante des techniques de séquençage, la méthode de Sanger. Une autre technique plus récente est aussi utilisée dans ces indications, le pyroséquençage, commercialisée par la société Pyrosequencing.

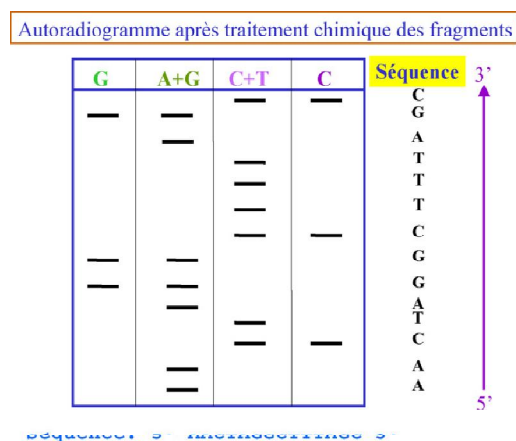


Figure 19 : Technique de Maxam-Gilbert. Dans quatre tubes différents, l'ADN cible est traité par chacun des produits de modification spécifique de base (hydralazine C+T; hydralazine C en milieu alcalin ; diméthyl sulfate G; acide formique A + G), suivi d'un traitement par la pipéridine. Les fragments coupés aléatoirement et au moins une fois après chaque base spécifique sur l'ADN cible sont de taille différente. La migration de ces derniers dans un gel d'acrylamide spécifique suivie d'une autoradiographie permet de déduire la séquence de l'ADN au cours de la lecture du gel dans le sens 5'→3' de bas en haut du gel [14].

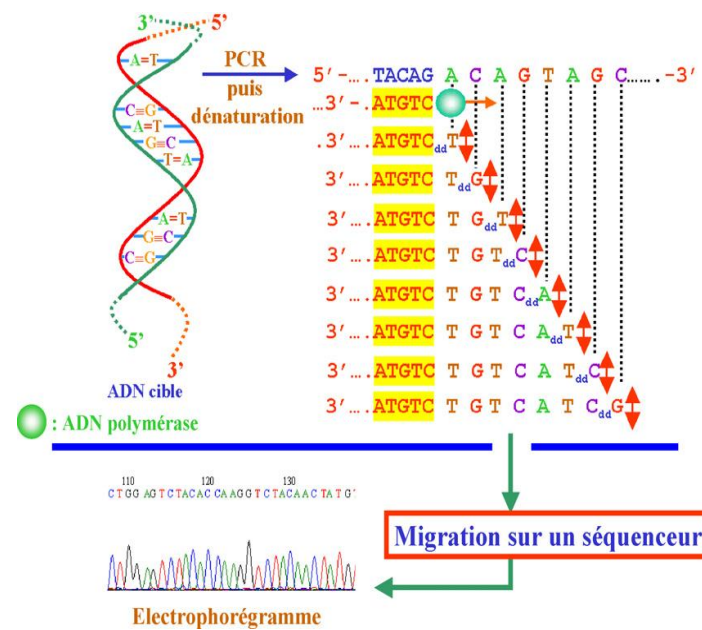


Figure 20 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger. Après dénaturation du produit amplifié par séquençage, l'un des deux brins (ici, le brin sens) s'hybride à une amorce spécifique. Le mélange réactionnel contient, outre les tampons et l'ADN polymérase, des déoxynucléotides triphosphates (dNTP, dA-, dC-, dG-, dT-TP) mais aussi des didéoxynucléotides triphosphates (ddNTP, ddA-, ddC-, ddG-, ddT-TP). L'incorporation aléatoire d'un ddNTP à la place d'un dNTP ne permet plus la polymérisation par l'ADN polymérase. L'extension s'arrête. À la fin de la réaction de séquence effectuée selon des cycles thermiques identiques à ceux de la PCR (on parle de PCR asymétrique, une seule amorce étant utilisée au lieu de deux), nous avons des fragments de taille différente. Ces fragments sont soumis à migration dans un champ électrique. Il s'agit le plus souvent d'une électrophorèse capillaire. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, un signal lumineux sera généré, spécifique de la base didéoxy incorporée. Les fragments étant de taille différente et la résolution allant jusqu'à une base de différence, il sera simple de recueillir ce signal et en déduire la séquence. Les signaux lumineux sont analysés par un logiciel spécifique, et le résultat de l'analyse peut être lu, par exemple, sous forme d'un électrophorégramme de lecture facile. Des logiciels d'interprétation des séquences sont également disponibles. Pour confirmer un résultat, toute réaction de séquence d'un fragment d'ADN est systématiquement faite sur le brin sens et le brin antisens [14].

2.3.4. Techniques d'hybridation directe

2.3.4.1. Hybridation in situ (FISH) [5, 15]

La technique FISH permet la détection des AN microbiens directement à partir de l'échantillon (ou échantillon de culture), sans amplification antérieure de l'AN. En bref, la technique consiste à la fixation d'un échantillon sur une lame de microscope, l'hybridation des échantillons préparés avec une sonde spécifique marquée par fluorescence, et visualiser la détection de l'hybridation avec un microscope à fluorescence (figure 21). Une technique dérivée de celle-ci a été développée, la PNA-FISH (peptide nucleic acid FISH). Les AN peptides (PNA) sont des analogues des AN. À la différence des AN, les PNA sont plus stables (hybrides ADN-PNA ou ARN-PNA), pénètrent la paroi bactérienne plus facilement et présentent une meilleure spécificité, leur température d'hybridation étant supérieure à l'ADN équivalent. La société AdvanDx commercialise des kits de PNA-FISH.

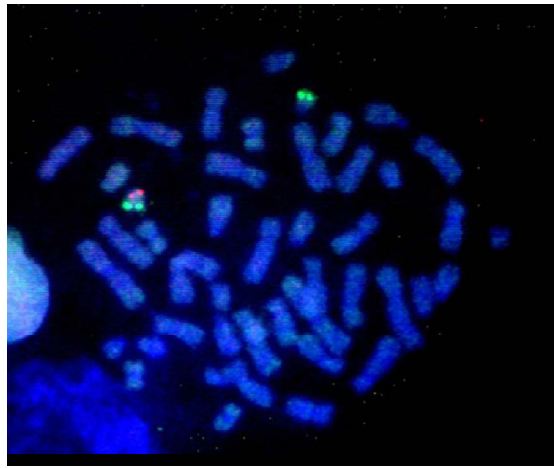


Figure 21 : Exemple d'application de l'hybridation moléculaire : l'hybridation in situ ou FISH (fluorescent in situ hybridization) [1].

2.3.4.2. Reverse dot-blot (système line probe assay (LIPA)) [5]

Des sondes spécifiques sont fixées sur une membrane de nitrocellulose. Les produits amplifiés cibles sont hybridés sur la membrane. La détection est effectuée par colorimétrie. La société InnoGenetics commercialise des kits de détection. Cette technique permet d'effectuer le génotypage d'agents pathogènes ou d'étudier des résistances aux antibiotiques (kits Inno-LIPA™).

2.3.4.3. Technique Hybridization Protection Assay (HPA) [5]

Cette technique utilise une sonde ADN sur laquelle est fixée une molécule d'ester d'acridinium. La sonde marquée est complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) d'un agent pathogène. Lorsque la sonde s'hybride à l'ARN, un signal luminescent est émis. En milieu alcalin, s'il n'y a pas hybridation, la sonde est détruite et donc, aucun signal n'est observé. Cette technique est utilisée par exemple dans les kits d'identification bactérienne AccuProbe™ (société Gen-Probe).

2.3.5. Spectrométrie de masse [5, 16]

Cette technique, décrite pour la première fois en 1988, a d'abord été rapportée pour l'analyse des protéines. L'analyse des AN s'est fait dans un second temps (début des années 1990). La spectrométrie de masse est basée sur l'ionisation puis la fragmentation d'une cible en la bombardant d'électrons. Le ratio masse/charge des fragments moléculaires obtenus par désintégration de la cible est analysé dans un second temps, ce qui permet d'établir une signature moléculaire. L'identification bactérienne a souvent été réalisée par la signature protéique des bactéries. Depuis une quinzaine d'années, l'analyse des AN par spectrométrie de masse notamment grâce à la technique MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) (figures 22 et 23) permet l'analyse des AN en quelques secondes. Cette technique permet d'analyser des milliers d'échantillons chaque jour. Elle est réservée à l'heure actuelle aux laboratoires de recherche.

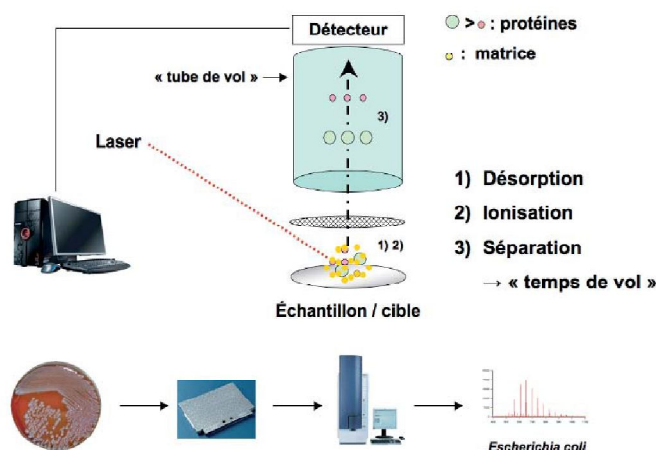


Figure 22 : Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF [16].



Figure 23 : Spectromètre de masse MALDI-TOF [16].

3. Bases de l'installation d'un laboratoire de biologie moléculaire

3.1.Sécurité contre les agents infectieux [5]

Les échantillons (sang, selles, urines, écouvillons, crachats...) contiennent de nombreux agents potentiellement infectieux (virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus des hépatites...). Les kits d'extraction des AN contiennent souvent du thiocyanate de guanidine, agent détruisant les parois cellulaires. Cependant, aucune étude n'a démontré que le traitement par ce produit rendait un échantillon non infectieux. Les solutions de lyse cassant les parois bactériennes (et contenant du thiocyanate de guanidine) rendent non viables un grand nombre d'agents infectieux. Certaines études ont montré que l'autoclavage pouvait être un moyen de désinfecter un échantillon sans détruire les AN et permettait l'amplification génique. Certains tampons de transport (par exemple, le tampon STAR de la société Roche Diagnostics) stabilisent les AN mais aussi inactivent un grand nombre d'agents pathogènes.

3.2. Contrôles de qualité [5]

Certains organismes internationaux (European Society for Clinical Virology (ESCV), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)) proposent des contrôles de qualité de biologie moléculaire à l'échelle internationale (voir le site www.qcmd.org). Par conséquent, dans la majorité des cas, chaque laboratoire doit assurer ses propres contrôles afin de valider les résultats. Les contrôles de qualité « maison » doivent

assurer la précision, la sensibilité et la spécificité des résultats, et en cas de quantification les seuils de mesure (minimum et maximum).

3.3. Contrôles positifs et négatifs [5]

Pour garantir un résultat en microbiologie, des contrôles positifs et négatifs doivent être ajoutés à la série réalisée. Le contrôle positif peut être obtenu à partir d'un échantillon positif (donc infectieux) ou à partir d'un échantillon (ou d'un pool) négatif dans lequel a été ajouté volontairement l'agent infectieux.

Le contrôle négatif est souvent constitué par le mélange réactionnel sans ADN (remplacé par de l'eau). Il s'agit plutôt dans ce cas d'un « blanc », un vrai contrôle négatif étant un échantillon sans agent infectieux. En cas de quantification, la présence de deux contrôles à deux valeurs différentes est recommandée.

3.4. Contrôles internes et externes [5]

Un inhibiteur d'amplification peut donner un résultat faussement négatif. La présence d'un contrôle interne permet de s'assurer qu'il n'existe pas d'inhibiteur d'amplification dans l'échantillon étudié. Ce contrôle interne est inclus dans de nombreux kits. En cas de technique « maison », le contrôle interne peut être présent dans le spécimen d'origine (contrôle homologue, par exemple, un gène de β -globine, GAPDH...) ou être un AN différent de la cible étudiée et ajouté dans l'échantillon (contrôle exogène, par exemple, AN amplifié avec les mêmes amorces que la cible mais de séquence nucléique interne différente).

3.5. Risque de contamination [5]

La contamination est la hantise permanente du biologiste en biologie moléculaire, des mesures déjà décrites telles que l'utilisation de contrôles positifs et négatifs, et l'addition d'uracile-N-glycosylase doivent être prises. Il est important de souligner que l'addition (systématique dans certains kits) d'uracile-N-glycosylase accroît la sécurité du système, mais ne rend jamais nul pour autant le risque de contamination. Les automates constituent aussi une solution intéressante pour limiter le risque de contamination. Le personnel doit être sensibilisé à ce risque et être formé. Les procédures doivent être clairement écrites et strictement respectées par les opérateurs. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'une des

raisons du succès de la PCR en temps réel est la diminution importante du risque de contamination. En effet, il s'agit d'un système fermé où le tube n'est plus ouvert après addition de l'échantillon et du milieu réactionnel.

3.6. Logistique [5]

Sans rentrer dans les détails, selon la nature des échantillons analysés et la pathologie en cause, il est indispensable de mettre en place des conditions de prélèvements, de transport, de délivrance et de conservation strictes. Bien évidemment, les renseignements cliniques et biologiques du patient sont aussi fondamentaux.

3.7. Obligations à respecter [5]

- ❖ Pour l'amplification génique et l'hybridation
 - Obligation de dépistage des inhibiteurs ;
 - Contrôle de la sensibilité du test ;
 - Dépistage de contamination ;
 - Analyse individuelle ;
- ❖ Pour la conservation des échantillons
 - Un an à -30 °C minimum (mycobactéries et virus de l'hépatite B) ;
 - Un an à -80 °C (Chlamydiae et virus).

4. Contrôle qualité en biologie moléculaire

4.1. Prévention des erreurs [5]

Il est indispensable d'éviter les résultats faussement positifs ou faussement négatifs inhérents notamment aux techniques d'amplification génique. L'organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire obéit donc à certains impératifs.

4.1.1. Faux positifs [5]

Les techniques d'amplification exposent au risque de contamination et donc de rendus de faux positifs. Pour limiter ce risque, outre l'organisation spécifique du laboratoire de biologie moléculaire déjà évoquée, nous évoquerons certaines mesures indispensables ou souhaitables.

- L'utilisation d'uracile N glycosylase (UNG). Cette enzyme est incluse dans certains kits mais aussi dans les mélanges réactionnels de PCR en temps réel. Elle devrait être systématiquement utilisée même si elle n'élimine pas complètement le risque de contamination. Son principe est basé sur l'incorporation de dUTP (qui n'existe pas à l'état naturel) à la place de dTTP au cours de la PCR (l'UNG peut aussi être utilisée dans d'autres réactions d'amplification comme la SDA, par exemple). L'UNG clive l'ADN ayant incorporé le dUTP. Ainsi, l'activation de l'UNG avant le démarrage d'une PCR éliminera les éventuels contaminants présents dans le tube. Cette enzyme est ensuite inactivée lors du démarrage de la PCR par dénaturation thermique ;

- L'utilisation de contrôles externes positifs et négatifs ;
- L'utilisation d'automates : certains kits permettent l'utilisation d'automate, diminuant ainsi les risques notamment ceux liés à l'opérateur. Des robots sont aussi parfois employés.

4.1.2. Faux négatifs [5]

Dans certains types de prélèvements (par exemple, les urines, le sang), il peut exister des inhibiteurs d'amplification (notamment pour la PCR) à l'origine d'un résultat faussement négatif. Pour remédier à ce problème, il est nécessaire d'obtenir une extraction d'AN de qualité. De nombreux kits disponibles répondent à cette exigence. Des automates sont également commercialisés dans ce but. Par ailleurs, l'addition d'un contrôle interne d'amplification (inclus dans certains kits) permet de s'assurer de l'absence d'inhibiteur.

5. Avantages et inconvénients de la biologie moléculaire [5]

La biologie moléculaire représente un ensemble d'outils dont le but est la mise en évidence des AN (ADN ou ARN). L'étude de la littérature internationale sur ce sujet montre sa puissance d'analyse. Tous les agents infectieux connus (bactéries, virus, champignons, parasites) sont détectables par cette méthode. La biologie moléculaire est aussi parfois le seul outil capable de détecter un nouvel agent pathogène. Comparée aux techniques de microbiologie classique, la biologie moléculaire présente de nombreux avantages. Le résultat est rapide, sensible et spécifique, permet la confirmation du diagnostic, un traitement adapté et une hospitalisation plus courte. Les infections nosocomiales peuvent être dépistées plus tôt,

la source d'infection identifiée, le traitement et la prophylaxie ajustés. Enfin, l'automatisation se développe progressivement, facilitant ainsi la mise en place de ces techniques et améliorant ses performances (notamment sa rapidité d'analyse) tout en diminuant ses inconvénients.

Le risque principal est constitué par la contamination aboutissant à de faux positifs, les techniques de biologie moléculaire faisant le plus souvent appel aux méthodes d'amplification génique. À l'opposé, dans certains cas, des inhibiteurs d'amplification peuvent être présents aboutissant alors à de faux négatifs. Les contrôles sont donc importants. Par ailleurs, dans certains cas, la mise en évidence d'un AN ne permet pas d'affirmer la viabilité de l'agent infectieux. Enfin, la biologie moléculaire nécessite un ensemble d'appareils et de kits coûteux, un personnel spécialisé et entraîné, et des locaux spécifiques.

6. Quelle technique utiliser ? [5]

Le choix des techniques en biologie moléculaire est vaste et ne cesse d'évoluer. En microbiologie néanmoins, de nombreux kits et automates sont disponibles facilitant ainsi la mise en place de ces techniques (annexe 1). Certains critères peuvent aider au choix technique (tableau 3). Le plus souvent, l'utilisation d'un kit commercial validé facilite la mise en place d'une technique. Le choix du kit dépend de l'habitude de l'utilisateur, de son expérience, des possibilités financières. Au niveau national ou international, aucun consensus n'existe. Beaucoup de kits sont par ailleurs équivalents, même si les techniques utilisées diffèrent. Il n'existe pas de règle spécifique. Le choix d'une technique est donc affaire d'expérience personnelle ou d'équipe.

Tableau 3 : Exemples de critères de décision pour choisir une technique [5].

Critères	Techniques considérées
Nombre d'échantillons	Automate et kit(s) adapté(s) PCR en temps réel PCR multiplex
Seuil de sensibilité bas	Kits
Détection de plusieurs cibles	PCR multiplex PCR en temps réel multiplex
Détection bactérienne large	Séquençage ARN 16S ou ARNr
Résistance bactérienne	PCR en temps réel Kit
Simplicité d'utilisation	Kit

7. Quel résultat attendre ?

En microbiologie, deux types de résultats sont attendus.

7.1. Résultat qualitatif [5]

En pratique, il s'agit de la détection de l'AN issu de l'agent infectieux recherché. Le résultat positif signifie-t-il que l'agent infectieux est vraiment présent, viable et responsable de l'infection ? Si l'étude concerne par exemple, la recherche d'un virus tel que le virus de l'hépatite C, l'ARN mis en évidence affirme la présence du virus dans l'échantillon. En revanche, si l'étude concerne une bactérie, par exemple *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie peut être morte (et donc non infectieuse) et l'ADN toujours présent. Dans ce cas, seule la recherche de l'ARN bactérien pourrait affirmer que la bactérie est vivante et donc infectieuse. Dans d'autres cas, l'interprétation peut aussi être délicate. Par exemple, la mise en évidence de *Bartonella sp* dans une endocardite avec culture négative peut être un vrai positif et la bactérie en est responsable. Mais, comment interpréter un tel résultat si la bactérie mise en évidence est par exemple *Burkholderi picketti* ? En effet, les bactéries sont retrouvées sur tout type de matériel de laboratoire (tubes, réactifs pour la PCR, eau...) y compris dans le sang total de sujets sains. L'interprétation nécessite donc de connaître le contexte clinique ainsi que les autres résultats biologiques, informations devant toujours accompagner la recherche d'un agent infectieux.

7.2. Résultat quantitatif [5]

En pratique hospitalière habituelle, il s'agit essentiellement de la charge virale (le plus souvent virus de l'hépatite C, virus de l'hépatite B ou VIH). La présence d'un étalon international permet dans certains cas de rendre le résultat en UI/ml (virus de l'hépatite C et VIH).

*Chapitre III :
Applications des
techniques de biologie
moléculaire*

1. Diagnostic et suivi des infections à mycobactéries

1.1. Détection de *Mycobacterium tuberculosis* [5, 17, 18, 19, 21, 22]

Dans le monde, l'infection à *M. tuberculosis* constitue un problème majeur de santé publique, un tiers de la population mondiale étant considéré comme contaminé et huit millions de nouveaux cas étant détectés chaque année. Par ailleurs, on assiste dans les pays développés à une résurgence de la maladie et à l'apparition de souches multirésistantes (notamment chez les sujets VIH positifs). Parallèlement Au cours des vingt dernières années, le diagnostic microbiologique des mycobactéries a connu un profond bouleversement grâce aux nouvelles techniques.

Si la culture reste le gold-standard, les techniques de biologie moléculaire concernant la détection directe à partir du produit pathologique, l'identification de *M. tuberculosis* et la détection de la résistance ont permis de réduire de façon importante les différentes étapes du diagnostic microbiologique. Parmi toutes ces techniques mises à la disposition du biologiste, il semble important de dégager celles qui sont utilisables dans un laboratoire de routine en tenant compte de la fiabilité des résultats mais aussi de leur coût.

Un diagnostic précoce est important pour un traitement efficace. Certains kits ont donc été développés dans le but d'obtenir un diagnostic rapide de la tuberculose pulmonaire utilisant plusieurs techniques tel que l'amplification par PCR : trousse Amplicor Roche Diagnostic (Roche Diagnostic), la TMA : trousse Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test ou AMTD (BioMérieux), la LCRé : test LCX Probe (Abbott), et la SDA : trousse BD ProbeTec™ ET DTB Assay (Becton Dickinson), les deux premières sont actuellement approuvées par la FDA (food and drug administration).

Les travaux pour simplifier le traitement des échantillons et l'amplification moléculaire sont en cours. La foundation for innovative new diagnostics (FIND) collabore depuis avec Eiken Chemical Corporation (Tokyo, Japon) pour développer un test moléculaire de détection de la tuberculose simple, manuel basé sur la technique loop mediated isothermal amplification (LAMP). Les avantages de cette technologie sont qu'elle ne nécessite pas de thermocycleur, elle est sous forme d'un système fermé, sans besoin toujours d'ouvrir le tube de réaction après amplification, et donne une lecture visuelle interprétable par l'oeil nu (figure 24). Eiken et

FIND ont récemment développé un prototype de ce test pour la tuberculose avec une méthode de traitement des échantillons simplifiée qui pourraient être effectuée à la paillasse par des techniciens en microscopie dans les zones dont les ressources sont limitées. Les données préliminaires suggèrent que le système simplifié peut fonctionner à une performance identique à celle des systèmes commerciaux, détectant la quasi-totalité des spécimens frottis positif et la moitié des cas à frottis négatifs.

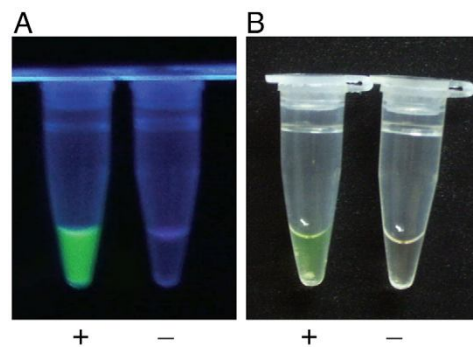


Figure 24: La détection visuelle de la réaction LAMP en utilisant l'indicateur de métal fluorescent. (A) sous lumière UV. (B) sous la lumière du jour. Le signe plus indique une réaction positive (présence d'ADN cible); signe moins indique une réaction négative (absence d'ADN cible) [20].

Dernièrement l'organisation mondiale de la santé (OMS) a approuvée le 8 Décembre 2010 un test d'amplification d'AN développé par Boehme et al, s'effectuant en moins de 100 minutes (Xpert MTB/RIF de Cepheid) (figure 25) totalement automatisé, basé sur la PCR en temps réel, après 18 mois d'évaluation de son efficacité sur le terrain pour le diagnostic précoce de la tuberculose, ainsi que de la tuberculose multirésistante et celle compliquée par le VIH, plus difficiles à diagnostiquer, la mise en œuvre de ce test pourrait entraîner un triplement du nombre des cas de tuberculose résistante diagnostiqués et un doublement du nombre des cas de tuberculose associée au VIH, diagnostiqués dans les zones à forte prévalence des deux infections. Parmi 1730 patients avec suspicion de tuberculose, ce test a identifié 98,2% des patients avec frottis positif et 72,5% des patients ayant un frottis négatif et 99,2% des patients sans tuberculose.



Figure 25 : Plateforme Xpert MTB/RIF de Cepheid [23]

Les études sont nombreuses, cependant il est difficile de comparer les différents pourcentages de sensibilité et spécificité des différentes techniques étant donné les disparités qui existent selon les échantillons testés. L'ensemble des publications donne des pourcentages de sensibilité compris entre 96 et 100 % pour les échantillons pulmonaires dont l'examen direct est positif. En revanche ces pourcentages semblent varier de façon importante selon les techniques pour les échantillons dont l'examen direct est négatif, Garions et al utilisant la LCRé trouvent seulement 27 % de sensibilité, Johansen et al 43 % avec la SDA, Bogard et al 71,1% avec la PCR, Roche et al. 75% avec l'AMTD, ces différences existent pour les prélèvements d'origine pulmonaire et sont majorées pour les extrapulmonaires.

D'après les nombreuses études réalisées sur ce sujet, il est clair que les renseignements cliniques jouent un rôle important dans la prise de décision d'une prescription d'examen par biologie moléculaire. Quelques études ont été réalisées sur les tuberculoses extrapulmonaires (la méningite tuberculeuse). Ainsi, dans le cas des méningites tuberculeuses, l'analyse du LCR retrouve le germe avec une sensibilité de 56 % et une spécificité de 98 %. Par conséquent, de manière générale, bien que ces tests soient rapides et spécifiques, leur faiblesse réside dans la sensibilité qui tout en étant variable selon la nature des échantillons,

est le plus souvent insuffisante. L'un des problèmes liés à cette sensibilité insuffisante est la présence d'inhibiteurs de polymérase allant de 4 % dans les échantillons pulmonaires à 18 % dans les échantillons extrapulmonaires. Les kits d'extractions d'ADN de mycobactéries ont été améliorés pour limiter le problème des inhibiteurs (notamment sur les échantillons extrapulmonaires). Certains préconisent une courte culture de deux-trois jours en milieu de Lowenstein-Jensen avant d'effectuer l'amplification. Par ailleurs, des faux positifs (non liés à une contamination) ont été rapportés. Il s'agissait d'ADN de mycobactéries non viables mis en évidence après traitement antituberculeux. Ainsi, l'intérêt de la recherche de mycobactéries par amplification génique est limité, voire pour certains discutables et ne remplace en aucun cas les tests conventionnels (examen direct et culture) auxquels ils peuvent éventuellement être associés (pour confirmer le diagnostic de *M. tuberculosis* sur un examen direct de crachats positif ou pour d'autres, en cas de localisation viscérale et en cas d'examen direct négatif). Un test négatif n'élimine cependant jamais le diagnostic (notamment en cas de suspicion de tuberculose extrapulmonaire avec crachats négatifs). Il n'existe donc aucun consensus sur l'indication des tests de biologie moléculaire dans les infections à mycobactéries. Outre le diagnostic de tuberculose, la recherche d'ADN mycobactérien a été rapportée dans la surveillance du traitement spécifique et dans la recherche des rechutes. Au bout de six mois, environ 30 % des patients présentent toujours un test moléculaire positif. Parmi eux, certains avaient une tuberculose grave ou une résistance au traitement. La positivité pouvait s'expliquer dans certains cas par la présence de faux positifs (mycobactéries non viables). Il ne faut donc jamais utiliser les tests d'amplification génique chez des patients traités, le risque de faux positif pouvant être important. Certains ont évalué la charge bactérienne mais n'ont pas mis en évidence d'intérêt à cette étude tant sur le plan pronostic que sur celui de l'évaluation thérapeutique.

1.2. Identification des mycobactéries [17, 25]

La technique d'hybridation moléculaire a supplanté les méthodes d'identification biochimiques classiques c'est-à-dire catalase thermosensible, croissance sur l'acide para-amino-salicylique et niacine test. Actuellement plusieurs techniques sont commercialisées mais on prend comme exemple :

- Accuprobe (Gen-Probe) : il s'agit de sondes froides marquées par un ester d'acridinium qui permet le diagnostic différentiel entre le complexe *tuberculosis* et les mycobactéries non tuberculeuses les plus fréquemment rencontrées au laboratoire (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*). Ces sondes sont très spécifiques, elles peuvent être utilisées à partir des milieux solides et liquides. L'identification basée sur la formation de complexes ADN-ARN ribosomiaux est réalisée en deux heures.

- INNOLIPA Mycobacteria (Innogenetics) (figure 26) : les sondes spécifiques sont immobilisées sur une bandelette, la réaction d'hybridation se fait après amplification d'une région de l'ADN codant pour l'espace intergénique 16-23S. Cette technique permet d'identifier les huit espèces les plus fréquemment isolées au laboratoire qui sont en plus de celles identifiées par Gen-Probe, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* et *M. chelonae*. Il existe aussi le test d'INNOLIPA Mycobacteria V2 qui permet l'identification de 16 espèces. La sensibilité et spécificité de cette technique est identique à celle de Gen-Probe, elle présente l'avantage de confirmer l'appartenance de la souche à la famille des mycobactéries dans le cas où l'identification d'espèce n'est pas possible, d'identifier un plus grand nombre d'espèces. En revanche, elle nécessite une amplification, donc un temps de manipulation beaucoup plus long et son coût est élevé.

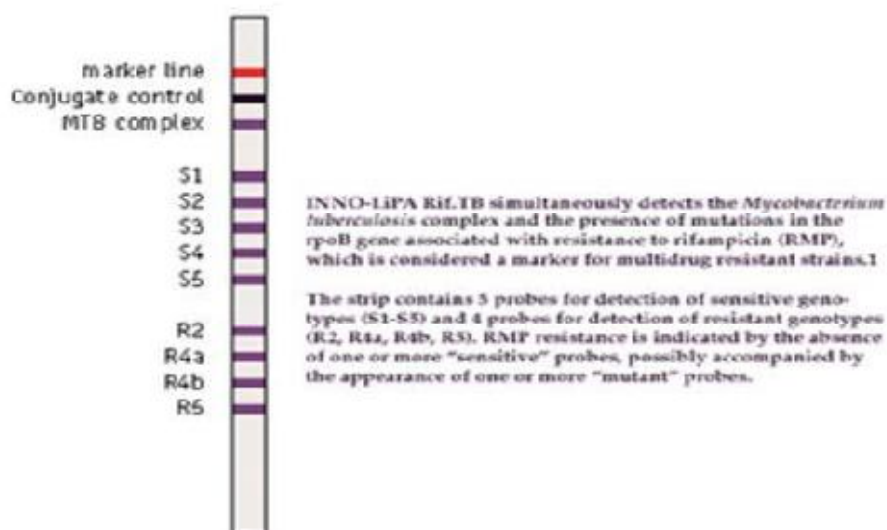


Figure 26 : INNO-LIPA Rif.TB. [24]

- GenoType Mycobacteria (Hain Diagnostika) : il s'agit du même principe qu'INNOLIPA, elle permet le diagnostic du complexe *tuberculosis* et de 15 espèces de mycobactéries non tuberculeuses. Les évaluations de cette technique montrent des résultats proches des techniques déjà décrites.

Il existe d'autres techniques de biologie moléculaire comme la PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA) mise au point par Talenti ou le séquençage de l'ARN 16S qui permettent l'identification du complexe *tuberculosis*, mais ces techniques sont difficilement applicables dans un laboratoire en routine. Un nouveau procédé permettant, en moins d'une heure, l'amplification et la détection en temps réel de l'ARNr 16S des mycobactéries tuberculeuses par une technique de transcription inverse (TRC: Transcription Reverse Concerted-TRCRapid *M. tuberculosis*-Tosoh Bioscience, Tokyo, Japon) directement dans les échantillons respiratoires.

2. Diagnostic des infections bactériennes du système nerveux central [26]

La méningite bactérienne aiguë acquise à domicile est une infection grave causée par un nombre restreint de pathogènes notamment *S. pneumoniae* (40–50 %) et *Neisseria meningitidis* (30–40 %). Depuis l'introduction de la vaccination contre *Haemophilus influenzae*, l'incidence de ce pathogène a diminué de manière spectaculaire (< 5 % des cas). *Listeria monocytogenes* reste une cause typique et rare de méningite chez le patient immunodéprimé et/ou âgé (< 5 % des cas, en dehors d'épidémie alimentaire). Les démarches diagnostiques habituelles incluent les examens microscopiques (Gram, bleu de méthylène) et la culture du LCR ainsi que le prélèvement d'hémocultures. Le rendement de ces méthodes conventionnelles est limité, en particulier lors d'administration d'antibiotique avant la réalisation de la ponction lombaire. Des techniques moléculaires ont été développées pour rechercher spécifiquement les différents agents pathogènes séparément puis conjointement dans un seul tube à essai. La sensibilité varie selon le pathogène de 88 à 95 % avec une bonne spécificité. Les résultats sont disponibles en quatre à six heures.

2.1. Techniques monoplexes

2.1.1. *Neisseria meningitidis* [27]

La détection moléculaire a pris beaucoup d'importance pour les méningites à méningocoque, bactérie fragile, retrouvée en culture dans moins de 80% des cas. La recherche d'antigènes solubles est également souvent mise en défaut, surtout pour les méningocoques du groupe B. Le centre nationale de recherche (CNR) des méningocoques à l'Institut Pasteur de Paris propose actuellement la détection du méningocoque dans le LCR par amplification du gène de régulation *crgA*, l'amplification de ce gène a montré sa spécificité dans d'autres études tel que celle de Bronska et al, 2005 (voire tableau 3). D'autres cibles peuvent être utilisées, comme les gènes *ctrA*, *dhps*, *porA* et *porB*. Avec le gène *crgA*, la sensibilité et la spécificité, pour le LCR sont, respectivement, de 89,7 et 92,7%. La sensibilité est plus faible pour le sang, et décroît rapidement avec l'antibiothérapie : en pratique, le prélèvement sanguin doit être effectué moins de 18 heures après le début du traitement. Il est également possible de détecter le sérotype par l'amplification des gènes *siaD* (sérotypes B, C, Y, W135) et *mynB/sacC* (sérotype A).

2.1.2. *Streptococcus pneumoniae* [27]

Pour le pneumocoque, divers protocoles de PCR ont été décrits, le plus souvent basés sur la détection du gène *ply* ou de celui de l'autolysine *lytA*, avec divers protocoles de révélation. Ces protocoles ont certains avantages sur les PCR antérieures : moins de contaminations croisées (tubes fermés), suppression de révélateurs radioactifs et gain de temps par simplification de l'étape d'extraction d'ADN. La PCR est moins utilisée en pratique courante que pour le méningocoque car la culture est plus performante pour le pneumocoque et indispensable à la détection des pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline.

2.1.3. *Listeria monocytogenes* [27]

Pour *L. monocytogenes*, le CNR (Institut Pasteur, Paris) propose une PCR en temps réel permettant de détecter et quantifier l'ADN dans le LCR. Par ailleurs, une PCR multiplex permettrait de différencier les souches appartenant aux sérovars les plus fréquemment retrouvés en France, par ordre décroissant, 4b, 1/2a, 1/2b et 1/2c.

2.2. Techniques multiplexes [27]

Depuis quelques années, des protocoles de PCR multiplex permettent de détecter simultanément méningocoque, pneumocoque et *H. influenzae* dans le LCR, une bonne spécificité, et des sensibilités variables selon les agents pathogènes et selon les auteurs, Il est nécessaire de distinguer les études réalisées à partir d'échantillons ayant une preuve bactériologique pour lesquels la sensibilité de la technique est de 88 à 98% environ comme dans l'étude de Pedro et al, 2007 (tableau 4). En revanche, lorsque cette technique est appliquée aux échantillons tout venants, comme exemple les travaux de Chanteau et al, 2006 et de Tazanakaki et al, 2005 (tableau 4), la sensibilité est beaucoup plus faible comprise entre 20 et 50 %. Dans les deux cas, la spécificité est grande. *H. influenzae* étant devenu exceptionnel dans les pays industrialisés, l'épidémiologie est dominée par le méningocoque et le pneumocoque, justifiant probablement une PCR ciblée sur ces deux espèces. C'est ce que préconise une équipe belge, avec la mise en place d'une PCR en temps réel, avec une sensibilité de 87% pour le méningocoque et de 100% pour le pneumocoque, scores supérieurs à ceux de l'examen direct et de la culture.

La détection potentielle de toutes les espèces bactériennes peut être effectuée par l'amplification et le séquençage d'un segment du gène de l'ARN ribosomal 16S (tableau 4), étude de Saravolatz et al, 2003). La PCR dite universelle est moins utilisée que les PCR spécifiques en raison du risque plus élevé de contamination, et de l'efficacité variable du procédé d'extraction de l'ADN sur les bactéries à Gram positif. Les seuils de détection peuvent aller jusqu'à 25 UFC/ml pour le méningocoque et 10 UFC/ml pour le pneumocoque, seuils acceptables car la concentration bactérienne dans le LCR est généralement plus élevée au cours des méningites liées à ces deux espèces. Pour les méningites à *Listeria*, une PCR spécifique serait préférable, effectuée sur un volume suffisant de LCR (au moins 1 ml), du fait de la moindre concentration bactérienne.

Enfin, la détection de génomes bactériens dans le LCR peut être effectuée par hybridation in situ, sans amplification de l'ADN, avec une révélation par fluorescence. La recherche se fait à l'aide de sondes universelles, ou d'un ensemble de sondes spécifiques, ciblées, entre autres, sur le méningocoque, le pneumocoque et *H. influenzae*. Cette technique

est moins onéreuse et plus rapide que la PCR, mais beaucoup moins sensible, par conséquent inappropriée aux LCR pauvres en bactéries (examen direct négatif).

Tableau 4 : Apport de la PCR dans le diagnostic des méningites bactériennes [28].

Auteurs (année)	Type d'étude	Nombre d'échantillons	Échantillons avec preuve bactériologique	Type de PCR	Germes ciblés	Cible	PCR positive
Chanteau et al. 2006	P	3791	Groupe sans	PCR multiplex	<i>N.m</i> , <i>S.p</i> , <i>H.i</i>	<i>crgA</i> <i>lytA</i> <i>bexA</i>	1547/ 3741 (40,8 %)
Pedro et al. 2007	P	71	Groupe avec	PCR multiplex	<i>N. m</i> , <i>S.p</i> , <i>H.i</i>	<i>crgA</i> , <i>ply</i> <i>bexA</i>	70/71 (98 %)
Bronska et al. 2005	P	37	Groupe avec	PCR Semi nested PCR	<i>N.m</i>	<i>crgA</i> ARN 16S	34/37 (91,9 %)
Saravolatz et al. 2003	P	74	Groupe sans Groupe avec	Broad Range Bacterial PCR	Tous	ARN 16S	17/74 (23 %) 17/17 (100 %)
Taha, 2000	P	225	Groupe sans Groupe avec	PCR multiplex	<i>N.m</i>	<i>crgA</i> , <i>orf2</i> , <i>siaD</i>	101/225 (46 %) 49/53 (93 %)
Backman et al. 1999	R	33	Groupe sans	PCR Semi nested PCR	<i>N.m</i> , <i>S.p</i> , <i>H.i</i> , <i>S.a</i> , <i>L.m</i>	ARN 16S	32/33 (97 %)
Van Gastel et al. 2007	R	37	Groupe avec	Real-time PCR	<i>N.m</i> , <i>S.p</i>	<i>ctrA</i> <i>ply</i>	20/23 (87 %) 14/14 (100 %)
Corless et al. 2001	P	81	Groupe sans	Real-time PCR	<i>N.m</i> <i>S.p</i> <i>H.i</i>	<i>crgA</i> <i>ply</i> <i>bexA</i>	32/36 (89 %) 9/9 (100 %) 33/36 (92 %)
Bryant et al. 2004	P	24	Groupe avec	Nested-PCR Real-time PCR	<i>N.m</i>	<i>porA</i> <i>ctrA</i>	21/24 (88 %) 23/24 (96 %)
Tzanakaki et al. 2005	P	336	Groupe sans Groupe avec	PCR multiplex	<i>N.m</i> , <i>S.p</i> , <i>H.i</i>	<i>crgA</i> , <i>ply</i> <i>bexA</i>	102/336 (30 %) 62/67 (92 %)
Richardson et al. 2003	P	38	Groupe sans	PCR	<i>N.m</i>	IS 1106	37/38 (97 %)
Gray et al. 1999	P	125	Groupe sans Groupe avec	Real-time PCR	<i>N.m</i>	<i>ctrA</i> , <i>siaD</i>	77/125 (62 %) 32/42 (76 %)

P : prospective, R : rétrospective, *N.m* : *Neisseria meningitidis*, *S.p* : *Streptococcus pneumoniae*, *H.i* : *Haemophilus influenzae*, *S.a* : *Streptococcus agalactiae*, *L.m* : *Listeria monocytogenes*

3. Les infections bactériennes des voies respiratoires basses [29, 30, 31]

Les infections respiratoires aiguës basses communautaires sont des pneumonies survenant chez des sujets préalablement sains développant une infection pulmonaire en dehors de l'hôpital. Elles représentent une des principales causes de décès à travers le monde. Aux États-Unis, elles représentent la première cause de mortalité d'origine infectieuse avec environ 45 000 décès par an et la sixième cause de mortalité globale. En France la pneumonie aigue communautaire (PAC) représente la première cause de mortalité d'origine infectieuse et

la cinquième cause de mortalité globale. La notion de pneumonie est souvent associée à une étiologie bactérienne, notamment à *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* pour les pneumonies dites “typiques” et *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, et *Legionella* spp pour les pneumonies “atypiques”.

3.1. Techniques monoplexes

3.1.1. *Streptococcus pneumoniae* [7, 26, 32, 33]

S. pneumoniae est la cause la plus fréquente des PAC chez les adultes et les enfants. La détection par la culture classique est moins couteuse et facilite la détermination de résistance aux antibiotiques. Cependant, elle prend beaucoup de temps et peut ne pas donner de résultats déterminants, en particulier lorsque les antibiotiques ont été administré avant l'échantillonnage. Plusieurs PCR ont été employées à des degrés divers de succès la positivité de la PCR varie de 68% à 100%, même si on voit mal comment cela reflète souvent la colonisation des voies respiratoires supérieures ou une infection, en utilisant des amorces spécifiques à des régions répétitives et des gènes codant pour l'ARNr, molécule adhérente à la surface du pneumocoque (*psaA*), pneumolysine (*ply*), pénicilline-binding protein, et l'autolysine (*lytA*). Ces dernières années, la PCR en temps réel a permis d'améliorer le diagnostic, offrant la possibilité de quantifier la charge bactérienne avec une plus grande rapidité, fiabilité (moins de risque de contamination) et sensibilité (détection de moins de 10 copies pour les gènes *plis* et *lytA*), une PCR en temps réel a été développée pour la détection de *S. pneumoniae* et appliquée sur des expectorations provenant d'un collectif de 129 patients. Les auteurs rapportent une sensibilité de 90 % et une spécificité de 80 %. Elle devrait permettre de distinguer la colonisation du tractus respiratoire par *S. pneumoniae* (ou par un autre germe) d'une vraie infection.

Néanmoins, l'identification de *S. pneumoniae* est plus complexe. Les souches qui sont génotypiquement étroitement liées à l'arbre des streptocoques oraux portent les gènes codant pour les facteurs de virulence de *S. pneumoniae* *lytA* et *plis*. Les méthodes basées sur la PCR du gène *ply* ne sont donc pas spécifiques et présentent des taux de détection élevés dans la salive à partir de la culture négative chez les individus sains. Récemment, une nouvelle cible spécifique de *S. pneumoniae*, le fragment du gène *Spn9802* a été signalé.

3.1.2. *Mycoplasma pneumoniae* [34]

M. pneumoniae est le deuxième agent responsable de PAC bactériennes (15 à 20 %). Ces infections surviennent à l'état endémique avec des poussées épidémiques tous les quatre à sept ans et atteignent plus volontiers l'enfant de plus de cinq ans. Hormis ces caractères épidémiologiques, l'infection à *M. pneumoniae* ne présente pas de trait clinique spécifique permettant de l'identifier. La preuve de l'origine de cette infection ne peut être faite que par le diagnostic biologique.

En raison de la relative insensibilité et le temps prolongé nécessaire pour la détection de *M. pneumoniae* par la culture, la nécessité de deux sérums l'un en phase aiguë et l'autre en convalescence avec 2 à 4 semaines d'intervalle pour le diagnostic sérologique optimale, la PCR a acquis un intérêt considérable très peu de temps après son introduction. Les premiers rapports de la PCR adaptée pour la détection de *M. pneumoniae* parus en 1989. Dès lors, plus de 200 documents décrivant l'utilisation de la PCR classique pour la détection de *M. pneumoniae* dans les infections humaines ont été publiés. Les gènes cibles utilisées comprennent l'opéron ATPase, l'adhésine *PI*, le gène d'ARNr 16S, le gène *tuf* du facteur d'élongation Tu et l'élément répétitif *repMP1*.

Plusieurs tests de PCR en temps réel ont également été décrits. La comparaison de la PCR en temps réel avec la culture et/ou la sérologie a donné des résultats différents qui ne sont pas toujours concordants. Comme on pouvait s'y attendre, les tests moléculaires ont fait souvent preuve d'une sensibilité supérieure pour la détection de l'infection aiguë par rapport à la sérologie et la culture, bien que ce ne soit pas toujours le cas. Les résultats positifs par PCR chez les personnes à culture négative sans preuve de maladie des voies respiratoires suggèrent la spécificité inadéquate du test, la persistance de *M. pneumoniae* dans l'organisme après l'infection, ou le portage asymptomatique. Les études quantitatives peuvent être nécessaires avant que nous puissions tirer des conclusions définitives sur l'utilité et l'applicabilité clinique. Les résultats positifs de la PCR chez les patients séronégatifs pourraient être le résultat d'une réponse immunitaire inadéquate au succès précoce du traitement antibiotique ou de l'échantillonnage effectué avant la réponse spécifique des anticorps. Les résultats négatifs de la PCR chez les patients ayant une culture ou une sérologie positive pourraient être causés par

la présence d'inhibiteurs ou des problèmes techniques avec le test et son gène cible. Si les antibiotiques ont été administrés, les résultats de la PCR peuvent être négatifs, même si la sérologie est positive.

La technique NASBA a également été appliquée pour la détection de *M. pneumoniae* en échantillons cliniques. Les premières études ont montré que la performance de NASBA est comparable à la PCR en termes de sensibilité.

3.1.3. *Legionella pneumophila* [35, 36]

Legionella est l'agent causale de la légionellose qui est une maladie infectieuse bactérienne, il peut s'agir de pneumonies communautaires ou nosocomiales se présentant soit sous forme sporadique (la majorité), soit sous forme épidémique, la légionellose représenterait 5 % PAC, et jusqu'à 15 % des PAC nécessitant une hospitalisation. *L. pneumophila* est le plus souvent en cause : 90 à 98 %, tout particulièrement le séro groupe 1 responsable de 84 à 90 % des cas déclarés, c'est une bactérie exigeante : elle ne pousse que sur des milieux spéciaux et lentement (3-4 jours et jusqu'à 10 jours).

Pour avoir une idée plus claire sur la place des techniques moléculaires en diagnostic biologique de la légionellose voir le tableau 5.

Le premier test destiné à détecter l'ADN de *L. pneumophila* a été une sonde ribosomal radiomarkée spécifique pour toutes les souches de *Legionella* spp (Gen-Probe, San Diego, Californie). Les chercheurs ont rapporté divers sensibilités et spécificités de cet essai. L'utilisation de ce test dans un hôpital a donné lieu à 13 cas faux-positifs et il a été retiré du marché peu de temps après cette pseudo-épidémie.

Une grande variété de techniques PCR a été évaluée pour la recherche des *Legionella* spp. Quand elles sont appliquées sur des échantillons respiratoires, elles apparaissent aussi sensibles voire plus sensibles que la culture. En effet, la PCR est considérée selon certains auteurs comme le test de choix pour les patients qui produisent des expectorations. La PCR cible le gène *mip* et les gènes de l'ARN 16S ou 5S permettant l'amplification spécifique de quantités infimes d'ADN de *Legionella* et fournissant des résultats dans un court laps de temps. Elle a également le potentiel de détecter les infections causées par les espèces ou

sérogroupe de *Legionella*, pour avoir plus d'idée sur l'intérêt de la PCR par rapport aux autres méthodes diagnostiques voir le tableau 5. Un nouveau test commercial (BD ProbeTec ET *L. pneumophila*, Becton Dickinson) qui détecte les sérotypes 1-14 de *L. pneumophila* dans les expectorations est maintenant approuvé par la FDA, mais les données publiées sur ces caractéristiques et sa performance font défaut.

Chez les patients incapables d'expectorer, ce qui est fréquent au cours de la légionellose, le recours à des prélèvements tels que le lavage broncho-alvéolaire est nécessaire. Les résultats de la PCR sur de tels échantillons sont excellents : Jonas D et al, ont étudié 256 lavages broncho-alvéolaires et ont comparé les résultats de la culture avec ceux de la PCR. Dans huit cas, la culture du lavage broncho-alvéolaire était positive à *L. pneumophila*. Tous ces patients avaient également une PCR positive. Dans six cas, la PCR sur des lavages broncho-alvéolaires provenant de quatre patients était positive alors que la culture était négative. Pour les 242 autres lavages broncho-alvéolaires, la culture et la PCR étaient négatives. Les auteurs concluent à la grande sensibilité de la détection dans le lavage broncho-alvéolaire de *Legionella spp* et à sa grande spécificité.

Tableau 5 : Sensibilité et spécificité des méthodes diagnostiques de la légionellose [37].

Test	Délai de résultat	Echantillon	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Avantages	Inconvénients
Culture	3-10 jours	Respiratoire	< 10-80	100	Détection toutes les espèces et sérogroupe	Peu sensible pour être utilisée en pratique clinique surtout sous traitement
		Sang	< 10	100		
IF directe	< 4h	Respiratoire	25-70	> 95	rapide	Laboratoires spécialisés Réactions croisées
Détection de l'antigène urinaire	< 1h	Urine	70-90	> 99	Rapide Résultats même sous traitement	Ne permet la détection que de <i>L. pneumophila</i> sérogroupe 1 Une concentration des urines avant analyse est recommandée
Sérologie	3-10 semaines	Sérum	60-80	> 95	Doit être utilisée en phase aiguë et de convalescence pour déterminer les séroconversions	Résultats à interpréter avec précaution
PCR	< 4h	Respiratoire	80-100	> 90	Détection toutes les espèces	Technique non encore incluse dans les critères de définition des cas
		Sérum urine	30-50 46-86	> 90 > 90		

IF : Immunofluorescence.

3.1.4. *Chlamidophila pneumoniae* [35, 38]

C. pneumoniae a émergée dans le début des années 1980 comme une nouvelle cause de 10% des PAC et 5% des cas de bronchite et de sinusite, principalement chez les enfants de 5 à 14 ans. Les preuves sérologiques indiquent que les infections à *C. pneumoniae* surviennent dans le monde avec une séroprévalence supérieure à 50% chez les adultes.

Le diagnostic de l'infection à *C. pneumoniae* est habituellement effectué par des tests sérologiques. Le centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) estime le test par microimmunofluorescence comme norme de référence, mais il est techniquement difficile à effectuer, prend beaucoup de temps et manque de sensibilité par rapport à la PCR et la culture cellulaire. L'isolement en culture cellulaire de *Chlamydomphila* est aussi techniquement complexe et exige des semaines pour obtenir un résultat. En outre, l'isolement en culture cellulaire et la microimmunofluorescence ne sont pas utiles pour les analyses à haut débit. Ainsi, les dosages moléculaires et d'autres méthodes non-culturelles seraient cliniquement avantageux. De nombreux tests de PCR mis au point en laboratoire ont été signalés, mais aucun n'a été entièrement validé dans un contexte clinique. En outre, le manque de normalisation et la variation inter-laboratoires des tests PCR de *C. pneumoniae*, rend difficile de déterminer leur sensibilité et spécificité comparatives. Un test de PCR commerciale a été élaboré avec une sensibilité (100% avec plus d'une copie de l'ADN) et spécificité d'analyse déclarées élevées.

Bien que la PCR apparaisse pour certains experts au moins aussi sensible que la culture, l'absence de « gold standard » rend difficile l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.

Le travail de Verkooyen et al, illustre parfaitement ce dernier point. Les auteurs ont étudié 156 patients avec une PAC nécessitant une hospitalisation. La PCR a été réalisée soit sur un prélèvement nasopharyngé, soit sur un prélèvement de gorge soit sur un lavage bronchoalvéolaire. Vingt-trois patients avaient une évaluation sérologique compatible avec le diagnostic d'infection à *C. pneumoniae*. Neuf de ces patients avaient une PCR positive. À l'inverse, 22 patients avaient une PCR positive avec une sérologie négative. Bien évidemment, il est difficile de savoir si la PCR est plus sensible que la sérologie ou, à

l'inverse, moins spécifique. Enfin, actuellement, il est difficile de savoir quel est le meilleur site de prélèvement pour rechercher par PCR une infection à *C. pneumoniae*.

Signalons qu'il n'existe que peu de données sur l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des infections à *Chlamydia psittaci*.

3.1.5. *Bordetella pertussis* [39, 40, 41]

La coqueluche est une infection respiratoire hautement contagieuse, très répandue dans le monde (environ 50 millions de cas et 300 000 morts estimés par an) due à une bactérie, *B. pertussis*. En France, elle est la première cause de mortalité bactérienne chez le nourrisson de moins de 2 mois. La maladie est (relativement) contrôlée par la vaccination dans les pays industrialisés. Un diagnostic rapide de la coqueluche est nécessaire pour prévenir la transmission de la maladie.

L'inadaptation des techniques conventionnelles en routine a conduit au développement de techniques de PCR afin de détecter directement un fragment du génome de *B. pertussis* à partir des prélèvements nasopharyngés.

Quatre régions du génome de *B. pertussis* ont été utilisées pour l'amplification : la région promotrice du gène de structure de la toxine de *pertussis*, la région située en amont des gènes de structure des porines, des séquences d'insertion répétées (*IS481*) et le gène codant pour l'adenylate cyclase. Les trois premières régions sont spécifiques de *B. pertussis*, la quatrième ne permet pas de différencier les différentes espèces de *Bordetella*. La séquence d'insertion (*IS481*) présente en plusieurs copies (80 à 100 copies), apparaît comme une cible de choix pour l'amplification en augmentant la sensibilité de la détection. Cependant des homologies de séquences sont observées avec une autre bordetelle (*B. holmesii*) au niveau de cette séquence, pouvant donner des fausses réactions positives.

La technique de PCR est rapide. Elle permet de rendre un résultat fiable en 48 heures pour la PCR conventionnelle et en quelques heures pour la PCR en temps réel, alors que le délai de résultat de la culture est de 6 jours. L'utilisation de la PCR dépend moins que la culture des contraintes liées au transport et à la conservation des prélèvements. La viabilité de la bactérie n'est pas nécessaire pour sa détection. De plus, l'utilisation de la PCR dépend

moins que la culture de la prise éventuelle d'antibiotique actif vis à vis de *B. pertussis*. Dans l'étude faite par S. Cohen-Bacrie et al, après mise sous traitement par macrolides, la PCR est restée positive jusqu'au 5^{ème} jour de traitement. Eldeman et collaborateurs ont montré qu'après 4 jours de traitement, 56 % des échantillons avaient une culture positive et 89 % une PCR positive. Après 7 jours de traitement, aucune culture n'était positive et seulement 56% des échantillons avaient une PCR positive. Globalement, la sensibilité de la PCR pour le diagnostic de coqueluche varie entre 80 et 100% selon les auteurs. La PCR en temps réel apparaît plus sensible que la PCR conventionnelle et une étude américaine récente montre une sensibilité supérieure de 200 % à la culture.

En 2010 une étude a utilisée un nouveau test (GenoQuick1 Bordetella [GQB], Hain Life Science, Allemagne) (figure 27) qui permet la détection rapide (environ deux heures) de *B. pertussis* et *parapertussis* directement à partir d'un écouvillonnage buccal ou nasal par PCR suivie d'une révélation immédiate. L'étude a porté sur 40 patients pendant trois mois, en majorité des jeunes enfants présentant une toux paroxystique. Elle a permis de valider la performance du test, ce test peut être utile dans les unités d'urgences pédiatriques.

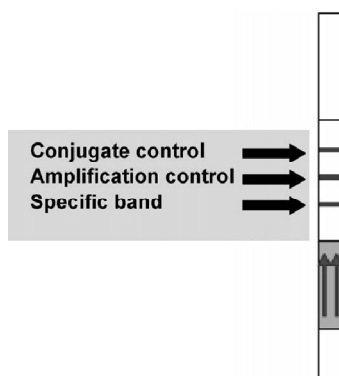


Figure 27 : GenoQuick1 Bordetella. Un échantillon est *Bordetella* positif (*B. pertussis* ou *parapertussis*) quand en plus de la zone de contrôle de la conjugation et la zone de contrôle de l'amplification, la zone de *Bordetella* spécifique est teintée [40].

3.2. Techniques multiplexes [42, 43, 44, 45]

Les tests de PCR multiplexée en temps réel utilisés dans le cadre du diagnostic étiologique de telles infections offrent la perspective d'augmenter le rendement diagnostique et

la possibilité de diminuer le coût des utilisations non adaptées d'antibiotiques, dans ce sens 67 prélèvements respiratoires ont été testés en parallèle avec la PCR multiplexée en temps réel et les PCR conventionnelles pour le diagnostic de *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* et *M. pneumoniae*. Le taux d'agrément global était de 98,3 %, correspondant à 95,8 % pour *C. pneumoniae*, 100 % pour *L. pneumophila* et 100 % pour *M. pneumoniae*. L'application en pathologie clinique de cette PCR multiplexée en temps réel a montré des résultats comparables aux techniques conventionnelles. Un test commercial, Chlamylege (Argene Inc.) détectant simultanément dans des échantillons respiratoires *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, et de nombreuses *Legionella* sp. a été mis au point. Ce kit a permis de tester 158 prélèvements cliniques provenant de patients ayant une infection respiratoire documentée. Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés et identifiés par le kit Chlamylege, aucun faux positif n'a été détecté parmi les échantillons négatifs. Le kit a été évalué prospectivement dans des échantillons pédiatriques. L'étude incluait 220 aspirations endotrachéales et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les trois PCR maisons utilisées en routine. Le kit a détecté deux nouveaux échantillons positifs, l'un à *M. pneumoniae* et l'autre à *Legionella* sp, autre que *L. pneumophila*. Dans le cadre des pathologies respiratoires infectieuses, un test commercial combinant la PCR en temps réel et les tests multiplexés pourrait permettre leur implantation dans des point of care (POC).

La PCR multiplex permet une simplification de la demande d'examen biologique du médecin à un cout de réalisation équivalent à celui d'une simple PCR : le cout des amorces représente moins de 1 % du cout total d'une amplification génique.

Autre point fort éventuel, les PCR négatives représentent un diagnostic d'exclusion qu'il ne faut pas négliger, il peut conduire par exemple à l'épargne de certaines familles d'antibiotiques comme les macrolides ou les fluoroquinolones. En absence d'amélioration il est recommandé de prescrire en seconde ligne l'une de ces deux familles d'antibiotiques pour être associée à la bêtalactamine généralement prescrite en première intention pour cibler le pneumocoque. Cet ajout d'antibiotiques à bonne pénétration intracellulaire vise essentiellement les germes atypiques : il faut donc que le délai de réalisation de cette PCR soit rapide sinon son intérêt dans cette stratégie d'épargne antibiotique diminuerait.

Aussi pour les patients sur lesquels on ne peut ou ne veut pratiquer d'exploration trop «agressive» (aspiration, lavage) un simple écouvillonnage bien réalisé de la gorge peut suffire.

Une deuxième technique est aussi développée dans ce domaine par Loens et al pour la détection simultanée de *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* et *L. pneumophila*, la NASBA qui a montré une capacité discriminante supérieure à celle de la PCR.

4. Les infections bactériennes gastro-intestinales :

4.1. *Clostridium difficile* [46]

C. difficile est responsable de 10 à 25% des diarrhées associées aux antibiotiques et de la quasi-totalité des colites pseudomembraneuses; elle est la principale cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays industrialisés. Les toxines A et B produites par les souches toxigènes sont les principaux facteurs de pathogénicité. Le diagnostic d'infection à *C. difficile* connaît un regain d'intérêt depuis l'émergence, il y a quelques années, d'une souche épidémique hypervirulente et épidémiogène (027/NAP1/BI).

Le diagnostic d'infection à *C. difficile* est actuellement le sujet de nombreuses publications, soulignant le manque de sensibilité des tests immuno-enzymatiques et essayant de définir la place des nouveaux tests moléculaires récemment commercialisés. Le choix de tests disponibles (tableau 6) est maintenant devenu large, étant nombreux, toute la difficulté réside dans le choix le plus juste et le mieux adapté à chaque laboratoire.

Tableau 6 : Méthodes de diagnostic des infections à *C. difficile*. Avantages et inconvénients [46].

	Méthodes				
	Test de cytotoxicité	Test IE détectant les toxines	Biologie moléculaire	Culture toxigénique	Glutamate déshydrogénase
Cibles	Toxine B (+ Toxine A)	Toxine A ou toxines A+B	tcdB et/ou tcdA	Isolement de la bactérie et détermination de son pouvoir toxigène in vitro	Glutamate déshydrogénase
Avantages	Sensibilité ++		Sensibilité +++		Sensibilité +++
	Spécificité +++	Spécificité +++			
		Rapidité	Rapidité		Rapidité
	Méthode de Référence			Méthode de Référence	
Inconvénients			Identification Présomptive du clone 027 (Xpert C. difficile, Cepheid)	Permet de réaliser un antibiogramme et de typer les souches	Excellente VPN
		Coût ++	Coût +++		Coût +
	Long (min48h)			Long	
	Absence de Standardisation et infrastructure lourde	Faible sensibilité	Peu spécifique (détection des Porteurs asymptomatiques de souches toxigènes)	Peu spécifique (détection des Porteurs asymptomatiques de souches toxigènes)	Peu spécifique (détection des de souches toxigènes et non toxigènes)
Inconvénients	Neutralisation de l'ECP		Présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les selles		

ECP : effet cytopathogène ; VPN: valeur prédictive négative ; IE : immuno-enzymatique

4.1.1. Les techniques de PCR en temps réel

Plusieurs tests de PCR en temps réel ont été récemment commercialisés. Ils détectent les gènes codant les toxines directement à partir des selles. Ceux de BD (BDGeneOhm C. diff) et Prodesse (ProGastroCd) ciblent une région conservée de *tcdB*. RIDA GENE (R-Biopharm) est un test de PCR en temps réel qui permet la détection de fragments de gènes spécifiques de *C. difficile* et de ses toxines A et B dans les selles. Enfin, le test commercialisé par Cepheid, Xpert C. difficile, permet la détection simultanée des gènes codant la toxine B, la toxine binaire ainsi que la délétion en 117 sur le gène *tcdC*, marqueur présomptif de la souche 027. De nombreuses évaluations concernant des PCR en temps réel «maison» ont également été publiées.

Ces méthodes sont à la fois sensibles (avec une sensibilité moyenne de 92% comparée au test de cytotoxicité et de 86% comparée à la culture toxigénique), et rapides. Les premières évaluations de ces méthodes sont encourageantes et elles seront probablement amenées à

prendre une place prépondérante dans l'arsenal diagnostique. Elles présentent néanmoins un certain nombre d'inconvénients à commencer par leur prix élevé et le risque de faux résultats. En ce qui concerne l'identification présomptive de la souche 027, il faut savoir que ce n'est pas la seule souche à avoir disséminé et à être responsable de formes sévères; selon les pays, d'autres souches sont associées à des complications (PCR-ribotypes 018 et 056). Une étude récente rapporte également la faible valeur prédictive positive de ces techniques de PCR. De plus, ces méthodes ne détectent pas les toxines libres dans les selles mais le gène des toxines, l'interprétation du résultat peut s'avérer délicate; le portage asymptomatique d'une souche de *C. difficile* toxigène peut être fréquent et la diarrhée est un symptôme relativement courant, en particulier chez les personnes âgées (prise d'antibiotiques fréquente, laxatifs, exposition à certains virus comme les norovirus).

4.1.2. La technologie LAMP

Le test IllumigèneTM *C. difficile* (Illumigène *C. difficile*, Meridian Bioscience) utilise la technique LAMP et cible une partie conservée du gène de la toxine A présente chez les souches toxigènes y compris les souches AB+. Les premières données suggèrent que les performances de ce test sont comparables à celles des méthodes basées sur la PCR en temps réel (Sensibilité 91,8% et spécificité 99,1% comparativement à la Culture toxigénique). Cet essai a l'avantage d'être rapide et de ne pas recourir à un équipement coûteux ce qui pourrait faire de ce test une option particulièrement attractive pour les laboratoires qui ne font pas de biologie moléculaire.

L'utilisation de méthodes moléculaires comme outil diagnostique semble très prometteuse mais nécessite plus de recul avant de pouvoir être recommandée en routine et reste prohibitif en raison de leur coût.

4.2. *Campylobacter* [47]

L'infection à *Campylobacter* est la première cause d'infection entérique bactérienne dans les pays développés comme dans les pays en développement qui a émergé il y a plus de 30 ans. L'infection correspond le plus souvent à une colite inflammatoire. Le diagnostic par culture paraît manquer de sensibilité par rapport aux autres méthodes IE et moléculaires récemment développées.

La PCR commence à être utilisée pour détecter les infections à *Campylobacter* dans les selles dans certains laboratoires dans les pays développés. Toutefois, la signification clinique d'un test PCR positif chez un patient dans un pays en développement pourrait être difficile à interpréter et les coûts associés à de tels essais font un obstacle de leur large utilisation.

4.3. *Escherichia coli* [48, 49]

L'identification taxonomique fondée sur les seuls caractères morphologiques, culturels, biochimiques ou antigéniques ne suffit pas pour identifier un *E. coli* agent d'entérite. Le grand nombre de facteurs de virulence codés par des gènes associés à des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons, îlots de pathogénicité, bactériophages) a pour conséquence une multitude de combinaisons de ces gènes rencontrés parmi les souches pathogènes de *E. coli*.

Grace à la biologie moléculaire, la quasi-totalité des facteurs de virulence actuellement identifiés peuvent être détectés. L'intérêt des techniques d'hybridation pour le diagnostic est limité depuis le développement de l'amplification génique ; elles ne sont donc pas présentées. Divers systèmes d'amplification génique de type PCR sont proposés pour l'ensemble des pathotypes.

Les PCR sont habituellement réalisés sur les souches isolées au cours de la coproculture mais des dépistages sont à présent proposés directement sur les prélèvements. Pour ces diagnostics directs, plusieurs techniques (chromatographie sur sépharose et adsorption des AN sur résines) sont proposées pour éviter les inhibiteurs de la réaction contenus dans les selles.

Le diagnostic simultané sur plusieurs souches d'un même malade (groupage d'ADN extraits de différentes souches pour un malade), pour plusieurs facteurs de virulence (PCR multiplexes couplées à une identification des amplicons par une hybridation à l'aide d'oligonucléotides spécifiques des variantes du facteur recherché), est possible. Les problèmes posés par la variabilité des gènes sont le plus souvent résolus par le choix d'amorces à partir de zones conservées, sélectionnés après alignement des séquences des variants.

Les protocoles des PCR multiplex et en temps réel sont disponibles dans des laboratoires spécialisés et ont montré une sensibilité et spécificité variables. Toutefois, ils ont l'avantage d'identifier les gènes de pathogénicité spécifiques, ce qui fait progresser la compréhension scientifique de ces organismes. Les travaux en cours peuvent rendre ces tests moléculaires plus largement disponibles pour la pratique clinique.

4.4. *Helicobacter pylori* [50, 51, 52]

Responsable d'un tableau clinique évolutif ciblé sur la muqueuse gastrique, *H. pylori* est une bactérie dont l'infection est la plus répandue dans le monde (50 % de la population). Elle est considérée comme un agent carcinogène dans la survenue du cancer gastrique. Sa détection repose sur des tests non invasifs et invasifs (Tableau 7), utilisés soit pour le diagnostic de l'infection soit pour le contrôle de l'éradication.

Bien que la culture soit considérée comme la méthode standard, elle a ses contraintes comme le long délai d'obtention des résultats et le besoin de respecter des conditions strictes de transport pour que cette bactérie fragile reste viable. Ces limites n'existent pas avec la PCR. Il s'agit d'une méthode sensible et spécifique, qui permet l'obtention de résultats rapides sans passer par des conditions particulières de transport des biopsies. Son principe est l'amplification de séquences d'ADN de *H. pylori* en utilisant des amorces spécifiques. Des études ont montré que parmi les séquences nucléotidiques hautement conservées de l'ADN ribosomal 16S, il existait des séquences spécifiques de genre mais aussi d'espèce. L'amplification de ces séquences suivie ou non du séquençage des amplicons permet ainsi le diagnostic de *H. pylori*. D'autres cibles ont été proposées parmi les gènes spécifiques de *H. pylori* et présents dans toutes les souches, notamment ceux de l'uréase (*ureA*, *ureB*), *gluM*, *tsaA*, *vacA*. La PCR a également été proposée pour détecter les souches les plus virulentes en recherchant le gène *cagA*.

Une méthode de PCR en temps réel utilisant le principe FRET-MCA (Fluorescence Resonance Energy Transfer-Melting Curve Analysis) permet de détecter *H. pylori* et son éventuelle résistance aux macrolides directement à partir des biopsies en moins de deux heures ce qui est absolument impossible pour la culture qui nécessite de 3 à 10 jours pour voir apparaître les colonies de *H. pylori* et au moins 48 heures de plus pour réaliser

l'antibiogramme. Cette technique utilise des amorces spécifiques de l'ARN ribosomal 23S de *H. pylori* et des sondes s'hybridant dans la zone où surviennent les mutations responsables de la résistance aux macrolides. Ce qui est utile dans les pays à forte prévalence pour ces antibiotiques surtout la clarithromycine qui occupe une place importante dans la trithérapie la plus prescrite pour guérir cette infection, Le signal est mesuré sur un thermocycleur particulier, le LightCycler®.

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des tests à la recherche d'*H. pylori* [50].

	Type	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
Tests invasifs	Examen anatomo-pathologique	>90%	>90%	Diagnostic histologique des lésions + performances	La fiabilité dépend du site, du nombre, de la taille des lésions et de l'expérience du personnel
	Culture	80 à 95%	100%	Permet l'antibiogramme	Conditions difficiles de transport (< 4 h à 4 °C ou dans des milieux spéciaux) et de culture
	Test rapide à l'uréase	>80%	95%	Diagnostic rapide (< 4 h)	Si négatif, compléter par un examen anapath. Diminution de sensibilité en cas de faible densité d' <i>H. pylori</i>
	PCR	>90%	100%	Conditions de transport et de conservation faciles, résultat rapide + test de sensibilité aux macrolides	Coût supplémentaire, Centre spécialisé, Méthodologies non standardisées
Tests non-invasifs	Recherche d'antigène dans les selles	Variable ≈ 92%	Variable ≈ 93%	Simplicité, surtout chez l'enfant et contrôle plus précoce de l'efficacité du traitement	Résultats variables chez l'enfant ; moins spécifique que les autres tests ; recueil désagréable pour le patient ; délai de réalisation/arrêt du traitement IPP ou ATB (1 mois) ; coût
	Sérologie	Variable 60 à 95%	Variable 60 à 95%	Pas de délai/arrêt du traitement par IPP ou antibiotiques simplicité	Faux positifs (les anticorps diminuent 4 à 6 mois après l'éradication, mais de manière inconstante)
	Test respiratoire à l'urée marquée	98%	98,5%	Performances (avant ou après éradication); simplicité	Délai/traitement : nécessité d'arrêt des IPP depuis 2 semaines et des ATB depuis 4 semaines ; non utilisable chez le jeune enfant

IPP : inhibiteurs de la pompe à protons ; ATB : antibiotiques.

5. Les infections bactériennes uro-génitales :

5.1. *Chlamydia trachomatis* [53, 54]

C. trachomatis est une bactérie hétérogène divisée en 19 sérovars responsables de pathologies variées comme le trachome, les infections génitales à type de cervicite et d'urétrite ou d'ulcération génitale dans la lymphogranulomatose vénérienne. L'infection à *C. trachomatis* est un problème de sante publique en raison des séquelles, cécité dans le cas du trachome, douleur pelvienne, stérilité et grossesse extra-utérine dans le cas de l'infection génitale. Elle représente la principale cause d'infections sexuellement transmissibles bactériennes dans les pays développés avec environ 92 millions de nouveaux cas par an.

C. trachomatis est un organisme intracellulaire dont la croissance en milieu de culture est difficile. Considérée auparavant comme la technique de référence (réservée à quelques laboratoires spécialisés), cette technique est longue (résultat en trois-sept jours) et coûteuse. Bien que sa spécificité soit de 100 %, elle présente une faible sensibilité (40–85 % selon les études). Elle permet d'établir des enquêtes épidémiologiques, voire la réalisation d'un antibiogramme. La recherche directe des antigènes spécifiques possède l'avantage d'être rapide mais est peu sensible (50-60 %) et nécessite une grande habitude de lecture. La sérologie, témoin tardif de l'infection, n'a d'intérêt que pour les infections hautes (Tableau 8).

L'ensemble de ces inconvénients a été levé grâce à l'apport de la biologie moléculaire. Les différentes techniques disponibles sont toutes équivalentes et permettent la détection de *C. trachomatis* dans différents types d'échantillons biologiques (sperme, urine, prélèvements vulvaire ou vaginal). Tant chez l'homme (prélèvements urétraux) que chez la femme (prélèvements endocervicaux ou urinaires), les kits ont une meilleure sensibilité que la culture tout en ayant une spécificité équivalente. En pratique, le test est le plus souvent effectué sur les urines du premier jet (sans toilette préalable) facilement réalisable par la patiente elle-même. Cet examen constitue un test de dépistage excellent. Il peut aussi être couplé au prélèvement au niveau de l'endocol. En fonction de la clinique, d'autres sites peuvent aussi être explorés tels que la conjonctive oculaire (en cas de conjonctivite), le liquide articulaire (en cas de syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter) ou endotrachéal chez le nouveau-né en cas de suspicion de pneumonie. En France, il n'existe actuellement aucune recommandation sur le

dépistage de *C. trachomatis* par biologie moléculaire. Les tests de biologie moléculaire sans amplification (hybridation directe) sont parfois employés. Les tests à l'aide des techniques d'amplification sont cependant préférés et utilisés de manière courante. Les tests d'amplification sont réalisables sur urines, prélèvement urétral, endocervical ou vaginal. Selon l'origine biologique de l'échantillon, la spécificité et la sensibilité des tests varient. À titre d'exemple, le kit Amplicor™ (société Roche) a une sensibilité variant de 45 à 80 % chez la femme, de 92 % chez l'homme dans les urines et de 98 % au niveau urétral. Pour certains auteurs, tant chez l'homme que chez la femme, la recherche de *C. trachomatis* dans les urines présente la même sensibilité et spécificité que les prélèvements urétraux ou cervicovaginaux. Par ailleurs, les kits quelle que soit la technique d'amplification utilisée sont équivalents tant sur le plan de la sensibilité que de la spécificité. Les tests d'amplification génique ne peuvent cependant pas différencier un organisme vivant d'un organisme mort. Il est donc recommandé de ne pas effectuer cette recherche si le sujet a suivi un traitement spécifique (antibiotiques notamment) dans les trois semaines précédentes. Par ailleurs, dans les zones de faible prévalence, si un test d'amplification est utilisé, certains auteurs recommandent en cas de positivité d'effectuer un deuxième test de confirmation (pour éliminer les faux positifs) sur le même échantillon ou sur un nouvel échantillon, voire d'effectuer une culture.

Les techniques de PCR en temps réel présentent l'avantage de quantifier la charge bactérienne. Nous avons pu ainsi montrer que celle-ci est dix fois plus élevée dans l'auto-prélèvement vaginal que dans l'urine du premier jet chez la femme, ce qui en fait le prélèvement de choix dans le dépistage de l'infection à *C. trachomatis* dans ce cas.

Tableau 8 : Techniques de détection de *C. trachomatis* [55].

	Avantages	Inconvénients
Culture cellulaire	Détecte toutes les souches Spécificité élevée	Sensibilité : 50-90 %. Temps : 72 heures au moins. Urines, sperme, écouvillons secs non utilisables ; nécessite un prélèvement par grattage endocervical ou urétral (écouvillons mis en milieu de transport).
Tests antigéniques (immunochromatographie ou Elisa) : détectent MOMP et LPS	Rapides (tests unitaires) Détectent toutes les souches	Sensibilité très variable : 10-80 %. Spécificité : 80 %. Prélèvements autorisés : col chez la femme ou urines chez l'homme.
Tests d'amplification génique	Sensibilité : 95 % Adaptés à tous les prélèvements	Coût Spécifiques de cible (tests tous capables de détecter les souches sauvages, mais pas tous les souches mutées)

MOMP : protéine majeure de membrane ; LPS : lipopolysaccharide.

5.2. *Neisseria gonorrhoeae* [54]

N. gonorrhoeae est un organisme intracellulaire dont la culture contrairement à *C. trachomatis*, est facile. La spécificité (100 %) et la sensibilité de cette technique (85 %) sont excellentes. Le résultat est obtenu en un à trois jours. Par ailleurs, elle permet de réaliser un antibiogramme. Pour certains auteurs, dans les régions où la prévalence de *N. gonorrhoeae* est faible, la culture est préférée aux tests d'amplification génique. Cette notion est cependant contestée par d'autres auteurs qui n'ont pas observé de différence de performances des kits en termes de sensibilité et de spécificité en fonction de la prévalence.

Pour *N. gonorrhoeae*, le kit Amplicor a une sensibilité de 84-100 % pour les prélèvements endocervicaux, de 100 % pour l'urètre, de 67 % pour les urines chez la femme et de 95 % pour les urines chez l'homme.

5.3. *Treponema pallidum* [56, 57]

Fléau historique, la syphilis reste une maladie d'actualité en ce début du XXI^e siècle. Évoquée par l'œil du clinicien, l'infection est confirmée par une sérologie spécifique, qui reste à ce jour la pierre angulaire de la certitude diagnostique, l'agent responsable *T. pallidum* n'étant pas cultivable.

La sérologie (TPHA, VDRL et FTA-Abs) est le diagnostic habituel, mais à des stades très précoces de l'infection elle présente une faible sensibilité. Par conséquent, les tests de diagnostic direct deviennent importants à ces stades précoces. Toutefois, la microscopie à fond noire et l'IF ont des limites de sensibilité et de spécificité et exigent un personnel expérimenté.

La biologie moléculaire peut apporter des avantages dans le diagnostic de l'infection par *T. pallidum*. Pour l'instant, aucune technique n'est disponible sur le marché, et ceux décrits dans la littérature ont été développés dans les centres de référence. Différentes techniques ont été décrites pour amplifier les gènes de *T. pallidum*. L'amplification par RT-PCR d'une région de 366 pb de l'ARNr 16S, a obtenu une sensibilité extraordinaire (10⁻³ organismes), qui détermine l'existence d'une contamination, il est donc nécessaire d'effectuer un transfert sur Southern blot pour confirmer la spécificité. L'amplification par PCR du gène de l'ADN

polymérase I a une sensibilité de 10-25 organismes, mais elle est très laborieuse. Par la suite d'autres formats RT-PCR sont développés. Une des techniques de référence amplifie le gène de la protéine de 47 kDa. Son succès est qu'elle a été faite en format multiplex sur d'autres causes d'ulcérations génitales: *Haemophilus ducreyi* et le virus de l'herpès simplex (HSV) types 1 et 2. Sa sensibilité varie entre 91 et 95%. Cette technique n'a pas été commercialisée.

En France, La PCR est en cours de validation au centre national de référence, surtout sur les lésions pénéennes, mais aussi les lésions buccales et le sérum/placenta/sang de cordon/LCR en cas de syphilis congénitale.

5.4. *Mycoplasma genitalium* [58, 59]

M. genitalium, un mycoplasme de découverte récente, pourrait être responsable de 10% à 25% des cas d'urétrites masculines. Identifiable seulement par des techniques de PCR sur le premier jet d'urines ou sur le prélèvement urétral avec une sensibilité supérieure à 97%.

5.5. *Haemophilus ducreyi* [60]

Le chancre mou est un ulcère génital causé par *H. ducreyi*. Il est endémique dans certaines régions des États-Unis. En 2000, 78 cas de chancre mou ont été signalés au CDC, l'incidence du chancre mou est très probablement sous-estimée en raison des difficultés de mise en culture de l'organisme ainsi que le fait que souvent le diagnostic n'est pas considéré. En utilisant de nouvelles méthodes d'amplification de l'ADN, le CDC a identifié cette infection dans les villes où elle n'était plus diagnostiquée auparavant.

5.6. *Yersinia enterocolitica* [61]

Du fait des faibles performances des méthodes d'isolement d'*Y. enterocolitica* à partir d'échantillons polymicrobiens, des méthodes moléculaires, et plus particulièrement la PCR, ont été développées. Une étude récente suggère que la PCR en temps réel (TaqMan) possède une meilleure sensibilité (10^3 à 10^4 fois) que la culture ou la PCR traditionnelle. Il a aussi été proposé, de par sa sensibilité et sa rapidité, d'utiliser cette technique pour cribler les poches de sang et éviter ainsi les risques d'un choc septique. Cependant, il existe de nombreuses limites à l'utilisation de ce type de méthode.

De faux résultats négatifs peuvent résulter d'un polymorphisme des gènes cibles au sein de l'espèce, de la perte des cibles spécifiques lorsqu'elles sont portées par un élément génétique instable (comme le plasmide de virulence pYV), ou de la présence d'inhibiteurs dans les échantillons biologiques analysés (et en particulier dans les selles). Ainsi, certaines *Y. enterocolitica* du biotype 1A possèdent des séquences homologues à des gènes associés à la pathogénicité comme ceux codant une entérotoxine (Yst) ou une adhésine (Ail).

De plus, les performances et la fiabilité des résultats PCR peuvent grandement varier d'un laboratoire à l'autre, en fonction de l'expérimentateur, des produits et des équipements utilisés. Enfin, un test PCR positif ne permet ni de connaître les caractéristiques de la souche (biotype, sérotype), ni de déterminer sa sensibilité aux agents antimicrobiens, et peut ne pas différencier *Y. enterocolitica* de *Y. pseudotuberculosis*.

De ce fait, même si la PCR peut être un complément intéressant et utile pour le diagnostic d'une infection à *Y. enterocolitica*, il ne peut en aucun cas à l'heure actuelle remplacer l'isolement et l'identification de la souche.

6. Intérêt pour les infections bactériennes en dermatologie [62]

Depuis quelques années, la caractérisation des génomes des microorganismes responsables de maladies cutanées infectieuses a permis la mise au point de techniques PCR spécifiques de ces agents pathogènes. La recherche de *T. pallidum* par PCR s'effectue de nos jours en routine, y compris sur des prélèvements en paraffine, même si l'intérêt respectif de l'immunohistochimie et de la PCR dans cette indication reste débattu dans la littérature. Dans certains laboratoires européens, les techniques de PCR sont utilisées couramment pour le diagnostic des maladies infectieuses dermatologiques (leishmaniose, tuberculose, lèpre, etc.). De même, des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être déterminés pour des bactéries pathogènes comme le staphylocoque.

6.1. *Borrelia burgdorferi* [63, 64]

Le diagnostic de borréliose de Lyme est fondé avant tout sur l'observation des signes cliniques objectifs (principalement cutanés, neurologiques et articulaires) et sur des éléments

d'anamnèse (contact avec le vecteur) associés ou non à des éléments biologiques faisant partie intégrante du diagnostic en fonction de la manifestation.

Le diagnostic biologique repose sur l'utilisation de techniques de recherche directe de la bactérie réservée à des laboratoires spécialisés et de techniques indirectes reposant sur la recherche d'anticorps spécifiques.

Les techniques moléculaires sont toutes basées sur l'amplification génique in vitro par PCR ou par PCR en temps réel. Elles se pratiquent sur les mêmes prélèvements que la culture. Ces techniques moléculaires se sont fortement développées mais, actuellement, leur mise en œuvre pour le diagnostic direct est délicate et demeure l'apanage de laboratoires spécialisés. Aucun coffret commercial n'est disponible et cet acte n'est pas inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale.

Le polymorphisme clinique que présente la borréliose de Lyme est une caractéristique marquante de cette affection. Il est donc tout à fait légitime de discuter de l'intérêt des méthodes moléculaires en fonction des formes cliniques (tableau 9).

➤ Forme de contagion : erythema migrans

Dans cette forme clinique, La sensibilité est de l'ordre de 50 % pour la PCR. Mais elle demande une biopsie cutanée préalable ; ce qui n'est pas de pratique courante. La PCR nécessite un important délai pour la réponse ; plusieurs jours pour la PCR dite classique. Certes, la PCR en temps réel ne nécessite qu'un délai de réalisation de quelques heures. Mais il est très rare qu'un laboratoire mette en œuvre ce type de méthode très coûteuse que pour un seul patient et il regroupe en général les demandes.

En conclusion compte tenu de leur bonne sensibilité entre des mains expertes, la PCR peut être recommandée en cas de forme atypique ; un résultat négatif n'excluant pas le diagnostic.

➤ Formes compliquées précoces

La PCR peut être utile en cas de diagnostic douteux.

➤ Formes compliquées tardives

Dans le cas des arthrites, suivant les cibles utilisées (flagelline, *OspA*, *P66* ou gènes ribosomaux) les résultats de sensibilité par PCR varient de 50 à 70 %. Là encore, la sensibilité est meilleure avec une biopsie synoviale qu'avec un liquide de ponction. Mais cette biopsie implique un acte spécialisé. De même, dans les acrodermatites chroniques atrophiantes, les rendements par PCR varient de 60 à 90 %.

Tableau 9 : Sensibilité comparée des méthodes biologiques en fonction de la forme clinique [64].

	Forme de contagio		Formes compliquées précoces		Formes compliquées tardives			
	Erythème migrant		Méningoradiculites		Arthrites		acrodermatites chroniques atrophiantes	
	Sérum	Peau	Sérum	LCR	Sérum	Liquide *articulaire	Sérum	Peau
Culture	NR	38-80 %	NR	≤ 10 %	NR	< 5 %	NR	20-60 %
PCR	NR	60-90 %	NR	25 %	NR	50-70 %	NR	60-90 %
ELISA	20-50 %	NR	70-90 %	80-100 %	90-100 %	NR	95-100 %	NR

NR : non réalisable ; * : meilleurs résultats avec les biopsies synoviales

6.2. *Bartonella henselae* [65, 66]

B. henselae est l'agent de la maladie des griffes du chat, infection humaine bénigne se manifestant le plus souvent par une adénopathie régionale persistante. C'est une zoonose dont la transmission à l'homme se fait principalement par griffures et/ou morsures de félins. On dispose actuellement de nombreux outils diagnostiques dont l'utilisation est à combiner et à adapter à chaque situation clinique. *B. henselae* est une bactérie difficile à cultiver, le diagnostic repose donc principalement sur la biologie moléculaire et la sérologie.

Les méthodes de biologie moléculaire contribuent grandement au diagnostic, notamment à partir de prélèvements biopsiques tels que des biopsies ganglionnaires, hépatiques, spléniques, cutanées, sur valves cardiaques ou encore sur sang total. Plusieurs sets d'amorces et de sondes ciblant différents gènes sont utilisables. Les gènes les plus souvent amplifiés sont : *gltA* (citrate synthase), *ITS* (spacer entre le 16S et le 23S), *ribC* (chaîne α de la riboflavine synthase), *groEL* (head stock protein), *rpoB* (sous-unité β de l'ARN polymérase), *PAP* et *ftsZ* (cell division protein). Les PCR quantitatives en temps réel utilisant des sondes spécifiques sont souvent utilisées.

Pour la maladie des griffes du chat, la sensibilité de la PCR est de l'ordre de 65 à 85 % selon des études. La sensibilité est de 76 % selon Hansmann et al, et la spécificité est de 100%. Cependant, le diagnostic sérologique présente certaines limites, notamment une faible sensibilité (35 %) et spécificité (82 %) et les valeurs prédictives positives et négatives sont insuffisantes (71,4 % et 50 %, respectivement).

La stratégie diagnostique à mettre en place est différente selon le tableau clinique observé (Tableau 10). Le diagnostic de certitude de la maladie des griffes du chat se base essentiellement sur la PCR, réalisée sur biopsie ou liquide de ponction ganglionnaire et sur la sérologie. Pour les endocardites, la sérologie a une très bonne valeur prédictive positive. En cas d'intervention chirurgicale, la PCR sur valves cardiaques a également intérêt à être réalisée.

Dans l'angiomatose bacillaire et la péliose hépatique, la sérologie a peu d'intérêt. C'est la PCR sur biopsie cutanée et surtout l'histologie qui permettent de confirmer le diagnostic. Plus rarement, dans les formes viscérales, oculaires ou neurologiques, la PCR sur biopsie, humeur aqueuse ou LCR donne les meilleurs résultats.

Tableau 10 : Intérêt des différentes méthodes de diagnostic en fonction du tableau clinique. [65].

	Prélèvements	Sérologie	Culture	PCR	Histologie
Maladie des griffes du chat	Biopsie d'adénopathie	++	0	+++	+
Angiomatose bacillaire	Biopsie cutanée, sang	-	++	++	+++
Péliose hépatique	Biopsie hépatique	-	+	++	+++
Bactériémie	Sang	+	++	++	-
Endocardite	Valves cardiaques,	+++	++	+++	++
Formes viscérales	sang	++	++	+++	++
Rétinite	Biopsie hépatique, sang	+++	0	+++	-
Encéphalite	Humeur aqueuse	+	0	+++	-
	LCR				

6.3. Les Rickettsies [67]

Les rickettsies sont des bactéries intracellulaires strictes de la famille des Rickettsiaceae. Elles sont transmises par différentes espèces d'arthropodes, qui sont vecteurs et/ou réservoirs de la bactérie. Les tiques en sont les principales représentantes.

La sérologie est la méthode diagnostique de première ligne lors d'une infection à rickettsie, et la technique d'immunofluorescence indirecte étant la méthode référentielle. La culture ne peut être réalisée que dans les laboratoires de référence disposant d'un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 et d'un personnel qualifié.

Les outils de biologie moléculaire sont sensibles et rapides, ils contribuent en grande part au diagnostic pour un certain nombre de prélèvements. On peut chercher l'AN sur le sang (qui doit être prélevé sur tube d'éthylène-diamine-tétra-acétate), les biopsies cutanées, les tissus fixés en paraffine et les arthropodes. Les gènes étudiés sont le gène D et ceux codant pour l'ARNr 16S, citrate synthase (gltA), ompA, sca4 et sca5 (ompB). Plusieurs techniques ont été proposées : la nested-PCR augmente la sensibilité, mais a un risque élevé de contamination ; la PCR en temps réel a récemment été développée ; enfin il existe la PCR suicide, mais son usage reste limité pour des usages spécialisés. Il s'agit d'une technique de nested-PCR, qui utilise des amorces à usage unique, ciblant une séquence jamais amplifiée auparavant dans le laboratoire. Il s'agit d'une technique sensible et spécifique, évitant la contamination par des amplicons de manipulations antérieures.

6.4. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) [68]

Une équipe de bactériologie danoise (Ornskod et al) a rapporté une technique de PCR permettant d'identifier les patients non colonisés en moins de 24 h, de dépister dans le même temps les patients colonisés par SARM permettant une analyse ultérieure par des techniques microbiologiques traditionnelles, donnant accès à des profils d'antibiogrammes adaptés. Grâce à cette technique, une analyse de 300 à 400 prélèvements par jour étaient possible au sein de cet établissement hospitalier ayant dépisté l'ensemble des patients et du personnel soignant. La PCR permet donc dans cette expérience d'optimiser le rapport coût/efficacité de ces stratégies de dépistage. Sur 2194 prélèvements, cette méthode a montré une sensibilité de 100 % et une spécificité de 94 %. De plus cette méthode était parfaitement reproductible.

6.5. *Mycobacterium leprae* [69, 70]

La lèpre est la seconde mycobactériose mondiale après la tuberculose, avec 254 525 nouveaux cas en 2007. Selon l'OMS, l'élimination de la lèpre en tant que problème de santé publique (moins d'un cas pour 10 000 habitants) est atteinte au niveau mondial mais des zones de forte endémicité persistent.

M. leprae n'est toujours pas cultivable in vitro et sa recherche en microscopie optique reste la technique actuellement utilisée en pratique courante, en particulier en pays d'endémie. Elle s'effectue sur des frottis de suc dermique prélevés au niveau des lobules des oreilles et/ou de lésions cutanées après coloration de Zielh-Neelsen ou de Fite-Faraco.

La recherche du bacille de Hanssen par PCR a été rendue possible grâce au décryptage du génome de *M. leprae* qui comporte environ 10 % de gènes potentiellement codants qui lui sont propres, les autres étant communs avec *M. tuberculosis*. Les techniques d'amplification par PCR peuvent être réalisées sur des frottis de suc dermique (lobules des oreilles et/ou de lésion cutanée) ou/et préférentiellement sur des biopsies cutanées (meilleur niveau de détection). Ces techniques utilisant différentes sondes sont hautement spécifiques (96-100 %). Leur sensibilité serait, pour certains, meilleure que celle de la recherche de bacille de Hanssen par microscopie optique sur les frottis de suc dermique, et en particulier sur les frottis de suc dermique du lobule des oreilles. En revanche, elle serait identique ou très légèrement supérieure à celle de la recherche de bacilles par les colorations spéciales sur biopsie cutanée. Cette sensibilité est de pratiquement 100 % chez les patients ayant un index bactériologique positif (100 % des patients lépromateux et 5 à 10 % des patients tuberculoïdes). En revanche, chez les patients à index bactériologique négatif (plus de 85 % des patients tuberculoïdes), elle est très variable allant de 0 à 30 % selon les études. Dans le cas particulier de la lèpre nerveuse pure, lorsqu'une biopsie est réalisée, la PCR serait plus sensible que la recherche de bacille par colorations spéciales (respectivement 50 % versus 15 à 35 % de positivité). Compte tenu de ces résultats, l'aide au diagnostic de la PCR *M. leprae* si on la compare à celle de l'histologie ou à celle de la recherche des bacilles de Hanssen en microscopie optique n'apparaît pas majeure sauf peut-être dans les rares formes neurologiques pures. La PCR *M. leprae* n'est pas commercialisée.

7. Intérêt des techniques moléculaires en septicémies bactériennes [26, 71]

La définition de la bactériémie est la présence de bactéries dans le sang, mais ne comprend pas la description clinique importante du site ou de la source d'infection. La FDA préfère le terme « bloodstream infection » (BSI), plutôt que « bacteraemia ».

Le diagnostic conventionnel d'une BSI repose sur la mise en évidence de germes à partir d'hémoculture. En unité de réanimation, la fréquence des chocs septiques est de neuf cas pour 100 admissions et la mortalité globale s'élève à 55 %. Le diagnostic de BSI nosocomiale est souvent rendu difficile, par l'utilisation chez ces patients de traitement antibiotique empirique. Les systèmes automatisés d'analyse des hémocultures permettent une surveillance presque en continu de la croissance microbienne et accélèrent ainsi la détection des micro-organismes, la majorité d'entre eux étant détectés en 24 heures.

Il ya un besoin majeur non satisfait de raccourcir et d'améliorer les procédures courantes du laboratoire pour la détection et l'identification des micro-organismes responsables de BSI. Une technologie idéale de diagnostic permettrait d'identifier l'agent infectieux, ainsi que les déterminants de la résistance aux antibiotiques, en temps opportun afin que la conduite thérapeutique appropriée contre les agents pathogènes pourraient commencer rapidement. Malheureusement, l'hémoculture, gold-standard, échoue largement dans ce propos, la phase d'incubation dans des bouteilles, puis sur un milieu solide prend du temps, et le choix de l'antibiothérapie au cours de cette période est soit empirique ou conduit par les résultats cliniques du patient.

De la même manière, la méthode moléculaire idéale serait d'analyser l'échantillon sanguin d'un patient et de fournir toutes les informations nécessaires pour mener immédiatement une antibiothérapie optimale pour les infections bactériennes ou fongiques. En outre, il fournira des données pour évaluer l'efficacité de la thérapie par la mesure de la clairance des AN microbiens dans le sang au fil du temps. Aucune des méthodes moléculaires disponibles n'est suffisamment rapide, précise ou informative pour atteindre cet objectif.

7.1. Techniques de diagnostic moléculaire :

Dans le cas des BSI les plus graves, celles associées à un choc septique, la vitesse est d'une importance essentielle. Les techniques moléculaires peuvent donner des résultats plus rapidement que l'hémoculture et sont de plus en plus utiles pour réduire les délais d'exécution de laboratoire.

Beaucoup de techniques moléculaires ont été développées pour la détection et l'identification des agents pathogènes, mais, jusqu'à présent, peu d'essais peuvent être utilisés sur les hémocultures à croissance positive, et encore moins directement sur le sang. Les inconvénients de l'analyse des échantillons en culture sont le délai et le biais potentiel généré par une étape de culture précédente. En outre, les organismes non cultivables ne peuvent pas être identifiés de cette façon. Néanmoins, l'utilisation des méthodes moléculaires pour identifier les organismes après culture a le potentiel d'être plus rapide que l'identification phénotypique définitive et les tests standards de sensibilité aux antimicrobiens, qui nécessitent un supplément de 24-72 h après que la culture devient positive.

Les techniques d'identification des agents pathogènes sur la base de leur génome peuvent être divisées en deux catégories: techniques d'hybridation et d'amplification. Pour profiter de l'amélioration rapide de la disponibilité des instruments automatisés d'hémoculture, plusieurs études ont rapporté que l'utilisation des sondes peptidiques et / ou d'AN, la PCR et d'autres techniques d'amplification des AN peuvent rapidement identifier les organismes à partir d'hémocultures. Malgré l'avantage d'une réduction du temps d'identification des microorganismes, ces techniques ne peuvent réduire le temps d'incubation.

7.1.1. Techniques d'hybridation sur hémocultures positives :

Parmi les techniques appropriées pour la détection des agents pathogènes dans les hémocultures positives sont les techniques d'hybridation des sondes sur matrice et la technique FISH.

Une nouvelle méthode FISH employant un AN peptidique (PNA) est disponibles dans le commerce chez AdvanDx (Woburn, MA, USA). Le premier de ces essais, pour *Staphylococcus aureus*, utilise des sondes PNA ciblant l'ARNr 16S pour identifier

directement *S. aureus* à partir des hémocultures positives et la distinction entre *S. aureus* ou non-*S. aureus* dans des heures. Ce test a été étendu à d'autres agents pathogènes bactériens et fongiques. Ces méthodes ne peuvent être appliquées qu'après ce que le résultat de la coloration de Gram est disponible pour guider le choix du type de kit.

L'identification directe des bactéries à Gram positif les plus communes dans les hémocultures peut être effectuée en utilisant un kit disponible en commerce (AccuProbe, Gen-Probe Inc, San Diego, CA, USA) qui utilise l'essai de la technologie de protection d'hybridation. Cependant, le test a été validé par le fabricant seulement avec l'utilisation de bactéries fraîchement issues de milieu solide ou bouillons de culture, et non directement des échantillons cliniques. Lindholm et Sarkkinen ont évalué la performance diagnostique du test et ont trouvé une identification excellente utilisant la valeur seuil recommandée par le fabricant. Cependant, avec la sonde de *S. aureus*, même si la spécificité était très élevée (99,8%) la sensibilité était très faible (72,4%). Les valeurs seuil ont été ajustées et la performance des tests, en particulier celle de *S. aureus*, a été significativement améliorée.

Un résumé des principales propriétés des méthodes d'hybridation disponibles dans le commerce pour l'identification des agents pathogènes dans les hémocultures positives est donné dans le tableau 11.

Tableau 11 : Techniques d'hybridation pour la détection des bactéries sur hémocultures positives [71].

Test	Fabricant	Principe	Pathogène détecté	Délai de travail
PNA-FISH	AdvanDx, Woburn, MA, USA	Fluorescence basée sur l'hybridation avec une sonde d'AN peptidique	<i>S. aureus</i> , SCoN, <i>Enterococcus faecalis</i> , autres entérocoques, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> /C. <i>parapsilosis</i> , C. <i>glabrata</i> /C. <i>krusei</i> , C. <i>tropicalis</i>	1.5–3 h
AccuProbe	Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA	Sondes d'ADN chimioluminescente détectant l'ARNr	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , enterococci et <i>Streptococcus</i> groupe A et B	2.5 h

SCoN : *Staphylococcus* coagulase-négative

7.1.2. Techniques d'amplification sur hémocultures positives

Parmi les techniques à base d'amplification la PCR est la plus couramment utilisée. Différentes approches sont disponibles pour effectuer la PCR sur des hémocultures positives:

- Essais pathogène-spécifiques : Leur applicabilité en tant qu'outil diagnostique est limitée en raison de l'énorme variété d'agents pathogènes potentiellement responsables de la BSI.
- Essais à large spectre : basés sur l'utilisation d'amorces qui reconnaissent des séquences conservées des gènes chromosomiques bactériens codant pour l'ADN ribosomal.
- Essais multiplexes : détectent les gènes des pathogènes les plus fréquemment impliqués dans la BSI en une seule réaction.

7.1.2.1. Essais à large spectre

* Prove-it Sepsis (tableau 12) : Les résultats dans ce test sont lus automatiquement par un instrument et l'interprétation est effectuée par un logiciel dédié (Prove-it Advisor, Mobidiag). En plus du large spectre des pathogènes détectés, le test est capable d'identifier la présence du gène *mecA* comme une aide à l'identification de la résistance à la méthicilline chez *S. aureus* et SCoN. La sensibilité et la spécificité sont 94% et 96%, respectivement, d'après l'entreprise.

* HyPlex BloodScreen (tableau 12) : ce test est également disponible en formats pour permettre la détection de marqueurs de résistance aux antibiotiques, tels que les gènes *van* et plusieurs gènes de la β -lactamase.

* Abbott / Ibis a récemment élaborée une nouvelle stratégie pour la détection moléculaire des infections systémiques par couplage de la PCR à large spectre à l'ionisation par electrospray / spectroscopie de masse (PCR / ESI-MS). Cette technique, PLEX-ID BAC Spectrum (tableau 12), utilise des amorces conçues pour cibler des régions génomiques hautement conservées chez les bactéries ou les champignons. Un aspect important de la technique, c'est que la méthode est quantitative en raison de la présence d'un calibrant interne qui agit comme un contrôle de la PCR.

7.1.2.2. *Essais multiplex :*

Plusieurs tests basés sur la PCR multiplex ont été développés dans ces dernières années, et les trois tests suivants sont conçus pour détecter un seul agent pathogène et ses propriétés génétiques, telles que la présence des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques.

Le système StaphPlex (tableau 12) permet d'amplifier et détecter 18 gènes spécifiques à *S. Aureus* simultanément en une seule réaction et plusieurs autres déterminants d'antibiorésistance: le gène *tuf* permet l'identification et la différenciation des SCoN, le gène *nuc* est spécifique pour *S. aureus*. Les gènes suivants sont responsables de la résistance: *mecA* pour la méthicilline, *aacA* pour les aminoglycosides, *ermA* et *ermC* pour les macrolides, lincosamides et streptogramines, et *tetM* et *tetK* pour la tétracycline.

Plusieurs tests d'amplification pathogène-spécifiques sont disponibles pour différencier les SASM des SARM et, dans certains cas, les SCoN. Le premier de ces tests approuvé par la FDA aux Etats-Unis a été le StaphSR (tableau 12). Ce test est exécuté sur l'instrument SmartCycler amplifiant des séquences spécifiques de *S. aureus* et une cible spécifique à proximité du site d'insertion SCC*mec* (jonction *orfX*) chez le SARM. Il existe plusieurs publications sur la performance du test. Bien qu'une étude clinique réalisée sur 300 hémocultures ait rapporté d'excellentes performances (les sensibilités du SASM et du SARM sont de 98,9% et 100%, respectivement), d'autres ont noté la limitation de l'erreur d'identification des souches révertantes.

Il ya une seule publication sur le test sur hémoculture Xpert MRSA / SA (tableau 12). Les amorces et les sondes dans cet essai détectent les séquences du gène de la protéine A (*spa*), le SCC*mec* inséré sur le site d'insertion chromosomique de *S. aureus attB*, et le gène *mecA*. Dans cette étude, la sensibilité et spécificité de détection pour *S. aureus* était 100% et 98,6%, respectivement, et pour la détection du SARM ont été de 98,3% et 99,4%, respectivement. Ce test présente l'avantage du temps de réponse rapide (60 min) et l'accès direct, mais le prix par test et le capital initial frais sont prohibitifs pour de nombreux laboratoires. Bien que non encore approuvé par la FDA aux Etats-Unis, d'autres chercheurs ont mis au point des tests en temps réel sur l'instrument LightCycler (Roche, Mannheim, Allemagne) qui ciblent le gène *mecA* et le gène *nuc*.

D'autres techniques qui impliquent une étape d'amplification pour l'identification rapide des bactéries dans les hémocultures sont la LCR, TMA et le test bdNA

Une liste des tests d'amplification qui peuvent être appliqués aux hémocultures positives est donnée dans le tableau 12.

Tableau 12 : Techniques d'amplification pour la détection des agents pathogènes en hémocultures positives [71].

Test	Fabricant	Principe	Spectre de détection	Temps de réponse
Prove-it Sepsis	Mobidiag, Helsinki, Finlande	PCR Multiplex combinée au microarray	<i>C. perfringens</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , SCoN, <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> ss. <i>equisimilis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Kingella kingae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> et non-meningitidis, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> ss. <i>enterica</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>C. jejuni/coli</i> , Enterobacteriaceae	2,5 h
Hyplex BloodScreen	BAG, Lich, Germany	PCR multiplexe avec hybridation ultérieure sur plaque ELISA	SASM, SARM, <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , et <i>E. faecium</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	3 h
PLEX-ID BAC Spectrum	Abbott/Ibis, Abbott Park, IL, USA	Broad-range PCR à large spectre combinée avec l'ESI-MS	Théoriquement des centaines de pathogènes	8 h
StaphPlex	Qiagen, CA, USA	PCR multiplex et caractérisation des amplicons par une gamme de suspension Luminex.	<i>S. aureus</i>	5 h
Staph SR	BD GeneOhm, San Diego, CA, USA	PCR Multiplex en temps réel qui amplifie une séquence cible spécifique de <i>S. aureus</i> et une cible spécifique pour détecter la résistance à la méthicilline	<i>S. aureus</i> Différencie le SASM du SARM	2,5-3 h
Xpert MRSA/SA	Cepheid Diagnostics, Sunnyvale, CA, USA	PCR en temps réel détectant une séquence du gène de la protéine A staphylococcique et détermine la résistance à la méthicilline	<i>S. aureus</i> Différencie le SASM du SARM	1 h

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SARM, *S. aureus* résistant à la méthicilline; SASM, *S. aureus* sensible à la méthicilline ; ESI/MS : Electrospray Ionisation/Mass Spectrometry

En résumé, l'identification moléculaire des agents pathogènes après une première étape de croissance dans des milieux de culture de sang peut être atteinte plus facilement soit avec les techniques d'hybridation ou d'amplification. Bien que l'étape initiale de la culture est la plus nécessaire, la plupart de ces dosages raccourcissent sensiblement le temps de l'identification des agents pathogènes ou la détection des gènes spécifiques de la résistance.

Bien que l'identification moléculaire permette un diagnostic plus rapide des infections bactériennes les plus fréquemment trouvés par hémoculture, l'effet clinique de la réduction du temps de manipulation n'est pas encore apparent. À l'heure actuelle, l'application générale de la PCR multiplex ou de l'amplification à large spectre suivie par l'analyse des séquences de micro-organismes après croissance sur hémoculture, et les techniques moléculaires pour identifier un ou quelques agents pathogènes, ne donnent pas beaucoup de bénéfice clinique ou d'amélioration du rapport coût-efficacité par rapport aux techniques classiques d'identification, car ils sont chronophages et laborieux. Cependant, leur praticabilité devrait s'améliorer dans un proche avenir.

7.1.3. Techniques d'amplification pour les échantillons de sang total

Les techniques moléculaires appliquées directement sur des échantillons de sang total sont le meilleur choix pour l'identification rapide de(s) l'organisme(s) présent(s) dans le sang et, dans la mesure du possible, les gènes associés avec la résistance aux médicaments.

Un test bien conçu et cliniquement validé permettrait un délai de travail beaucoup plus court (2-4 jours de moins) que pour les méthodes classiques de culture. Comme pour les techniques moléculaires appliquées aux hémocultures, plusieurs stratégies de détection ont été décrites, y compris les tests pathogène-spécifiques, tests à large spectre et les tests multiplex. Un nombre de produits a reçu la marque européenne CE, même si aucun n'est actuellement approuvé par la FDA pour une utilisation aux États-Unis.

7.1.3.1. PCR pathogène-spécifique

Ces essais, bien que rarement utiles, peuvent être pris en considération lorsque la présence d'un agent pathogène à croissance difficile ou lente est suspectée. Un exemple est la détection de l'ADN de *Streptococcus pneumoniae* dans le sang total, parce que le diagnostic

basé sur la culture peut être difficile. Plusieurs études ont montré l'amélioration de la détection de *S. pneumoniae* par PCR chez les patients ayant des antécédents suggérant cette infection.

Un paramètre important dans lequel la PCR spécifique des agents pathogènes est utile c'est quand un diagnostic rapide est nécessaire parce que l'infection présente une menace vitale. L'inconvénient majeur de la PCR spécifique des agents pathogènes, c'est qu'elle n'est applicable que si une infection spécifique est suspectée et elle n'est pas utile dans le diagnostic général de patients fébriles.

7.1.3.2. PCR à large spectre

SepsiTest (tableau 13) est un nouveau test commercial qui comprend une combinaison de la détection sur sang total à la fois des gènes de l'ARNr 16S et 18S des bactéries et des champignons, respectivement, et l'analyse de la séquence de l'amplicon pour l'identification des microbes. La comparaison de ce test avec l'hémoculture a été effectuée par Wellingshausen et al, et les résultats ont montré que l'approche PCR a facilité la détection des bactériémies dans les échantillons sanguins. Cette approche permet potentiellement la détection de toute espèce bactérienne ou fongique, mais l'approche de séquençage s'étend inévitablement sur 8-12 h, ce qui rend l'utilité clinique de ce test discutable pour un diagnostic rapide.

7.1.3.3. PCR multiplex :

Cette technique est la plus prometteuse pour une utilisation de routine pour le diagnostic de la BSI dans les laboratoires de microbiologie clinique, car elle est basée sur l'amplification de l'ITS. Cette région non-codante de l'ADN ribosomale est localisée entre les gènes hautement conservés, montre un niveau élevé d'hétérogénéité entre les genres et espèces bactériennes et fongiques et permet un haut niveau d'identification en utilisant un nombre limité d'amorces légèrement dégénérées.

Parmi les tests commerciaux le seule disponible pour la détection d'ADN microbien dans les échantillons de sang total est LightCycler SeptiFast (tableau 13). Ce test est conçu pour détecter les 25 micro-organismes qui provoquent près de 90% de tous les BSI. SeptiFast

utilise la PCR en temps réel dans un mode non-quantitatif pour identifier dix bactéries au niveau de l'espèce, plusieurs autres au niveau du genre, ainsi que cinq espèces de *Candida spp* et *Aspergillus fumigatus*. Des sondes fluorescentes sont utilisées, et les profils des amplicons sont analysés par un logiciel dédié.

Des études cliniques utilisant SeptiFast sur des échantillons de patients d'une population hospitalière avec suspicion de septicémie, patients du département d'urgence avec suspicion de septicémie, patients neutropéniques fébriles, nouveau-nés, et des patients ayant une endocardite infectieuse ont été rapportés. Certains thèmes importants ont émergé de ces études. Utiliser l'hémoculture comme gold-standard de référence pour comparer des méthodes moléculaires est problématique. Comme indiqué précédemment, la culture ne parvient pas à identifier plus de 50% des cas de septicémie et susceptibles d'être causés par des bactéries ou des champignons.

Sans surprise, SeptiFast a constamment identifié plus d'échantillons de sang positifs qu'aux méthodes de culture. Ces faux positifs potentiels ont été souvent considérés cliniquement significatifs sur la base de l'examen des données cliniques, d'autres éléments d'analyse de l'infection ou gravité de la maladie et ont souvent été confirmé par la suite après l'isolement de l'agent pathogène à partir d'échantillons cliniques significatifs. Les résultats SeptiFast-positifs/culture-négatifs pourraient concevablement provenir à partir d'organismes non viables dans le sang (résultant d'un traitement antibiotique en cours), l'ADN libre vient des sites infectés ou colonisés, ou des interférences de l'antibiotique avec la culture. L'évaluation du diagnostic moléculaire des septicémies nécessite donc une méthode de référence qui repose sur plusieurs types de données, puisque l'hémoculture ne détecte pas de nombreux cas de septicémie confirmés. De l'autre côté, la culture identifie toujours certains organismes qui n'ont pas été identifiés par SeptiFast, probablement en raison du grand volume de sang analysé par la culture et de la limite inférieure de détection de SeptiFast d'environ 303 UFC / ml. En outre, certains organismes qui induisent un sepsis ne sont pas détectables par SeptiFast. Néanmoins, les résultats de SeptiFast et d'hémoculture étaient généralement en accord, ce qui suggère que SeptiFast peut ajouter de la valeur en tant que complément à l'hémoculture à la fois par l'identification des bactéries non identifiées par la

culture et par l'identification des agents pathogènes plus rapidement. Les échantillons SeptiFast-négatifs/culture-négatifs provenant des patients réputés infectés à partir d'observations cliniques ou d'autres marqueurs moléculaires pourraient résulter d'organismes non cultivables, puisque SeptiFast identifie uniquement les organismes cultivables. Le temps requis pour procéder à une analyse SeptiFast est <6 h, mais le temps du résultat finale dans un contexte clinique peut être beaucoup plus long.

Le système LOOXSTER de la préparation des échantillons (voire tableau 13) utilise une stratégie qui exploite les différences de méthylation entre l'ADN bactérien/fongique et l'ADN humain pour enrichir l'échantillon clinique avec de l'ADN pathogène par chromatographie d'affinité. Ceci est suivi d'une amplification du gène de l'ADNr 16S utilisant le test VYOO. Les produits amplifiés sont ensuite passés sur un gel d'agarose, l'identification étant possible grâce à l'évaluation du profil électrophorétique spécifique de l'agent pathogène. Comme environ 90% de l'ADN eucaryote est retiré, la perte de signal sur l'amplification d'ADN humain est diminuée de manière significative, avec une sensibilité élevée au moins 10 fois comparée à des échantillons non soumis à l'enrichissement d'ADN pathogène. Des études précoces avec un petit nombre d'échantillons cliniques humains ont montré des résultats prometteurs.

Tableau 13 : résumé des principales propriétés des techniques d'amplification sur sang total [71].

Test	Fabricant	Principe	Pathogène détecté	Temps de réponse	Limite de détection
SepsiTest	Molzyme, Bremen, Allemagne	PCR à large spectre suivi par le séquençage	>300 espèce	8-12 h	20–40 CFU/ml pour <i>S. aureus</i>
SeptiFast	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA	PCR multiplex en temps réel utilisant une sonde type (FRET) pour la détection et l'identification des agents bactériens par séquençage ITS	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , SCoN, <i>Streptococcus spp.</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	6 h	3-30 CFU/ml
VYOO/ LOOXSTER	SIRS-Lab, Jena, Allemagne	PCR multiplex avec électrophorèse sur gel	<i>S. aureus</i> , SCoN, <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. agalactiae</i> , plusieurs streptocoques du groupe viridans, <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Prevotella buccae</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>A. fumigatus</i>	8 h	3-10 CFU/ml

ITS, internal transcribed spacer;

8. Endocardites infectieuses [72]

L'endocardite infectieuse (EI) est une maladie relativement peu fréquente. Malgré une amélioration de la prise en charge et les recommandations d'antibioprophylaxie pour les gestes à risque, les études les plus récentes ont montré que cette incidence n'a pas diminué au cours de ces dernières années. Ce paradoxe est expliqué par l'évolution des facteurs de risque d'EI tel les dégénérescences sclérotiques des valves cardiaques, expliquant la fréquence de survenue d'EI dans la tranche d'âge de 70–80 ans, l'augmentation de la pose de prothèses valvulaires cardiaques justifiée par les dégénérescences valvulaires, la toxicomanie intraveineuse et l'augmentation des EI iatrogènes et nosocomiales.

Si en théorie le diagnostic d'EI repose sur l'association d'une bactériémie persistante et de lésions histologiques des valves cardiaques, des critères plus cliniques, échographiques et microbiologiques ont été proposés. Ces critères établis par la Duke University ont permis d'améliorer la sensibilité du diagnostic d'EI sans perdre en spécificité et sont maintenant largement utilisés dans les études épidémiologiques. La mise en évidence du germe causal reste une des pierres angulaires du diagnostic et de la thérapeutique des EI. De nombreux « outils » sont maintenant disponibles pour en faire le diagnostic, intégrant les techniques de biologie moléculaire et des recommandations microbiologiques et anatomopathologiques ont été faites. Elles concernent les hémocultures, les sérologies, la mise en culture du sang sur culture cellulaire, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire sur le sérum, et les techniques microbiologiques, moléculaires et anatomopathologiques d'études des valves et prothèses cardiaques.

8.1. Techniques moléculaires utilisées au diagnostic des endocardites :

La plupart des études moléculaires publiées à ce jour pour détecter et identifier l'agent causal d'une endocardite sont basées sur l'amplification de l'ADNr 16S (figure 28). Dans certains cas, la séquence du fragment d'ADNr 16S amplifié n'est pas suffisamment discriminante pour permettre l'identification d'espèce. *Streptococcus mitis*, *S. oralis* et *S. pneumoniae* ne sont pas identifiables sur la base des séquences ADN 16S. D'autres gènes, plus discriminants, peuvent alors être amplifiés et séquencés tels que *sodA* pour l'identification des streptocoques et des SCoN, *rpoB* pour les entérobactéries. Par ailleurs, l'amplification suivie du séquençage d'une deuxième cible permet de confirmer le résultat de la PCR ADN 16S et de se soustraire au mieux du problème des contaminations extérieures.

Le diagnostic moléculaire basé sur l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces universelles est réalisé essentiellement sur des prélèvements tissulaires cardiaques (parfois sur des emboles). Il permet d'améliorer la prise en charge du patient dans à peu près 20 % des cas. Si l'on ne considère que les endocardites à hémocultures négatives, les techniques de biologie moléculaire permettent de trouver l'agent étiologique dans environ un tiers des cas. Nombreuses sont les études qui montrent l'utilité de ces techniques dans la mise en évidence de pathogènes de culture difficile, parfois très rares comme *Bartonella*

vinsonii, *Cardiobacterium valvarum* et *Corynebacterium striatum*. Précisons également que ces techniques peuvent aider à déterminer l'identification d'une bactérie isolée d'une hémoculture lorsque les caractères phénotypiques ne sont pas suffisants.

Enfin, de rares articles rapportent l'identification de l'agent étiologique de l'endocardite par amplification universelle de l'ADNr 16S directement à partir du sérum, comme décrit par Gastelis et al. La bactérie identifiée, *Cardiobacterium hominis*, avait toutefois été obtenue en culture après plusieurs jours d'incubation. De nos jours, pour des raisons techniques et d'interprétation, la PCR universelle est rarement réalisée sur des prélèvements de sang. En revanche, certains gènes peuvent constituer des cibles pour la détection spécifique de certaines espèces bactériennes. L'obtention d'un amplicon signe alors la présence de l'espèce recherchée. Des cibles telles que les gènes codant pour la riboflavine-synthétase, pour des protéines de membranes, pour la protéine de choc thermique Hsp65, peuvent être utilisées pour révéler la présence de *Bartonella spp*, *C. burnetii* et *T. whipplei*. Ces PCR spécifiques, dont la plupart ont été développées selon des techniques en temps réel peuvent être réalisées sur le sérum (éventuellement le sang) et ne nécessitent donc pas que le patient soit opéré. Toutefois, la sensibilité de détection est extrêmement variable en fonction du germe et de la cible d'amplification recherchés, de la modification de la technique de PCR utilisée et de la phase de la maladie.

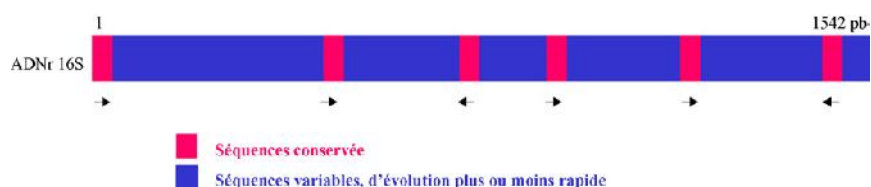


Figure 28 : Représentation schématique des alternances de séquences conservées et variables dans les gènes codant pour l'ARN 16S. Les amorces universelles, permettant d'amplifier les gènes codant pour l'ARN 16S de quasiment toutes les bactéries, doivent être localisées dans les régions conservées (indiquées en rouge). Le séquençage du fragment amplifié (indiqué en bleu) est spécifique d'espèce, le plus souvent [72].

8.2.Limites des techniques de biologie moléculaire

Le diagnostic moléculaire sur prélèvements cliniques, en particulier celui basé sur l'amplification de l'ADNr 16S, présente un inconvénient qui est la sensibilité de la technique liée en partie au nombre de copies de la cible à amplifier (ADNr 16S dans le cas présent) par bactérie. Plus le nombre est grand, plus la technique sera sensible (Tableau 14). D'autres notions sont également à prendre en compte dans l'interprétation des résultats comme la persistance de l'ADN dans un prélèvement. La présence d'un ADN bactérien dans un prélèvement ne signifie pas que la bactérie soit viable. Branger et al ont montré que l'ADN de *S. pneumoniae* pouvait persister sept ans dans une valve sans évidence d'infection.

Tableau 14 : Nombre de copies, par chromosome, d'opéron codant pour les ARN ribosomaux de quelques espèces bactériennes [72].

Espèce bactérienne	Nombre de copies d'opéron d'ADNr
<i>Borrelia burgdorferi</i>	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
<i>Rickettsia conorii</i>	1
<i>Helicobacter pylori</i>	2
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2
<i>Treponema pallidum</i>	2
<i>Brucella melitensis</i> (chr 1)	2
<i>Brucella melitensis</i> (chr 2)	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	6
<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Salmonella Typhimurium</i>	7
<i>Bacillus subtilis</i>	10
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	11

8.3.Quand demander une analyse moléculaire pour le diagnostic

De par leur coût global, les techniques moléculaires utilisées pour le diagnostic des EI (en particulier la PCR ADNr 16S) ne peuvent être réalisées systématiquement, mais essentiellement lorsque l'agent causal n'a pu être mis en évidence par les techniques de bactériologie standard. Elles sont donc principalement réservées au diagnostic des EI à

hémocultures négatives. Dans certains cas, associées aux résultats d'anatomopathologie, ces techniques peuvent aider à exclure un diagnostic d'EI et faire suspendre un traitement antibiotique. Il faut rappeler qu'à ce jour, la PCR ADNr 16S ne peut être réalisée que sur des prélèvements chirurgicaux (emboles, tissus cardiaques tels que les valves, les végétations et les tissus prothétiques) ; elle ne peut donc pas être considérée comme une aide au diagnostic précoce d'endocardite.

9. Autres domaines d'application des techniques moléculaires :

9.1 Antibiorésistance :

9.1.1. Intérêt de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques [73]

La détection phénotypique des résistances est basée sur une interprétation qui est une fonction de la concentration critique, elle montre un certain nombre de limites avec l'émergence de bactéries multirésistantes où la détection de certains mécanismes est difficile (lente ou ambiguë). De ce fait, le développement et l'extension des méthodes moléculaires dans le domaine du diagnostic font qu'une approche génotypique des résistances peut maintenant être envisagée. Cette approche génotypique est motivée par trois raisons, qui dans l'immédiat, sont encore d'inégale valeur.

- Tout d'abord, les méthodes génétiques peuvent être utiles pour arbitrer le difficile problème de la signification des catégories intermédiaires qui représentent bien entendu un ensemble hétérogène dépendant la plupart du temps d'un niveau d'expression. Dans ce domaine, l'exemple le plus caractéristique, est le *S. aureus* résistant à la méthicilline, l'utilisation d'une méthode génotypique pour détecter plus facilement le gène *mecA*, à la fois présent chez les staphylocoques à coagulase négative (SCoN) et *S. aureus*. Une seule réaction de PCR multiplex permet d'identifier ce gène, elle peut s'appliquer également directement aux échantillons biologiques. Cette approche est en concurrence avec d'autres tests au latex par exemple pour évaluer cette résistance, mais elle reste très intéressante dans les cas où la réponse justement est ambiguë, comme pour les SCoN.

- Le deuxième motif, et sans doute le plus important, est de permettre de détecter la résistance portée par des gènes ou les mutations dans des micro-organismes directement à partir d'échantillons cliniques et chez des micro-organismes à croissance lente. Le cas le plus

intéressant est celui de *M. tuberculosis*. La détection, notamment, de la résistance et des mutations dans le gène *rpoB* associé avec la résistance à la rifampicine est très importante car de telles mutations indiquent que la souche est au minimum résistante à la rifampicine mais qu'elle est susceptible de l'être également à de nombreux autres antibiotiques. Cette pratique devrait se développer.

- En troisième lieu, les méthodes génotypiques peuvent se montrer beaucoup plus adaptées que les antibiogrammes pour suivre la diffusion épidémique de gènes particuliers de résistance dans un hôpital ou dans une collectivité. Par exemple, la diffusion du gène *van A*, gène de résistance à la vancomycine chez les entérocoques est tout à fait intéressante à réaliser grâce à une PCR multiplex qui permet d'ailleurs en une seule réaction d'évaluer les gènes *van A*, *van B* et *van C*. Cette technique permettant l'identification précise et rapide de la résistance mais permet également de mettre en œuvre des mesures de prévention. La méthode génotypique permet de faire la différenciation entre les organismes qui contiennent le gène *van A* et ceux où le gène *van B* est déréprimé, démarche que l'antibiogramme ne peut pas faire.

9.1.2.Exemples d'applications :

9.1.2.1. Détection génotypique des résistances des staphylocoques [10, 26, 74, 75]

Dans deux études portant sur le portage nasal de SARM, utilisant une technique de PCR en temps réel sur le gène *mecA*, les résultats sont obtenus en moins d'une heure, la sensibilité variait entre 92 et 100 %, avec une spécificité entre 94 et 98 % en comparaison avec la culture conventionnelle.

La PCR peut être pratiquée également directement à partir de certains prélèvements, comme les hémocultures. Dans ce cas, afin de s'affranchir de l'effet des substances inhibitrices de l'amplification présentes dans le sang, il convient d'amplifier dans le même temps une autre portion du génome du staphylocoque (PCR multiplex) qui servira de témoin d'amplification. Comme le gène de la gyrase (*gyrA*), présent chez tous les staphylocoques ou celui de la thermonucléase (*nut*), spécifique de *S. aureus* (et de staphylocoques plus rares comme *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*), ce gène permettant en outre d'orienter le diagnostic d'espèce.

Un modèle à 48 canaux, l'Infinity 48 de Cepheid, permettant la détection des SARM en 66 minutes est présenté avec un bras robotisé permettant le transfert des cartouches réactionnelles des stations de chargement vers celles de process, puis vers la station déchet. Cet appareil est disponible 24 h/24 pour des tests en urgence.

Des trousse pour quantifier le SARM en PCR en temps réel apparaissent (kit Roche Light Cycler 2.0 en août 2009 ; Nuclisens Easy Q MRSA de Biomérieux).

D'autres techniques sont aussi utilisées dans ce domaine tel que la technique Cycling probe technology développée par (ID Biomedical Corp, Vancouver, British Columbia, Canada) et la technologie des microarrays nommée staphychip conçue par (AAT, Eppendorf Array Technologies, Belgique), cette technique détecte 15 espèce du staphylocoque incluant le SARM, on trouve aussi les techniques d'hybridation, mais la PCR reste la technique de référence.

9.1.2.2. *Mycobacterium tuberculosis* [24]

On connaît maintenant la plupart des mutations responsables de la résistance, elles sont en général localisées sur une région limitée du gène. Le premier kit commercialisé pour la détection de la résistance à la rifampicine fut INNO-LIPA Rif.TB, le principe repose sur l'amplification de cette région du gène, une biotinylation de l'amplicon, et une hybridation avec des sondes immobilisées sur un support de nitrocellulose. La révélation des hybridomes se fait par colorimétrie (biotine et streptavidine couplée à la phosphatase alcaline). Cinq sondes hybrident avec les séquences de la souche sauvage les quatre autres avec les principales mutations. Les premières évaluations du test à partir des souches ont montré une sensibilité de 97 % par rapport aux tests phénotypiques. Actuellement, il existe deux autres kits : (I) GenoType MTBDRplus (figure) qui permet la détection des mutations sur le gène *rpoB* (tableau 15) pour la rifampicine et les gènes *katG* et *inhA* pour les résistances à haut et bas niveau à l'isoniazide (figure 29), (II) GenoType MTBDRsl qui permet lui, de détecter les mutations *gyrA* pour les fluoroquinolones, *rrs* pour les aminoglycosides et *embB* pour l'éthambutol. Le principe est le même que pour INNOLIPA. Pour Hillemann, les sensibilités et spécificités de ces tests réalisés à partir des souches sont respectivement de 98,7 % pour la rifampicine, 92% pour l'isoniazide, 90,6 % pour les fluoroquinolones, 75 % pour l'amikacine,

84,8% pour la capréomycine et 69,2 % pour l'éthambutol. La spécificité est de 100 % pour tous, excepté pour l'éthambutol 99,1 %.

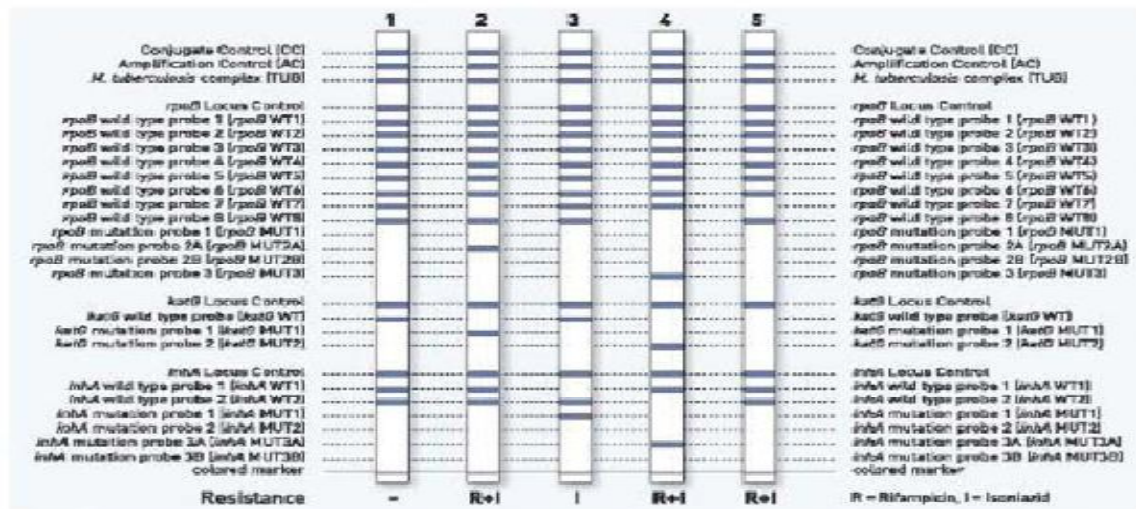


Figure 29 : Genotype® MTBDRplus : détection des résistances de *M. tuberculosis* à la rifampicine et à l'isoniazide [24].

Tous ces tests sont réalisables à partir des cultures mais aussi des échantillons cliniques à condition qu'ils soient positifs à l'examen direct. Pour INNO-LIPA, Les kits MTBDRplus et MTBDRsl peuvent être utilisés aussi directement sur l'échantillon. Pour Hillemann, dans les échantillons, les taux de détection de résistance à la rifampicine et à l'isoniazide sont respectivement de 96,8 % et 90,2 %. En ce qui concerne les antibiotiques de 2ème génération, il détecte une résistance aux fluoroquinolones pour 8 souches sur 9, une résistance à l'amikacine pour 6 souches sur 8, et seulement pour 10 souches parmi les 26 résistantes à l'éthambutol. Enfin, le séquençage du gène permet lui de mieux détecter les substitutions de nucléotides, et ou acides aminés, les délétions et insertions, les nouvelles mutations. Ces nouveaux tests qui permettent une détection très rapide des souches multirésistantes et ultrarésistantes trouvent leurs indications chez les malades en échec de traitement ou en rechute, chez les malades originaires ou arrivant de pays de forte prévalence de multirésistance, ceci afin d'adapter très rapidement le traitement mais aussi de limiter rapidement la transmission des souches résistantes. Cependant « on ne trouve que ce que l'on cherche » et toutes les mutations ne sont pas connues (95 % pour la rifampicine et les

fluoroquinolones, 85 à 90 % pour l'isoniazide, 50 à 70% pour l'éthambutol), il existe donc des faux négatifs et un résultat de type « sauvage » par ces tests doit être obligatoirement confirmé par la méthode phénotypique des proportions.

9.1.2.3. *Enterococcus faecium* [76, 77, 78]

L'étude de Dekeyser et al, en 2010 a montré sur 565 prélèvements l'intérêt de rechercher les gènes vanA et vanB (tableau 16) par PCR en temps réel en système clos (Xpert vanA/vanB Cepheid®) pour améliorer le délai de réponse, la prise en charge des patients et le contrôle de la transmission croisée, les résultats sont obtenus en une heure dont 2 min de préparation pour quatre échantillons testés versus 72 heures pour la culture.

Une autre étude comparative de surcouf et al a conclu que la méthode directe sous estime le portage d'entérocoques résistants aux glycopeptides. Alors que la technique moléculaire associant amplification multiplex et hybridation (Génotype1 Enterococcus, Hain Lifescience) s'avère performante et riche en informations à caractère épidémiologique. Son coût et son excellente praticabilité lui confèrent un rôle d'expertise en cas de découverte d'un portage d'entérocoques résistants aux glycopeptides à haut niveau de résistance ou d'une infection à entérocoques résistants aux glycopeptides dans un service à risque.

Tableau 15: Gènes de résistance utiles pour la détection de la résistance aux antibiotiques par test génotypique [78].

Bactéries	Gènes cibles	Antibiotiques
<i>Staphylococcus aureus</i> et staphylocoques à coagulase négative résistants à la méthicilline	mecA	Méthicilline
Entérocoques	ileS-2	Mupirocine
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	vanA, vanB, vanC	Vancomycine
	pbp1A	Pénicilline
	ermB, mefE	Macrolides
Entérobactéries (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>)	BLSE	Céphalosporines et pénicillines à spectre élargi
	bla Rob	Ampicilline
<i>Haemophilus influenzae</i>	bla Tem	Ampicilline
<i>E. coli</i>	katG	Isoniazide
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	inhA	
	ahpC	
	rpoB	Rifampicine
	embB	Ethambutol
	rrs, rpsL	Streptomycine
	pncA	Pyrazinamide
	gyrA, gyrB	Fluoroquinolones

9.2 Epidémiologie :

9.2.1. Analyse microbiologique et typage de l'agent responsable [79]

L'approche microbiologique d'une investigation d'épidémie, avec le développement de la microbiologie moléculaire, a beaucoup progressé ces dernières années. Elle permet en particulier d'affirmer la nature clonale des agents infectieux pouvant être impliqués et de prendre les mesures de prévention nécessaires. En cas d'épidémie clonale, ces techniques de typage permettent de définir les cas de manière plus spécifique en éliminant du groupe de cas ceux qui ne répondent pas au clone épidémique. Dans certaines situations, les épidémies ne peuvent être identifiées sans recourir aux techniques de typage en routine, comme pour la listériose, les salmonelloses ou certaines infections bactériennes nosocomiales.

Le typage moléculaire occupe maintenant une place importante dans la comparaison de l'agent infectieux isolé chez les malades, dans l'environnement, le véhicule, la source ou le réservoir de l'épidémie. Il apporte alors des éléments de preuve importants en permettant d'affirmer que l'agent retrouvé chez les malades n'est pas différentiable avec les techniques moléculaires les plus discriminantes de l'agent retrouvé au niveau de la source, du véhicule ou du réservoir de l'épidémie, comme dans les épidémies d'origine alimentaire, de légionellose ou ayant pour source un porteur chronique asymptomatique. Cependant, le fait d'affirmer l'identité de l'agent au niveau de la source et des malades ne permet pas, nécessairement d'identifier le mode de transmission, qui relève du domaine de l'épidémiologie.

Trois grands groupes de méthodes sont utilisés, celles basées sur l'hydrolyse de l'ADN par des enzymes de restriction, celles basées sur la PCR et celles basées sur le séquençage d'un ou plusieurs locus dans le génome bactérien.

9.2.2. Techniques de typage

9.2.2.1. Typage basé sur les empreintes génétiques [83]

➤ Les profils plasmidiques (plasmid profils) ne sont utiles que lorsque les souches contiennent des plasmides, qui peuvent être instables, et possèdent un pouvoir discriminant limité. L'ADN chromosomique ou plasmidique peut être examiné ou ciblé au niveau des séquences spécifiques après amplification par PCR (comme l'analyse du polymorphisme des

fragments de restriction ou RFLP (restriction fragment length polymorphism) (figure 30) et l'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins ou SSCP (Single-Strand Conformation polymorphism) (figure 31)).

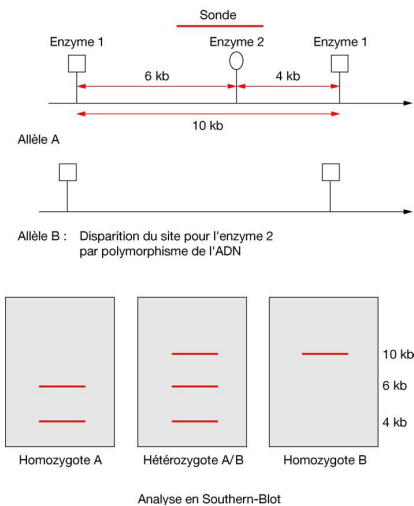


Figure 30 Principe de la RFLP (restriction fragment length polymorphism) [80].

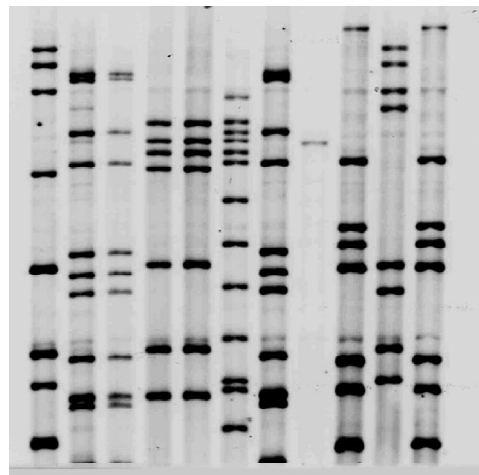


Figure 31 : Exemple de polymorphisme des fragments de restriction sondés pour l'élément IS6110.
Les colonnes 4 et 5 ont le même modèle, comme le font le 9 et 11 [81].

➤ L'analyse des fragments de restriction par endonucléase (Restriction Endonuclease Analysis=REA) - La séquence d'ADN peut être transformée en «empreintes génétique=fingerprint» en la coupant avec des endonucléases de restriction (qui reconnaissent des séquences nucléotidiques spécifiques) et en séparant ensuite les fragments résultants par électrophorèse. Des sondes d'ADN peuvent également être utilisées pour identifier les bandes contenant les séquences complémentaires d'ADN cible.

➤ Électrophorèse en champ pulsé (ECP) ou Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (figure 32) - certaines endonucléases de restriction coupent les chromosomes bactériens au niveau des fragments d'ADN qui ne peuvent être séparés par électrophorèse conventionnelle. Cette technique est plus difficile à réaliser, mais les empreintes d'ADN obtenues sont généralement moins complexes que celles obtenues après digestion par endonucléase de restriction standard (car les fragments d'ADN produits sont moins nombreux mais plus longs). La PFGE montre une capacité discriminatoire élevée pour toutes les bactéries mais surtout pour *Escherichia coli*, entérocoques résistants à la vancomycine, *S. aureus*, espèces d'*Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, et *M. avium*. Bien que la PFGE soit actuellement reconnue comme la technique gold-standard du typage moléculaire, certains isolats bactériens sont devenus non typables en raison de l'instabilité d'ADN (par exemple, certaines souches de *Clostridium difficile*). Récemment, des systèmes ont émergé pour faciliter l'échange d'empreintes d'ADN par voie électronique via l'Internet. ENEMTI est un réseau de la Fondation européenne des laboratoires de recherche scientifique qui vise à normaliser les méthodes et les protocoles d'échange de données pour la comparaison des données d'empreintes génétiques basée sur Internet.

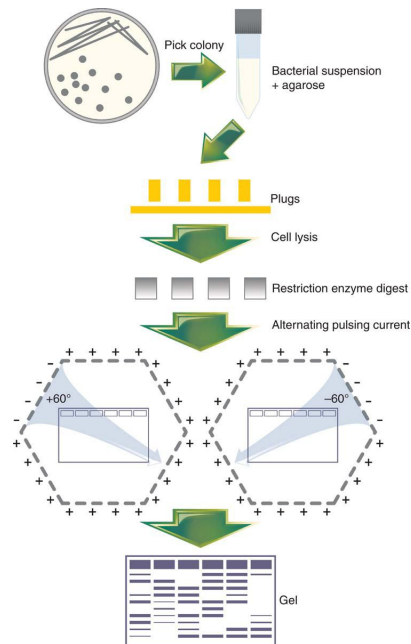


Figure 32 : Électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Les fragments d'ADN de plus de 20 kb ne sont pas en mesure d'être résolus sur les plateformes d'électrophorèse conventionnelle. La PFGE utilise en alternance des champs électriques pour séparer les grands fragments d'ADN dans un gel d'agarose. Ceci est accompli par l'action d'impulsions des courants électriques à partir de paires d'électrodes spatialement distinctes permettant à l'ADN de se réorienter et se déplacer à des vitesses différentes à travers le gel. [82]

➤ Le ribotypage est une technique de typage puissante qui utilise des sondes d'ARNr pour détecter leurs séquences complémentaires dans le produit de digestion à l'endonucléase de restriction de l'ADN chromosomique.

9.2.2.2. Typage basé sur la PCR [83]

➤ Random amplified polymorphic DNA (RAPD) / arbitrary primed PCR amorcée (AP-PCR) - il existe des différences subtiles entre les techniques RAPD et AP-PCR, mais les termes sont souvent utilisés indifféremment. Ces méthodes permettent la détection des polymorphismes génétiques d'une souche bactérienne sans connaissance préalable de la séquence nucléotidique cible. A faibles conditions de température, les amorces dont les séquences ne sont pas dirigées contre toute séquence spécifique dans le génome s'hybrident sur des sites au hasard le long de l'ADN bactérien. Donnant ainsi des fragments du matériel amplifié «empreintes» qui diffèrent selon le degré de parenté des souches étudiées. La

spécificité du processus d'amplification dépend des interactions amorce-cible, et les variations de ces composants peuvent affecter la reproductibilité du système.

➤ Rep-PCR est similaire à RAPD / AP-PCR, mais elle n'est pas aléatoire, car les amorces sont basées sur des séquences spécifiques qui apparaissent à plusieurs reprises tout au long du génome de l'organisme étudié.

➤ Ribospacer PCR exploite les différences souche-spécifiques dans les régions d'espacement de l'ARN ribosomal 16S-23S chez les bactéries. Le système est basé sur l'amplification spécifique dirigée par une amorce (primer directed) et est donc plus stable et reproductible que RAPD / AP-PCR. En général, peu de fragments d'ADN sont produites par profile, et les résultats sont donc légèrement plus faciles à interpréter que les profils obtenus par RAPD / AP-PCR et certaines rep-PCR.

➤ Polymorphisme de la longueur des fragments d'amplification ou Amplified fragment length polymorphism (AFLP) - combine la REA et les techniques de PCR. L'ADN bactérien est initialement coupé en morceaux à l'aide des endonucléases de restriction. Des oligonucléotides adaptateurs sont ligaturés sur ces fragments de digestion afin de faciliter leur amplification par PCR. Les Fragments d'ADN sont résolues en utilisant une électrophorèse sur gel, produisant une empreinte basée sur l'organisation des sites de restriction le long du chromosome bactérien. La technique amplified fragment length polymorphism exploite le pouvoir discriminatoire du REA, tout en produisant des empreintes d'ADN plus claires et plus facilement interprétables. En utilisant les produits de digestion d'ADN de plus d'une enzyme augmente le pouvoir de discrimination de cette technique.

➤ Variable number tandem repeat (VNTR) / Mycobactrial interspected repetitiv units (MIRU) - Le génome de *M. tuberculosis* contient 41 loci génétiques avec des séquences d'ADN répétées. Le nombre de répétitions par locus varie entre les souches, et cette variabilité est la base du typage de *M. tuberculosis*. La VNTR est associée à des séquences répétées en tandem dans six locis génétiques qui ont révélé une grande variabilité et réalisent donc la meilleure discrimination de souche. Plus récemment, la technique MIRU (figure 33) a exploité cette variabilité dans douze locis, et une combinaison de la VNTR et MIRU est utilisée pour la classification des souches en épidémiologie de *M. tuberculosis*.

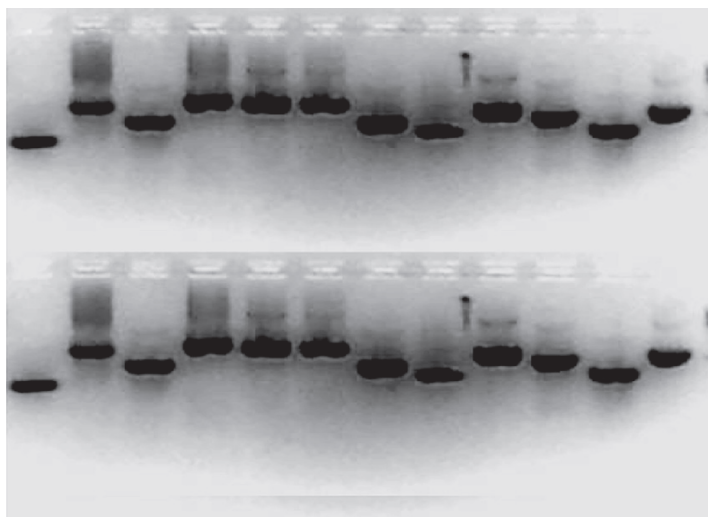


Figure 33 : Mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) [81].

9.2.2.3. *Typage basé sur la séquence [83]*

Single-nucléotide polymorphism (SNP) et le multi-locus séquence typing (MLST) - analysent l'information génétique directement par séquençage nucléotidique plutôt qu'indirectement en utilisant la mobilité électrophorétique de fragments d'ADN. Les SNP sont des variations de séquence d'ADN qui se produisent quand un seul nucléotide dans la séquence du génome pathogène est changé. Un système de classification bactérienne très discriminatoire est produit par le séquençage et la comparaison d'un locus génétique (dans l'analyse par SNP) ou plusieurs locis différents (en multi-locus séquence typing). Ces techniques produisent des données qui sont à la fois portables et sans ambiguïté et peuvent donc être échangées via Internet. Ces bases de données virtuelles font leur apparition pour les agents pathogènes, incluant *Staphylococcus aureus*, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Candida albicans* et *C. glabrata*. Il est à espérer que cette approche de «multi-utilisateurs» puisse accroître la collaboration et révolutionne le génotypage et de l'épidémiologie mondiale d'importants agents pathogènes infectieux.

9.3 Urgences diagnostiques [54]

À ce jour, dans un laboratoire de biologie moléculaire, en conditions optimisées, un résultat peut être rendu en trois à quatre heures (depuis la préparation de l'échantillon jusqu'au résultat final). La biologie moléculaire d'urgence est encore en phase de développement. En dehors du cas particulier du bioterrorisme, elle est moins étudiée. L'apport de la PCR en temps réel et le développement d'automates d'extraction ont permis d'accélérer les étapes de préparation puis d'amplification et de détection des AN. Les thermocycleurs disponibles sur le marché (www.biocompare.com) sont de plus en plus rapides. Certaines machines permettent d'obtenir des résultats en cinq minutes, le record actuel étant l'amplification d'un fragment de 85 pb en 78 secondes (30 cycles d'amplification). Un fragment de 2331 pb a pu être amplifié en deux minutes par PCR en temps réel. Des auteurs ont déjà rapporté leur expérience sur ce sujet avec des résultats obtenus en moins de deux heures, traitement de l'échantillon inclus. Outre la PCR en temps réel qui permet d'obtenir un résultat rapidement, d'autres techniques de biologie moléculaire sont en développement. Parmi les autres techniques rapides, on peut citer un certain nombre de techniques d'amplification isotherme qui présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'appareils coûteux et d'être rapides comme l'amplification par ramification (RAM, ramification amplification), la RCA, la SDA, et l'amplification dépendante de l'hélicase. Des systèmes de détection de plus en plus rapides et à haut débit sont aussi développés. Avec les progrès de l'automatisation et des nanotechnologies, la biologie d'urgence peut devenir rapidement une réalité. Des techniques sans amplification de la cible sont aussi en développement. Il s'agit en général de techniques d'amplification de signal très puissantes. Par exemple, l'hybridation de sondes marquées à l'aide de fluorophores puissants et couplées à des systèmes de détection laser ultrasensibles permet la détection spécifique de bactéries. Ces systèmes (et d'autres) sans amplification de cibles sont rapides (30-40 mn) et utilisent des machines compactes et légères. On peut ainsi penser que dans un avenir proche, la détection ultrarapide d'agents pathogènes y compris sur un terrain éloigné sera possible. En dehors du contexte de bioterrorisme déjà évoqué, la biologie moléculaire appliquée à la recherche d'agents pathogènes en urgence en milieu hospitalier sera une réalité probablement dans quelques années.

➤ Quels agents détecter en urgence (en dehors du bioterrorisme) ?

- Lorsque la vie du patient est en jeu et nécessite un traitement adapté rapidement. C'est le cas de méningite à méningocoque (avec éventuellement détection multiplex d'entérovirus) ou d'infections par le streptocoque B ;
- Lorsqu'une décision de traitement doit être prise rapidement (infection à *Mycobacterium tuberculosis*, entérocoques résistants à la vancomycine, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) ;
- Lorsqu'un patient est suspect d'une infection sexuellement transmissible et a peu de chances de revenir en consultation.

9.4 Bioterrorisme [85]

Le bioterrorisme est l'utilisation ou la menace d'utiliser intentionnellement des virus, des bactéries, des champignons, des parasites ou des toxines comme une arme, en vue de rendre malade ou de tuer des êtres humains, mais aussi entraîner des dommages économiques et la peur au sein de la population.

La lutte contre le bioterrorisme est devenue une priorité pour de nombreux pays suite à l'épisode des courriers piégés à l'anthrax aux États-Unis en 2001. La détection des bactéries dans un contexte bioterroriste est une composante importante de cette lutte. En effet, une détection précoce du (ou des) agent(s) utilisé(s) permet de mettre en œuvre rapidement un traitement approprié et de limiter la transmission de la maladie. Les bactéries constituent une part importante des microorganismes présentant une menace et les techniques utilisées pour leurs détections sont en perpétuels développements.

En général, les techniques de détection basées sur les AN sont plus sensibles que les systèmes de détections utilisant des anticorps. Par ailleurs, le système de détection « idéal » doit pouvoir identifier plusieurs agents dans un même prélèvement.

9.4.1. Classification des agents potentiels du bioterrorisme (classes A, B et C)

Le CDC a classé les agents du bioterrorisme en trois catégories (tableau 16), en fonction de leurs risques infectieux, leurs virulences, leurs perceptions par le public, leurs impacts, le coût et la sophistication des moyens mis en œuvre pour lutter contre ces agents. En Europe, les agents considérés comme à risque sont sensiblement les mêmes (<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/bioterror/404801.pdf>).

La catégorie A regroupe les microorganismes les plus dangereux. Ils sont facilement disséminés et pour certains transmissibles entre patients. Ils entraînent une mortalité élevée et ont un impact potentiel important en termes de santé publique. De plus, ils pourraient être responsables de troubles de l'ordre public et de réactions de panique nécessitant des actions spécifiques et une capacité de réaction adaptée.

La catégorie B concerne les agents plus difficiles à disséminer, responsables d'une morbidité modérée et d'une mortalité faible. Ils nécessitent des capacités de diagnostic et de surveillance spécifiques.

La catégorie C, la troisième en terme de risque, concerne les pathogènes émergents qui pourraient faire l'objet d'une dissémination de masse dans le futur en raison de leur disponibilité, leur facilité de production et de dissémination, ainsi que de leur fort taux de morbidité et de mortalité potentielle et de leur impact majeur en termes de santé publique

Tableau 16 : Liste du CDC des agents du bioterrorisme catégorie A, B et C [84].

Catégorie A	Catégorie B	Catégorie C
<i>Variola major</i> (variole) <i>Bacillus anthracis</i> (anthrax) <i>Yersinia pestis</i> (peste) Toxine de <i>Clostridium botulinum</i> (botulisme) <i>Francisella tularensis</i> (tularémie) Virus à ARN qui causent la fièvre hémorragique (fièvre hémorragique virale)	<i>Brucella</i> spp. (brucellose) <i>Burkholderia mallei</i> (morve) <i>Burkholderia pseudomallei</i> (mélioïdose) <i>Chlamydia psittaci</i> (psittacose) <i>Coxiella burnetii</i> (fièvre Q) <i>Ricinus communis</i> (ricin) <i>Clostridium perfringens</i> (toxine epsilon) <i>Rickettsia prowazekii</i> (typhus épidémique) Enterotoxine B staphylococcique Virus responsables d'encéphalite (alphavirus) Menace sur la sécurité alimentaire (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , et <i>Escherichia coli</i>) Agents de sécurité de l'eau (<i>Vibrio cholerae</i>)	Virus de l'influenza A et B Nipah virus Hantavirus Rabies Tuberculose résistante aux antibiotiques Fièvre jaune <i>Rickettsia conorii</i> Encéphalites transmises par les tiques Fièvres virales hémorragiques transmises par les tiques

9.4.2. Les différents outils moléculaires de détection des bactéries potentielles du bioterrorisme :

Les risques sont principalement liés à la dispersion d'agents pathogènes dans l'air et à la contamination d'eau potable ou de la chaîne alimentaire. La détection des bactéries susceptibles d'être utilisées dans le bioterrorisme peut s'effectuer à partir d'échantillons environnementaux (sol, air et eau) ou d'échantillons cliniques (sang, sécrétions pulmonaires, crachats. . .). Le clinicien doit disposer d'outils pour une détection rapide, sensible, spécifique et balayer un large spectre d'agents pathogènes afin de mettre rapidement en route une réponse appropriée. Mais il n'existe pas à l'heure actuelle de système « parfait » remplissant l'ensemble de ces conditions.

Pour *B. anthracis*, les tests PCR sont basés sur la mise en évidence des facteurs de virulence spécifiques (toxines et capsule). Un test multiplexé permettant la détection simultanée des trois gènes *pagA*, *cya*, *lef* (toxines), du gène *capC* (capsule) et d'un marqueur chromosomique (Ba813) a été développé, permettant d'identifier un isolat virulent, atténué ou avirulent. D'autres marqueurs chromosomiques spécifiques de *B. anthracis* ont depuis été décrits : SG-850 et *rpoB*.

Pour *Y. pestis*, plusieurs techniques de PCR ont été développées avec succès ciblant principalement les gènes *pla* et *cafI* pour une détection rapide et spécifique. Des tests de PCR multiplexée et PCR suicide ont été aussi développés avec succès.

Pour *F. tularensis*, la PCR sur les gènes codant pour l'ARN 16S permet de détecter cette bactérie, notamment dans les ulcères cutanés de patients. D'autres gènes comme *fopA* et le gène codant pour la 17-kDa outer membrane lipoprotein ont aussi été utilisés pour la détection de cet agent dans le sang ou d'autres échantillons cliniques et environnementaux.

Pour *Brucella*, à partir du sang ou d'autres types de prélèvements, différents gènes ont été utilisés, l'ARN ribosomique 16S, la région intergénique 16S-23S, des gènes codant pour des protéines de membrane externe (BCSP31, OMP31, OMP2) et l'IS711 spécifique du genre *Brucella* et multicopies.

Pour *C. burnetii*, la PCR est utilisée avec succès pour détecter l'ADN dans des échantillons cliniques, elle permet un diagnostic direct, rapide et fiable. Actuellement, dans notre laboratoire, nous utilisons des primers désignés à partir de séquences multicopies IS1111. Une technique en nested-PCR permet une détection précoce de la fièvre Q sur des sérums de patients. Des tests de PCR multiplex destinés à la détection d'agents de bioterrorisme ont été réalisés avec succès sur *C. burnetii*.

Pour les rickettsies, les gènes les plus utilisés pour la détection sont ceux codants pour la citrate synthase et les protéines de membrane rOmpA et rOmpB. La PCR suicide est aussi une technique très sensible pour la détection des rickettsies. Pour *R. rickettsii*, la PCR est un bon outil de détection sur les biopsies de peau ou d'organes mais présente une moins bonne sensibilité sur les échantillons de sang. La PCR peut être associée à une coloration immuno-histochimique pour confirmation.

La PCR est aussi utilisé pour la détection de *C. psittaci* dans les échantillons biologiques et les aérosols.

L'apparition de la PCR en temps réel a permis une diminution du temps nécessaire pour obtenir les résultats. De plus, l'utilisation de sondes (qui peuvent différer d'un seul nucléotide) permet d'être plus spécifique. La PCR en temps réel est actuellement la technique la plus utilisée pour détecter les agents du bioterrorisme. Par exemple, elle permet un diagnostic de *Y. pestis* en quelques heures à partir de fluides biologiques. Pour *F. tularensis*, l'utilisation de la PCR en temps réel ciblant plusieurs régions a permis de diminuer considérablement le temps de la réaction ainsi qu'augmenter l'efficacité de la détection. Pour *Brucella*, *R. prowazekii* ou *R. rickettsii*, elle présente l'avantage d'être plus rapide, reproductible, plus sensible et limite les risques de contaminations par rapport à la PCR classique. Différentes plateformes, tels que LightCycler (Roche) ou Smart Cycler (Cepheid), sont compatibles avec les méthodes basées sur la fluorescence comme les sondes TaqMan ou les sondes d'hybridation. De plus, si on cible une séquence présente en multiples copies dans le génome, on peut améliorer la sensibilité de la détection. Des agents comme *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, *Brucella melitensis*, *C. burnetii* peuvent ainsi être détectées sur Smart Cycler et LightCycler, avec des sondes d'hybridation dans des échantillons d'aérosols en une

heure. Les sondes les plus couramment utilisées sont les sondes TaqMan. Elles sont utilisées pour la détection, parfois simultanée, d'agents comme *B. anthracis* ciblant notamment les gènes pag et cap, *Y. pestis* ciblant le gène activateur du plasminogène (pla), *Brucella spp*, *F. tularensis* ciblant le gène fop codant pour une protéine de la membrane externe ou le gène 23kDa, *C. psittaci* ciblant *ompA* ou le 23S ribosomal. Des sondes dirigées contre des régions spécifiques du gène codant pour l'ARNr 16S sont aussi utilisées pour la détection de bactéries de classe A: *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*. En effet, les différentes sondes peuvent être marquées avec différents fluorochromes et on peut détecter simultanément différents agents potentiels de bioterrorisme dans un même échantillon. Les sondes de types « beacons » sont particulièrement bien adaptées pour une détection multiplexée et ont déjà été testées sur *B. anthracis*, *F. tularensis* et *Y. pestis*. Il est donc préférable de combiner l'amplification initiale (à l'aide d'amorces) avec l'hybridation d'une sonde spécifique (sonde d'hydrolyse, TaqMan, sonde d'hybridation. . .).

L'utilisation des microarrays permet aussi une détection et une identification des agents potentiels du bioterrorisme en deux à six heures, comme *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*. En 2002, Wilson et al, ont pu détecter simultanément 18 pathogènes dont *B. anthracis*, *Brucella*, *C. burnetii*, *F. tularensis*, *R. prowazekii* et *Y. pestis*. Grâce à leur précision (sensibilité et spécificité), les microarrays commencent à être de plus en plus utilisés dans le diagnostic clinique pour détecter des pathogènes mais aussi pour des applications en biodéfense. L'utilisation de tests Multiplex PCR Microarray permet une détection sensible (50 CFU/ml), spécifique et permet de dépister simultanément plusieurs agents potentiels du bioterrorisme : *B. anthracis*, *F. tularensis* et *Y. pestis*.

9.4.3. Nouvelles technologies :

Pour les laboratoires, la détection du (ou des) agent(s) utilisé(s) doit être de plus en plus rapide et de plus en plus précise. C'est pourquoi des technologies (et des plates-formes) sont en perpétuel développement. Nous citons ci-dessous quelques techniques qui pourraient aider les cliniciens dans la détection. Certaines seront basées sur la détection des AN et d'autres sur une détection immunologique.

La plateforme Ibis T5000 permet l'identification et la quantification d'un large spectre de pathogènes dans des échantillons cliniques et environnementaux. La technologie Ibis T5000 combine l'amplification des AN par PCR avec le High-Performance Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) et l'analyse de la composition en base. Ce système, entièrement automatisé, analyse chaque PCR en moins d'une minute et permet l'identification et la quantification d'un large spectre de pathogènes, incluant toutes les bactéries connues à ce jour en quatre à six heures.

L'immuno-PCR est une technologie développée récemment. On utilise l'incorporation d'un nucléotide modifié (d11-dUTP) dans les amplicons, associé à une sonde nucléotidique marqué à la biotine. La sonde, fixée à sa région cible, est visualisée par une réaction enzymatique colorimétrique, médiée par un anticorps et un substrat colorimétrique. Ce test permet de détecter l'ADN de pathogènes à des quantités de l'ordre du femtogramme et l'utilisation d'une sonde augmente la spécificité par rapport à la PCR conventionnelle. L'immuno-PCR est en plein essor et peut être effectuée pour la détection d'agents bactériens menaçants. On utilise notamment le gène *tul4* pour la détection de *F. tularensis*.

On assiste aussi actuellement au développement de thermocycleurs miniatures. Le Miniature Analytical Thermal Cycler Instrument (MATCI), par exemple, est un appareil portable de la taille d'une valise qui donne de bons résultats en PCR en temps réel. La version améliorée de cette plateforme est l'Automatic Nucleic Acid Analyzer (ANAA). Il possède dix blocs indépendants. Les chercheurs de Cepheid développent aussi un thermocycleur portable.

Des outils informatiques sont aussi développés afin d'actualiser la liste des bactéries (et autres agents) qui pourraient être utilisés lors d'un acte bioterroriste et donc mieux se préparer en cas d'utilisation de ces agents.

9.5 Applications au chevet du patient ou POC [86]

L'analyse des AN pour les maladies infectieuses est presque exclusivement réalisée dans les laboratoires centralisés au moyen de matériel sophistiqué et de personnel qualifié. Toutefois, le test point of care (POC), qui est défini comme l'essai réalisé au lit du patient dans un hôpital, un cabinet de médecin, une clinique ou à domicile, offre des avantages quand une réponse rapide est nécessaire, ou lorsque des installations appropriées ou

des chaînes logistiques ne sont pas disponibles. Comparés aux méthodes de laboratoire équivalentes, les tests POC sont généralement plus chers, même si une comparaison du coût réel doit tenir compte des frais généraux du laboratoire central, et aussi de la qualité de prise en charge des patients et l'éradication de la maladie. Le Cepheid Gen-expert, un système basé sur la PCR qui effectue des tests entièrement automatisés 'sample-in/answer-out' est actuellement la seule plateforme de complexité modérée approuvée aux Etats-Unis.

Les tests d'AN en POC (POC NAT) dans les pays développés doivent répondre aux besoins des patients qui sont insuffisamment satisfaits par les méthodes de laboratoire centralisés, incluant le dépistage rapide des infections périnatales et nosocomiales. Les POC NAT dans le monde en développement portent sur le diagnostic et la gestion des maladies infectieuses endémiques, telles que la tuberculose. Les pays en développement ont des ressources financières limitées et ne peuvent pas mettre en œuvre des systèmes de diagnostic sophistiqués et commercialement disponibles, ou des tests de laboratoire développés par la mise en place d'un réseau de laboratoires centralisés. Le POC NAT peut donner accès aux méthodes diagnostiques les plus demandées dans les zones à faibles ressources et à forte charge de morbidité, mais des dispositifs appropriés doivent être abordables, robustes et faciles à utiliser par le personnel peu qualifié, avec des réactifs stables, prêts à utiliser, simples, de l'instrumentation sans entretien, et des résultats clairs et concrets, en plus d'être suffisamment sensibles et spécifiques. L'OMS a récemment approuvée la plateforme GeneXpert Cepheid pour faciliter le diagnostic de la tuberculose multirésistante dans les zones à grande population et à faibles ressources. Toutefois, ce système est encore relativement coûteux et complexe. Le POC NAT est encore au stade émergent, mais les avancées technologiques commencent à relever ces défis.

9.5.1. Les technologies actuelles d'analyse des acides nucléiques

Les tests des AN comprennent trois étapes principales: la préparation des échantillons, l'amplification et la détection. Des exemples de plateformes complètement ou partiellement intégrées et qui sont disponibles ou proches d'être mis sur le marché sont énumérés dans le tableau 17. L'Intégration des trois étapes en un format POC-compatible a été démontré dans le GeneXpert, l'analyseur IQuum LIAT, et d'autres systèmes PCR en temps réel. La Taille, le

coût et la complexité peut être réduite en utilisant une amplification isotherme avec détection en temps réel, telle que mis en œuvre dans l'essai de détection par bioluminescence en temps réel de Lumora (Bioluminescent Assay in Real-Time ou BART) et de TwistDX Twista. L'analyse des AN avec une instrumentation minimale est facilitée par de simples systèmes de détection, tel que le flux latéral des AN (Nucleic Acid Lateral Flow NALF), illustré dans la cassette BioHelix BESt. Ces exemples illustrent également le spectre des progrès réalisés dans l'intégration de systèmes: les analyseurs GeneXpert et LIAT permettent une analyse sample-in/answer-out complète, le BART et Twista l'amplification et la détection et la cassette BESt effectue une détection seulement.

Tableau 17 : Exemple des plateformes POC NAT commercialisées ou proches d'être sur le marché [86]

Plateforme	Fabricant	Préparation de l'échantillon incluse	Principe d'amplification	Détection	Délai du résultat (min) ^a
GeneXpert	Cepheid	oui	PCR	RTF	<120
Liat Analyzer	IQuum	oui	PCR	RTF	<60
MDx	Biocartis	oui	PCR	RTF	inconnu
FilmArray	Enigma	oui	PCR	RTF	<45
FL/ML	Idaho technologies	Non	PCR	RTF	60
Razor	Idaho technologies	Non	PCR	RTF	<60
R.A.P.I.D	Idaho technologies	Non	PCR	RTF	<30
LA-200	Eiken	Non	Isotherme (LAMP)	RTT	<60
Twista	TwistDX	Non	Isotherme (RPA)	RTF	<20
BART	Lumora	Non	Isotherme (LAMP)	RTB	<60
Genie II	Optigene	Non	Isotherme (LAMP)	RTF	<20
SAMBA	Diagnostics for the RealWorld	Non	Isotherme (similaire au NASBA)	NALF	>20
BESt Cassette ^b	BioHelix/ Ustar Biotech	Non	Non inclus, mais typiquement isotherme	NALF	N/A

^a Le délai au résultat dépend selon chaque essai. Les délais les plus longs peuvent être requis pour les essais avec une étape de rétrotranscription.

^b dispositif vendu par BioHelix en USA; fabriqué et vendu par Ustar Biotech en Chine. Abbréviations: RTB: real-time bioluminescence; RTF: real-time fluorescence; RTT: real-time turbidimetry ; NALF: Nucleic Acid Lateral Flow

9.5.2. Certaines applications

9.5.2.1. *La tuberculose*

Les systèmes commerciaux pour l'analyse des AN de la tuberculose utilisant des analyseurs avec des étapes manuelles de préparation des échantillons, suivie d'une amplification basée sur la PCR (Roche), TMA (GenProbe) et SDA (BecktonDickinson), sont disponibles. La préparation des échantillons est particulièrement difficile pour l'analyse des AN de la tuberculose en raison de la nécessité du pré-traitement pour liquéfier les expectorations et concentrer l'agent pathogène; les mycobactéries sont résistantes à la lyse et les expectorations contiennent des inhibiteurs de polymérase. Entièrement intégré, automatisé, le test des AN de la tuberculose POC-compatibles à partir des premières expectorations a été démontré en moins de 2 h utilisant le test GeneXpert M. tuberculosis complex /rifampicine résistance (MTB / RIF). Dans cette méthode, des expectorations chimiquement liquéfiées et décontaminées sont introduites dans la cartouche GeneXpert, où les mycobactéries intactes sont capturées, concentrées et purifiées. Après lyse par sonication pour libérer le matériel génomique mycobactérien, le système effectue une PCR en temps réel semi-nichée, avec cinq amorces qui ciblent la région core du gène *rpoB* de la résistance à la rifampicine, plus une balise moléculaire qui détecte un processus du contrôle interne. Une évaluation multi-site a démontré que le test MTB/RIF montre une excellente sensibilité et spécificité non seulement pour le diagnostic de la tuberculose, mais aussi pour la détection de résistance à la rifampicine en tant que marqueur de la tuberculose multirésistante aux médicaments. Le système a été approuvé par l'OMS, mais le coût et la complexité du GeneXpert est une préoccupation pour une large mise en œuvre dans les milieux à faibles ressources. Un test des AN de la tuberculose peu coûteux a été démontré dans des contextes à faibles ressources en utilisant la technique LAMP avec une détection visuelle de point final (endpoint), mais le procédé est effectué manuellement avec des étapes séparées de préparation des échantillons et des exigences d'instruments supplémentaires. Il existe un besoin d'un système POC NAT simple, peu coûteux et encore pleinement intégré avec des caractéristiques de performance suffisantes pour diagnostiquer la tuberculose multirésistante.

9.5.2.2. *Streptocoque du groupe B*

Le portage maternel de streptocoque du groupe B dans le tractus vagino-cervical peut causer des infections graves chez le nouveau-né. Le portage maternel pourrait être asymptomatique, Donc, le diagnostic rapide de cette infection pendant la grossesse est nécessaire pour minimiser le risque de transmission à la naissance. Le Dépistage de la colonisation du streptocoque du groupe B pendant les semaines 35-37 par la culture est insuffisant parce que les cas ne sont pas tous détectés. Le GBS GeneXpert permet de tester directement à partir d'un prélèvement vaginal pendant la grossesse en 75 min, avec une sensibilité et une spécificité similaires aux méthodes de culture.

9.5.2.3. *Surveillance et diagnostic du SARM :*

Un test des AN a été recommandé récemment par le Clinical and Laboratory Standards Institute (www.CLSI.org) pour la surveillance active du SARM chez les patients admis dans les hôpitaux et autres établissements de soins de santé. Les tests des AN du SARM basées sur la PCR de Roche, Becton Dickinson et Cepheid sont approuvés par la FDA. Les tests Roche et Becton Dickinson sont effectués dans les laboratoires centraux, mais le test GeneXpert SARM permet une surveillance POC du SARM dans les services hospitaliers et les cliniques externes. Les tests GeneXpert SARM effectués dans les services hospitaliers ont fourni des résultats > 10 h plus vite que ceux effectués dans un laboratoire central. Les techniques Isothermes détectant le SARM utilisant l'amplification dépendante de l'hélicase et la RPA ont également été signalées. La RPA intégrée dans un système 'lab on a foil' a permis la détection du gène *mecA* du SARM au faible nombre de copies en moins de 20 min. Le système peut effectuer jusqu'à 30 réactions d'amplification/détection en parallèle, mais ne comprend pas actuellement la préparation d'échantillons.

9.6 Génétique, infections et biologie moléculaire [54]

Face à l'infection de quelque nature qu'elle soit, chaque individu tout en ayant un mécanisme commun de défense, présente des variabilités génétiques non pathologiques (les polymorphismes) pouvant dans certains cas les rendre soit plus susceptibles (plus « fragiles ») soit plus résistants à certaines agressions microbiennes. On parle de facteurs génétiques liés à l'hôte. Les gènes impliqués sont essentiellement des gènes impliqués dans la réponse

inflammatoire, la reconnaissance de l'agent infectieux et dans la coagulation. L'hypothèse de facteurs génétiques impliqués dans la résistance ou non à des infections est partie de plusieurs observations cliniques telles par exemple que la résistance au paludisme grave des sujets atteints de drépanocytose. Des études sur jumeaux ont pu aussi démontrer le lien entre la génétique et la susceptibilité potentielle aux infections. La plupart des polymorphismes retrouvés impliqués dans la susceptibilité ou la résistance aux infections présentent des effets de sensibilité ou de protection mineurs. En fait, la réponse globale de sensibilité-résistance aux infections correspond à des effets additionnels/soustractifs/synergiques/d'interactions entre de multiples facteurs. Il s'agit de la résultante d'interactions complexes que seuls, quelques polymorphismes ne peuvent expliquer. La réponse à l'infection, quel que soit son sens, est trop complexe pour ne se résumer qu'à quelques variant alléliques. L'étude des facteurs génétiques impliqués dans la résistance ou la sensibilité aux infections n'en est donc qu'à ses débuts (domaine de la recherche) et ne présente pas d'intérêt pour le clinicien à ce jour. Il est probable cependant que prochainement, la recherche de plusieurs polymorphismes présents dans un ou plusieurs gènes soit effectuée en parallèle de la mise en évidence de l'agent infectieux causal. Cette carte polymorphique pourra alors par exemple établir un profil de résistance ou de sensibilité à tel ou tel agent infectieux permettant ainsi d'adapter la prévention (vaccination par exemple) ou d'établir le meilleur traitement (domaine de la pharmacogénétique). L'annexe 2 donne de manière simplifiée quelques exemples.

10. Perspectives d'évolution du diagnostic moléculaire en bactériologie :

10.1. Appareillage [54]

Sur le plan technique et technologique, la biologie moléculaire est en constante évolution et de nouveaux appareils plus rapides, plus compacts sont commercialisés. Il est donc impossible d'être exhaustif sur ce sujet et nous n'aborderons que quelques points généraux. Nous avons déjà évoqué dans les paragraphes précédents certaines évolutions concernant la rapidité des thermocycleurs ou l'évolution des techniques de recherche des AN (avec ou sans amplification de cible) (tableau 20). Le regroupement des laboratoires en pôles, la centralisation sur certains hôpitaux ou laboratoires privés de certaines recherches sont en cours. Le développement d'automates/robots de plus en plus performants est aussi en cours.

Pour accélérer la recherche d'agents pathogènes, outre le développement de techniques de recherche et détection des AN, de véritables plateformes permettant d'analyser plusieurs échantillons en parallèle sont à l'étude. Ces appareils sont réservés aux grandes séries. Néanmoins, dans le contexte d'épidémies, on peut imaginer que celles-ci pourraient être utiles dans un contexte d'urgence. Certaines machines permettent ainsi l'analyse de 384 échantillons en parallèle par PCR en temps réel et donnent un résultat en 35 minutes. D'autres systèmes permettent l'analyse par PCR multiplex. D'autres systèmes miniaturisés permettent l'analyse de 1536 échantillons (20 nl à 10 µl distribués par un robot en moins de deux minutes). Bien que ces systèmes n'aient pas encore été utilisés pour les recherches d'agents pathogènes, on peut s'attendre à un développement proche.

Par ailleurs, le développement de la portabilité des thermocycleurs laissent penser que la biologie moléculaire sera réalisable non seulement en milieu hospitalier ou en laboratoire privé mais aussi en milieu éloigné comme par exemple, la brousse.

10.2. Miniaturisation [87]

La miniaturisation des automates progresse grâce aux nanotechnologies. La littérature décrit régulièrement de véritables laboratoires sur puces (« lab-on-a-chip ») de la taille d'une carte de crédit comme la LabChip® (Caliper) et LabCard™ (ACLARA Biosciences) ont miniaturisé les tests de dosage et de détection et offrent maintenant un génotypage à haut débit. Récemment, un biopuce autonome, entièrement intégrée a été développé pour la préparation des échantillons (capture des cellules basée sur les billes magnétique, préconcentration cellulaire, purification et lyse), la PCR et la détection d'ADN sur microarray avec l'hybridation et le suivi électrochimique. La biopuce en plastique mesure 60 × 100 × 2 mm et se compose de mélangeurs microfluidique, de microvannes actionnées thermiquement à base de paraffine, pompes thermopneumatic, les canaux, les chambres, chauffage, capteurs et des puces à ADN. Par exemple, l'utilisation de particules d'or ou de nanopores dans l'approche diagnostique a été décrite.

Dans certains cas, des nanoparticules d'or sont impliqués dans les diagnostics basés sur l'ADN (figure 34), dans une application avancée avec une amplification du signal pour ADN ou ARN, le test Bio-Bar-Code, un dispositif POC prototype qui est la moitié de la taille d'une carte de crédit a déjà été développé.

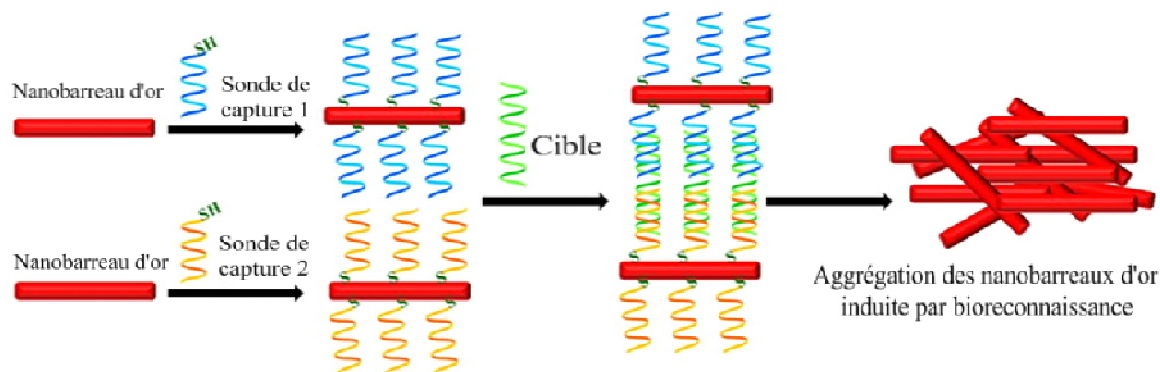


Figure 34 : Représentation schématique de la détection par hybridation d'ADN avec les nanobanques d'or. La reconnaissance spécifique de la cible induit l'agrégation des nanobanques d'or [88].

Des nanopores conçus représentent une autre approche basée sur l'observation que les nucléotides individuels passent seuls à travers un nanopore de 2,6 nm en diamètre en utilisant des champs électriques. Le débit de l'ADN à travers ces nanopores (nanopores d'ADN) est ensuite utilisé pour discriminer entre les chaînes d'ADN qui ne diffèrent que par une seule paire de bases. Les nanopores permettent de déchiffrer les chaînes d'ADN individuelles jusqu'à 30 nucléotides. Les nanopores à résolution d'un seul nucléotide ont également montré pour être utiles pour le séquençage ultrarapide à des taux dépassant 1000 bases / s. Les nanopores ont donc le potentiel pour le développement de nanodispositifs à faible coût et à haut débit pour l'analyse des polynucléotides de l'ADN, mais les applications commerciales ne sont pas encore disponibles.

10.3. Limite de détection [54, 87]

À ce jour, on a pu démontrer qu'il était possible de détecter 5-10 pg d'ADN, ce qui représente le contenu d'une seule cellule et 2 pg d'ARN équivalent au contenu en ARNm de 20 cellules. Certains auteurs ont pu détecter des concentrations zeptomolaires d'ADN (10^{-21} mole). La limite de détection s'abaisse donc considérablement et la possibilité de détecter

moins de 1 ng d'ADN sera probablement une réalité dans un avenir proche. Plusieurs plateformes de génotypage à haut débit des SNP ont déjà atteint cet objectif. Par exemple, le dosage GoldenGate (Illumina) utilise 0,16 ng d'ADN et le GenomeLab SNPstream system (Beckman Coulter) utilise 0,17 ng d'ADN / génotype appel.

10.4. Précision [87]

Le but évident est la précision de 100%, mais cela est rarement réalisable avec les méthodes de diagnostic de laboratoire. Un objectif plus réaliste de l'exactitude > 99% a été décrite pour le génotypage à haut débit par single nucleotide polymorphism (SNP) en 2002, et le but même précision a été proposé pour l'avenir aussi bien. Cet objectif était en effet montré une précision pour être réalisable avec 3 différentes méthodes de génotypage, séquençage évaluée, dans un laboratoire de diagnostic de routine. Compte tenu des contraintes de méthodes actuellement disponibles, l'objectif d'exactitude > 99 % pourrait être généralement acceptable pour le diagnostic moléculaire en général. Cependant, des études sont nécessaires pour confirmer la pertinence de cet objectif ou pour établir des objectifs différents dans différentes zones de tests (par exemple, le génotypage, la détection d'agents infectieux, tests médico-légaux, etc.) Il est à noter que l'ADN protocoles de séquençage peut atteindre une précision > 99,99%.

10.5. Quantification [87]

La précision de la quantification cible a été estimée à <15% avec les méthodes de PCR en temps réel et cette performance sera probablement satisfaire les besoins cliniques dans le futur aussi.

10.6. Disponibilité sur site, la portabilité (par exemple, pour POC) [87]

Avec l'avènement de l'automatisation et la miniaturisation, plusieurs techniques ont été proposées pour servir de portables, appareils éventuellement POC et cette caractéristique pourrait bientôt être considéré comme une caractéristique de performance. Par exemple, la PCR multiplex couplés à des dispositifs de détection de la microélectronique a été envisagé pour la perspective d'au-chevet-pour les tests viraux. Un prototype de poche avec Bio-Bar-code méthodologie a été conçu pour un test POC des agents génétiques et infectieux. Il est

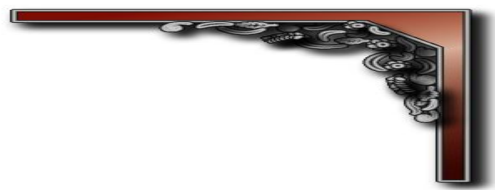
probable que ce genre d'appareils va devenir largement disponibles à des fins diagnostiques de routine, en particulier pour la détection d'agents pathogènes (par exemple, le bioterrorisme, les épidémies, etc), à l'avenir. Cependant, en dehors de généralités, aucune évaluation formelle n'a été prise concernant les caractéristiques attendues des portables, appareils POC des tests de diagnostic moléculaire.

10.7. Coût [87]

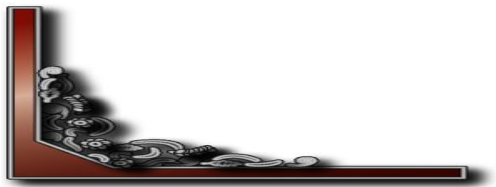
Une étude récente comparant trois méthodes de génotypage dans un laboratoire de diagnostic de routine a révélé que le coût du test par réactif (hors coût du PCR et du travail) variait de 0,50 \$ à 2,00 \$. Cela suggère que le coût total de génotypage est dans la gamme d'immunoessais. En ce qui concerne le coût du génotypage à haut débit, le coût par génotype a été estimé à entre 0,20 \$ et 0,30 \$ en 2002. Il a été proposé que les plates-formes à haut débit doivent permettre de réduire le coût pour seulement quelques cents par génotype dans l'avenir. Basé sur les tendances actuelles en technologies à haut débit, cet objectif semble être réalisable dans l'avenir.

Tableau 18 : technologies innovatrices pour le diagnostic en bactériologie [10].

Device	Fabricant	Méthode de détection
RAPID, Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device	Idaho Technology, Salt Lake City, UT	PCR en temps réel
RAZOR	Idaho Technology, Salt Lake City, UT	PCR en temps réel
HANAA, Handheld Advanced Nucleic Acid Analyzer	Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA	PCR en temps réel
Bio-Seq	Smiths Detection, Pinebrook, NJ	PCR en temps réel
DiversiLab	Bacterial Barcodes, Inc., Houston, TX	Rep-PCR
LIAT Lab-in-a-tube	Iqum, Inc., Allston, MA	Various
GeneXpert	Cepheid, Sunnyvale, CA	PCR en temps réel
Unnamed (microfluidic)	HandyLab, Ann Arbor, MI	Diverses
Nanochip	Nanogen, San Diego, CA	Diverses
Quantum Dot	Quantum Dot, Hayward, CA	Nanocrystaux
Verigene	Nanosphere, Northbrook, IL	Nanoparticules d'or
Scansystem	Hemosystem, Marseilles, France	Chimioluminescence
Biacore	Biacore, Piscataway, NJ	Optique
Spreeta	Texas Instruments, Attleboro, MA	Optique
Tiger	Isis Pharmaceuticals Carlsbad, CA and Science Applications International Corporation, San Diego, CA	Spectrometrie de masse
Non nommé	Non disponible commercialement	champs magnétique
Non nommé	Non disponible commercialement	Microbalance
Non nommé	Non disponible commercialement	Acoustique
Non nommé	Non disponible commercialement	Electrochimique
Non nommé	Non disponible commercialement	Ampérometrique
Non nommé	Non disponible commercialement	Optique
Non nommé	Non disponible commercialement	NASBA



Conclusion



L'utilisation de la biologie moléculaire en bactériologie permet, tout d'abord, un gain de temps réel ce qui devrait permettre un traitement adapté plus précoce, une diminution du nombre de jours d'hospitalisation et au total une baisse significative du coût.

Mais comme nous avons pu le voir, il ne faut pas utiliser les techniques de biologie moléculaire lorsque les techniques traditionnelles font mieux et à moindre coût. En effet, malgré les imperfections, les techniques usuelles possèdent un avantage décisif de simplicité de mise en œuvre et sont bien corrélées avec les données cliniques.

C'est seulement en cas d'insuffisance de ces techniques que la biologie moléculaire doit être utilisée (bactéries non cultivables ou nécessitant un temps d'incubation prolongé, difficulté d'identification) ou pour différencier une souche virulente d'une souche non pathogène. La généralisation des tests de biologie moléculaire ne se fera probablement que lorsque leur degré d'automatisation sera suffisant pour permettre une réduction des coûts financiers et/ou une économie en personnels.

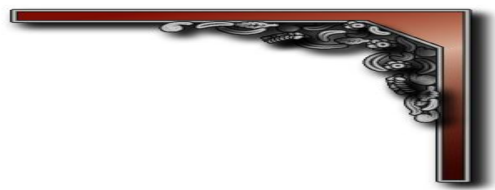
L'apparition de kits et d'automates va permettre d'améliorer la standardisation et la reproductibilité des résultats, la nouvelle génération de thermocycleurs est plus rapide : la PCR se fait dans des microtubes (capillaire) à paroi très fine limitant l'inertie lors des changements de température.

On peut tout de même observer que l'utilisation de la biologie moléculaire a amélioré le diagnostic de pathologie tel que la tuberculose.

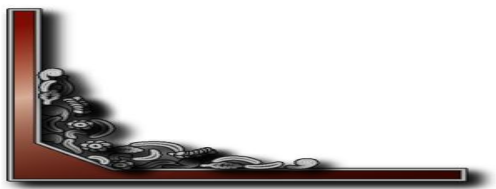
Quant à l'interprétation des résultats, il faut rester vigilant car de nombreuses études sont encore nécessaires pour définir clairement les seuils de positivité traduisant une significativité pathologique. En effet, si la présence d'un micro-organisme pathogène dans un échantillon normalement stérile signe une pathologie, l'interprétation est moins évidente dans des prélèvements présentant une flore associée ou l'existence de rares bactéries détectables par la méthode d'amplification n'est pas toujours synonyme de pathogénicité.

Dans l'avenir, il sera nécessaire de développer des techniques de diagnostic plus rapides, d'augmenter l'automatisation des tests et d'avoir une plus grande adaptabilité pour pouvoir faire face aux nouvelles menaces infectieuses, en particulier les agents de bioterrorisme et les

pathogènes émergents. L'association de nouveaux outils qui sont actuellement en cours de développement dans les laboratoires de recherche, la réorganisation générale des laboratoires d'analyse de biologie médicale et l'amélioration des systèmes de communications entre les cliniciens et les microbiologistes cliniques conduiront à de profonds changements dans la façon de travailler des microbiologistes.



Résumés



Résumé

Titre : Apports des techniques moléculaires en bactériologie

Auteur : Fouad CHARAFI

Mots clés : Bactérie – Techniques moléculaires– Diagnostic – Avantages.

Les méthodes de biologie moléculaire pour la détection et la caractérisation des micro-organismes ont révolutionné le diagnostic en bactériologie et font désormais partie du traitement des échantillons en routine. Les techniques de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont ouvert la voie dans cette nouvelle ère, en permettant la détection rapide et spécifique des bactéries qui étaient auparavant difficiles ou impossibles à détecter par les méthodes traditionnelles de bactériologie. En plus de la détection de microorganismes exigeants, une détection plus rapide par des méthodes moléculaires est désormais possible pour les agents pathogènes d'importance en santé publique. Les méthodes moléculaires ont maintenant progressé au-delà de l'identification afin de détecter les gènes de résistance aux antibiotiques et fournir des informations ayant un intérêt épidémiologique tel que la caractérisation des souches par génotypage. Avec l'avènement de la PCR multiplex, la PCR en temps réel, les techniques d'amplification isotherme et l'amélioration de l'efficacité grâce à l'automatisation, le coût des méthodes moléculaires est en baisse de telle sorte que le rôle des méthodes moléculaires est devenu de plus en plus accrue. Ce travail portera sur l'utilité clinique des méthodes moléculaires effectuées dans le laboratoire de bactériologie clinique, illustré par de nombreux exemples de la façon dont ils ont changé le diagnostic en laboratoire et par conséquent la gestion des maladies infectieuses d'étiologie bactérienne.

Abstract

Title: Contributions of molecular techniques in bacteriology

Author: Fouad CHARAFI

Keywords: Bacteria, Molecular techniques, Diagnosis, Benefits.

Molecular biological methods for the detection and characterisation of microorganisms have revolutionised diagnostic microbiology and are now part of routine specimen processing. Polymerase chain reaction (PCR) techniques have led the way into this new era by allowing specific and rapid detection of microorganisms that were previously difficult or impossible to detect by traditional microbiological methods. In addition to detection of fastidious microorganisms, more rapid detection by molecular methods is now possible for pathogens of public health importance. Molecular methods have now progressed beyond identification to detect antimicrobial resistance genes and provide public health information such as strain characterisation by genotyping. With the advent of multiplex PCR, real-time PCR, isothermal amplification techniques and improvements in efficiency through automation, the costs of molecular methods are decreasing such that the role of molecular methods will further increase. This review will focus on the clinical utility of molecular methods performed in the clinical microbiology laboratory, illustrated with the many examples of how they have changed laboratory diagnosis and therefore the management of infectious diseases.

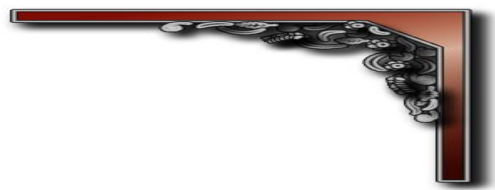
ملخص

العنوان : إسهامات التقنيات الجزيئية في علم البكتيريا

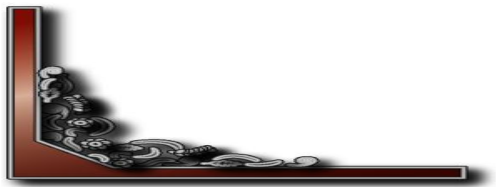
من طرف : فؤاد الشارفي

الكلمات الرئيسية : بكتيريا - تقنيات جزيئية - تشخيص - فؤاد.

أحدثت طرق البيولوجيا الجزيئية لكشف وتحديد خصائص الكائنات الحية الدقيقة ثورة في التشخيص وعلم الجراثيم و هي الآن جزء من المعالجة الروتينية للعينات. لقد فتحت تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الطريق في هذه الحقبة الجديدة من خلال السماح بالكشف السريع و النوعي عن البكتيريا التي كان من الصعب أو المستحيل سابقا الكشف عنها بالطرق التقليدية في علم الجراثيم. بالإضافة إلى الكشف عن الكائنات الحية الحساسة، من الممكن الآن الكشف وبشكل أسرع بواسطة الأساليب الجزيئية عن مسببات الأمراض ذات الأهمية للصحة العامة. لقد تقدمت الأساليب الجزيئية الآن إلى ما وراء التحديد لتكشف عن الجينات المقاومة للمضادات الحيوية، وتوفير المعلومات ذات الأهمية الوبائية كوصف السلالات من خلال التتميط الجيني. مع قدوم PCR المتعددة، PCR في الوقت الحقيقي، وتقنيات التضخيم في الحرارة الثابتة وتحسين الكفاءة من خلال الأتمتة، فإن تكلفة الأساليب الجزيئية إنخفضت بحيث أن دور الطرق الجزيئية أصبح يتزايد أكثر فأكثر. وسيركز هذا العمل على الفائدة السريرية من الأساليب الجزيئية التي تجرى في مختبر علم الجراثيم السريري، موضحا من خلال أمثلة عديدة الكيفية التي غيرت بها التشخيص المختبري، وبالتالي كيفية تدبير الأمراض التعفنية ذات المسببات البكتيرية.



Annexes



Annexe 1 : Principales gammes de kits commercialisées pour la microbiologie clinique [5].

Bactéries	kits	Sociétés
<i>Chlamydia trachomatis</i> (CT) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG)	Détection après amplification • (Cobas) Amplicor CT/NG (PCR) • (Cobas) TaqMan CT (PCR en temps réel) • Amplified (uniquement CT) (NASBA) • Aptima COMBO 2 (TMA et HPA) Peut aussi être isolée (CT ou NG) • BD ProbeTec CT/NG (SDA) • Hybrid Capture CT/GC • RealArt artus (PCR en temps réel) Détection directe sur échantillon Pace 2 (existe aussi uniquement pour CT ou NG) Détection sur culture Accuprobe NG (HPA) Détection combinée ou isolée de CT et NG CT ID, GC ID, CT/GC Hybrid Capture 2	Roche BioMérieux Gen-Probe Becton-Dickinson Digene Qiagen BioMérieux Gen-Probe Digene
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MT) <i>Mycobacterium</i> sp	Détection après amplification • Cobas Amplicor <i>M. Avium</i> (PCR) • Cobas Amplicor <i>M. intracellulare</i> (PCR) • Amplified (complexe MT) [TMA et HPA] Détection après amplification • Genotype Mycobacteria Direct (NASBA et reverse dot-blot) (<i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. kansasii</i>, <i>M. malmoense</i>, <i>M. tuberculosis</i> complexe) • RealArt artus (<i>M. tuberculosis</i> complexe) Détection directe sur prélèvement • Genotype® MTB Direct v3.0 (reverse dot-blot) [<i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. kansasii</i>, <i>M. malmoense</i>, <i>M. tuberculosis</i> complexe] Détection sur culture • AccuProbe (HPA) Nombreuses mycobactéries (<i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. gordonae</i>, <i>M. kansasii</i>) • AccuProbe (complexe MT) (HPA) • Inno-LiPA Mycobacteria (Reverse dot-blot) [<i>M. tuberculosis</i> complexe, <i>M. kansasii</i>, <i>M. xenopi</i>, <i>M. gordonae</i>, <i>M. Genavense</i>, <i>M. simiae</i>, <i>M. marinum</i> et <i>M. ulcerans</i>, <i>M. celatum</i>, mais, <i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. scrofulaceum</i>, <i>M. malmoense</i>, <i>M. haemophilum</i>, <i>M. chelonae</i> complexe, <i>M. fortuitum</i> complexe, et <i>M. smegmatis</i>] • Genotype® Mycobacterium MTBC (Reverse dot-blot) Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> • Genotype® Mycobacterium CM/AS (Reverse dot-blot) Identification de 26 mycobactéries (<i>M. avium</i> ssp., <i>M. chelonae</i>, <i>M. abscessus</i>, <i>M. fortuitum</i>, <i>M. gordonae</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. scrofulaceum</i>, <i>M. interjectum</i>, <i>M. kansasii</i>, <i>M. malmoense</i>, <i>M. peregrinum</i>, <i>M. marinum</i>/<i>M. ulcerans</i>, Complexe <i>M. tuberculosis</i>, <i>M. xenopi</i>, <i>M. simiae</i>, <i>M. mucogenicum</i>, <i>M. goodii</i>, <i>M. celatum</i>, <i>M. smegmatis</i>, <i>M. genavense</i>, <i>M. lentiflavum</i>, <i>M. heckeshornense</i>, <i>M. szulgai</i>/<i>M. intermedium</i>, <i>M. phlei</i>, <i>M. haemophilum</i>, <i>M. kansasii</i>, <i>M. ulcerans</i>, <i>M. gastri</i>, <i>M. asiaticum</i>, <i>M. shimoidei</i>) • Genotype® MTBDR (Reverse dot-blot) Détection des résistances de MT à l'isoniazide et à la rifampicine	Roche BioMérieux Hain Lifescience Qiagen Biocentric Gen-Probe Innogenetics Biocentric
Autres bactéries	Identification générale de bactéries Séquençage de régions bactériennes (cf. ARN 16S) • Microseq • PyroMark Détection sur culture • AccuProbe (HPA) (<i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>S. groupe A et B</i>, <i>Enterococcus</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>) PNA FISH <i>S. aureus</i> (FISH) PNA FISH <i>Enterococcus faecalis</i> (FISH)	Celera Biotage Gen-Probe AdvanDx

Gamme Génotype®

EHEC : détection et identification des *Escherichia coli* Biocentric

Enterococcus : identification génétique des entérocoques et des résistances à la vancomycine-enterohémorragiques

Blood Culture : identification des bactéries Gram+ et Gram- à partir d'hémocultures (EHEC)

Staphylococcies : identification des staphylocoques, du gène *mecA*, et du gène *PVL*

MicroIDent : détection et identification génétique des bactéries anaérobies parodontopathogènes

Détection sur échantillon clinique

GASDirect (HPA) : *Streptococcus* groupe A

Gen-Probe

Test IDI-Strep B (*Streptococcus B*-Hybridation directe)

Becton-Dickinson

Test IDI-MRSA (détection de la résistance à la méthicilline du *S. aureus*-Hybridation directe)

GeneOhm Science

SepCheck (FISH sur sang total)

RiboTechnologies/

(*S. aureus*, *S. Coagulase Négative*, *Streptococcus sp*, *E. faecium* et *E. faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacterium sp*)

Microscreen

TOCSan (quantification de bactéries-PCR en temps réel SYBRGreen)

Génotype® MRSA Direct (Reverse dot-blot) : détection directe des *S. aureus* résistants à la méthicilline

Biocentric

Gamme LightCycler (PCR en temps réel)

Liste de bactéries (non exhaustif)

Détection de bactéries

Pseudomonas aeruginosa

Enterococcus faecalis

S. aureus et SCoN

Roche

Recherche de résistance aux traitements

Recherche de résistance à la méthicilline (MecA) des *Streptococcus sp*

Recherche de résistance à la vancomycine (vanA/vanB) des *Enterococcus sp*

Gamme RealArt artus (PCR en temps réel)

Borrelia sp

Qiagen

Campylobacter sp

Listeria monocytogenes sp

Annexe 2 : Exemples de polymorphismes génétiques liés à la réponse aux infections (Certains des polymorphismes décrits sont le résultat d'études à faible effectif et attendent donc confirmation d'études à plus grande échelle. Ce tableau est donc donné à titre informatif et à interpréter avec prudence) [54].

Gènes contenant des polymorphismes d'intérêt	Rôle schématique des gènes	Agent infectieux ou états infectieux associés à certains polymorphismes
Polymorphisme au rôle potentiellement délétère		
Polymorphismes modifiant la reconnaissance de l'agent pathogène		
Les récepteurs TLRs (Toll-like receptors)	Rôle dans l'immunité non spécifique (innée) Présents à la surface des monocytes-macrophages, des polynucléaires et des cellules dendritiques, récepteurs reconnaissant la surface d'agents bactériens et participant à l'initiation de la réponse inflammatoire	
TLR2, 4 et 5 • TLR2 (cf R753Q)	Récepteur pour les bactéries Gram (+), les mycobactéries et les levures	Association à un sepsis sévère • Blocage de la réponse aux lipoprotéines bactériennes et à certaines bactéries Gram + (cf staphylococcus sp)
• TLR4	Récepteur pour les liposaccharides (LPS) des bactéries Gram (-)	• Infections post-opératoires à Gram (-) • Protection contre la légionellose • Risque de survenue de méningococcémies
• TLR5 CD14	Récepteur pour les flagellines des bactéries Rôle dans l'immunité non spécifique Situé sur la membrane des macrophages ou sous forme soluble, co-récepteur des TLRs pour les bacilles gram (+) et (-)	• Légionellose grave Augmentation de la morbidité et la mortalité au cours de sepsis sévères (Allèle -159TT)
MBL (mannose binding lectin)	Protéine soluble de la phase aigüe de l'inflammation reconnaissant les sucres à la surface de certaines bactéries, virus et parasites et activant le complément (voie des lectines)	Risque d'infection grave quel que soit l'agent pathogène notamment chez les sujets immunodéprimés
Collectines du surfactant (SP-A et SP-D)	Rôle de défense (immunité non spécifique) dans les alvéoles pulmonaires	Risque de pneumopathie sous ventilation mécanique
Récepteur FcγIIA (ou CD32)	Récepteur à la surface des macrophages et polynucléaires activant la phagocytose après fixation de l'IgG2a, immunoglobuline opsonisant les bactéries encapsulées	Risque de développer une pneumonie à pneumocoques Risque de développer une méningococcémie
Polymorphismes affectant la réponse à l'infection		
TNFα	Cytokine pro inflammatoire – rôle central dans le choc septique	Risque de choc septique grave Risque de surmortalité chez les prématurés sous ventilation mécanique
Interleukine 1 (IL-1)	Cytokines pro-inflammatoires (1α, 1β, 1ra)	Surmortalité dans les chocs septiques et les Méningococcémies
Interleukine 4 (IL-4)	Cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle dans la stimulation et la différenciation des lymphocytes T helper 2 (Th2)	Risque de survenue d'une bronchiolite
Interleukine 6 (IL-6)	Cytokine pro-inflammatoire	Risque de sépticémie en période néonatale en cas d'infection à cocci gram (+) • Risque de bronchiolite sévère • Etats septiques sévères
Interleukine 10 (IL-10)	Cytokine pro-inflammatoire	Infections graves à cocci gram (+) et (-), à champignons et infections opportunistes Risque de sepsis plus sévère

IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) Caspase 12	Kinase intracellulaire induisant NK- κ B et participant à la réaction inflammatoire Protéase, inhibiteur de la réponse inflammatoire	Infections graves à cocci gram (+) et (-), à champignons et infections opportunistes Risque de sepsis plus sévère
Polymorphismes des voies de la coagulation		
PAI-1 (plasminogen activator inhibitor)	Régulation de la fibrinolyse	Méningococcémie sévère
Polymorphisme au rôle potentiellement protecteur		
CCR5	Chimiokine, récepteur membranaire présent sur les lymphocytes CD4 participant à la fixation du VIH sur sa cible	Rôle protecteur du polymorphisme D32 (CCR5D32) empêchant/limitant la fixation du virus VIH sur le lymphocyte T CD4 Passage au stade sida plus tardif
CC3L1	Chimiokine, ligand de CCR5	Nombre de duplications segmentaires variables (nombre de copies du gène variable) Un nombre bas de copies est associé à une évolution de la maladie plus rapide



Bibliographie



- [1] Mornet E. ADN, les 50 ans de la double hélice : du concept d'hybridation moléculaire aux biopuces. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2003; 31: 895-9
- [2] Kara R. New thinking about genetics : Britannica Educational Publishing 2011
- [3] Dereure O, Augias D, Guilhaud JJ, Basset Seguin N. Biologie et génétique moléculaires. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Dermatologie*, 1999; 10: 98-110
- [4] Hart T, Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Flammarion 1997
- [5] Lamoril J, Bogard M, Ameziame N, Deybach J C, Bouizegarène P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 Généralités -Partie 1. Immuno-analyse et biologie spécialisée 2007; 22: 5-18
- [6] Bogard M, Lamoril J. Biologie moléculaire en biologie clinique, Tome I, coll Option bio. Editions Elsevier 1999
- [7] Harald H Kessler. Molecular diagnostics of infectious disease. De Gruyter; 2010; 47-9
- [8] Siun C T, Beow C Y. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present. Hindawi publishing corporation, journal of biomedicine and biotechnology 2009; 1-10
- [9] Bourdé-vacher K, Khenfer D, Martin C, Pivert G, Sorel M, Vesseron S. Nouveautés en biologie moléculaire. *IRBM News* 2009; 3: 17-23
- [10] Elizabeth A M, Anne M W. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363: 206-20
- [11] Kara K S, Gisela T, Peter R, Kley H T, Deborah A P, Stephen K T, Molecular diagnosis of infectious diseases in dermatology, *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 749-65

- [12] Jean-claude K, Marc D. Biologie moléculaire et médecine. Flammarion 2007
- [13] Bogard M, Ameziane N, Lamoril J. Microarray d'ADN et profils d'expression des gènes Première partie : concept, fabrication et mise en œuvre. Immuno-analyse et biologie spécialisée 2008; 23: 71-88
- [14] Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. Immuno-analyse et biologie spécialisée 2008; 23: 260-79
- [15] Satu K, David WG B. Molecular diagnostic techniques. Medicine 2009; 37: 535-40
- [16] René C. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale. Revue Francophone Des Laboratoires 2009; 416 61-4
- [17] Maugein J, Bébéar C. Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. Médecine et maladies infectieuses 2003; 33: 153-8
- [18] Madhukar P, Shriprakash K, Keertan D. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis : part 2. Active tuberculosis and drug resistance. Expert Rev Mol Diagn 2006; 6: 423-32
- [19] Mark D P, New diagnostics of tuberculosis. In : Tuberculosis. Saunders Elsevier 2009; 227-36
- [20] Ru-Yi Zhu a, Kou-Xing Zhang b, Ming-Qiu Zhao a, Ya-Hong Liu a, Yun-Yi Xu c, Chun-Mei Ju a, Bing Li c, Jin-Ding Chen, Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, Journal of Microbiological Methods 2009; 78: 339-43
- [21] OMS. Nouveau test rapide pour le diagnostic de la tuberculose. Département OMS Halte à la tuberculose. Cité le 8 Décembre 2010 Available from: URL: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/tb_test_20101208/fr/

- [22] Catharina C B, Pamela N, Doris H, Mark P N, Shubhada S, Fiorella K, Jenny A, Rasim T, Robert B, Roxana R, Ana M, Martin J, Sean M O'B, David H P, Sabine RG, Eduardo G, Camilla R, David A, Mark D P. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance. N Engl J Med 2010; 363: 1005-15.
- [23] Tang YW, Persing D H. Diagnostic microbiology. Pathogenesis 2009; 308-20
- [24] Jeanne M, Audrey C. La résistance aux antituberculeux. Revue Francophone Des Laboratoires 2010; 422: 43-50
- [25] Drouillon V, Houriez F, Buze M, Lagrange P, Herrmann JL. Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* complex dans les échantillons respiratoires par amplification d'ARN en temps réel. Pathologie Biologie 2006; 54: 518-22
- [26] Prod'hom G, Bille J. Diagnostic bactériologique rapide : des méthodes conventionnelles aux méthodes moléculaires modernes. Réanimation 2006; 15: 180-6
- [27] Thien H V. Apport des examens microbiologiques au diagnostic des méningites bactériennes aiguës. Médecine et maladies infectieuses 2009; 39: 462-7
- [28] Carbonnelle E. Apport des examens biologiques dans le diagnostic positif, la détermination de l'étiologie et le suivi d'une méningite suspectée bactérienne. Médecine et maladies infectieuses 2009 ; 39 : 581-605
- [29] Épaul R, Nathan N, Guillemot N, Corvol H, Troadec C, Fauroux B, Clément A. Prise en charge des pneumonies chez l'enfant. Journal de pédiatrie et de puériculture 2006; 19: 145-8
- [30] Philippart F. Prise en charge des infections des voies respiratoires basses de l'immunocompétent. Partie concernant les définitions, l'épidémiologie et les éléments du diagnostic. Médecine et maladies infectieuses 2006; 36: 784-802

- [31] Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, Ieven M. Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *Journal of Microbiological Methods* 2008; 73: 257-62
- [32] David R. M, Lance C J, Niranjana B, Trevor P. A. Emerging Advances in Rapid Diagnostics of Respiratory Infection. *Infect Dis Clin N Am* 2010; 24: 791-807
- [33] José M M, Gustavo C, Emilio PT, *Biología molecular en el diagnóstico de la infección respiratoria aguda de origen bacteriano*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 Suppl 9: 26-32
- [34] René TW, Willem B VL, Alex V B. Specific Diagnostic Tests for Atypical Respiratory Tract Pathogens. *Infect Dis Clin N Am* 2010; 24: 229-48
- [35] Leroy O. Apport des explorations microbiologiques au diagnostic des infections des voies respiratoires basses. *Médecine et maladies infectieuses* 2006; 36: 570-98
- [36] Diederik B M W. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* 2008; 56: 1-12
- [37] Jarraud S, Reyrolle M, Meugnier H, Forey F, Etienne J. *Légionellose*. *Presse Med* 2007; 36: 279-87
- [38] Jianli D, Juan P O, Jere W M, David H W. Emerging Pathogens: Challenges and Successes of Molecular Diagnostics. *J Mol Diagn* 2008; 10: 185-97
- [39] Carole E. Diagnostic biologique de la coqueluche. *Option Bio* 2010; 431: 16-7
- [40] Nadège BN, Florence DP. Intérêt de la PCR en Temps Réel dans le diagnostic biologique de la Coqueluche. *Spectra Biologie* 2006;150: 28-32

- [41] Cohen-Bacrie S, Bertin F, Gassiot AS, Prère MF. Rapid molecular genetic assay for direct identification of *Bordetella* from patients specimens. *Pathologie Biologie* 2010; 58: 52-4
- [42] Gourié F, Raoult D. Diagnostic microbiologique : du diagnostic par étiologie au diagnostic par syndrome. *Antibiotiques* 2009; 11: 37-48
- [43] Daniel G, Benoit C, Jean-Noël D, Jean-Marc C, Bruno L, Alain L, Emmanuel DC, Benoit J, Dominique A D. Diagnostic moléculaire en pathologie infectieuse : intérêt d'un diagnostic multiplex dans les pneumopathies atypiques. *Revue Française des Laboratoires* 1999; 315: 33-7
- [44] Honderlick P, Philippe B, Picard C, Thaler F, Couderc LJ. La détection par une PCR multiplex de bactéries responsables de pneumopathies atypiques améliore-t-elle les performances du diagnostic microbiologique des infections du tractus respiratoire ? *Pathologie Biologie* 2006; 54: 467-9
- [45] Margareta I. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *Journal of Clinical Virology* 2007; 40: 259-76
- [46] Eckert C, Lalande V, Barbut F. Diagnostic des infections à *Clostridium difficile*. *Journal des Antinfectieux*. In press 2011
- [47] Ban M A, Albert J L. *Campylobacter* infections. In: Richard L G, David H W, Petter F W. *Tropical infections diseases: Principles, Pathogens and Practice*. Saunders Elsevier 2011; 145-9
- [48] Yves G, Chantal LB. Diagnostic des *Escherichia coli* agents de diarrhée chez l'Homme. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2008; 398: 67-76

- [49] Theodore S S, Nathan M T, Richard L G. Enteric *Escherichia coli* Infections. In: Richard L G, David H W, Petter F W. Tropical infections diseases: Principles, Pathogens and Practice. Saunders Elsevier 2011; 110-20
- [50] Carole E. Diagnostiquer et traiter l'infection à *Helicobacter pylori*. Option Bio 2008; 394: 14-6
- [51] Salles N. Infection à *Helicobacter pylori* chez la personne âgée. La Revue de médecine interne 2007; 28: 400-11
- [52] Francis M. Détection de *Helicobacter pylori* et de sa sensibilité aux antibiotiques Une étape de plus vers l'utilisation des méthodes moléculaires. Gastroenterol Clin Biol 2007; 31: 791
- [53] Bertille DB, Maïthé C, Sophie R, Cécile M B, Christiane B. Infections humaines a chlamydiae: diagnostic biologiques et épidémiologie. Revue Francophone des Laboratoires 2007 ; 391: 71-6
- [54] Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, Deybach J C, Bouizegarène P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 Les applications et leur avenir -Partie 2. Immuno-analyse et biologie spécialisée 2007; 22: 73-94
- [55] Carole E. Diagnostic des infections sexuellement transmissibles à *Chlamydia trachomatis*. Option Bio 2008; 406: 16-7
- [56] Luis O G, José A L J, María A B G, Javier A M, Fernando V V. Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26 Suppl 9: 42-9
- [57] Carole E. Diagnostic des ulcérations génitales. Option Bio 2008; 405: 16-7
- [58] Chaine B, Janier M. Maladies sexuellement transmissibles Maladies vénériennes. EMC (Elsevier Masson SAS Paris), Akos (traité de medecine) 2009; 2-0695: 1-9

- [59] John R B. Sexually Transmitted Infections in Men. Prim Care Clin Office Pract 2010; 37: 509-25
- [60] Cynthia J M. Sexually Transmitted Infections. In: Jill M B, Steven G R, John A B, Lance B. Pediatric Emergency Medicine. Saunders Elsevier 2008; 543-59
- [61] Cyril S, Elisabeth C. Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de *Yersinia enterocolitica*. Revue Francophone Des Laboratoires 2008; 400: 49-58
- [62] Frouina E, Ortonne N. Nouvelles techniques en dermatopathologie. Annales de dermatologie et de vénéréologie 2009; 136: 111-8
- [63] Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF). Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives Texte long. Médecine et maladies infectieuses 2007; 37: 153-74
- [64] Assous M V. Méthodes du diagnostic biologique au cours des différentes manifestations de la borréliose de Lyme. Médecine et maladies infectieuses 2007; 37: 487-95
- [65] Edouard S, Raoult D. *Bartonella henselae*, un agent d'infections ubiquitaires. Médecine et maladies infectieuses 2010; 40: 319-30
- [66] Eglantin F, Hamdad F, El samad Y, Monge AS, Sevestre H, Eb F, Schmit JL. Le diagnostic microbiologique des adénites associées à la maladie des griffes du chat : place de la sérologie et de l'amplification génique. Pathologie Biologie 2008; 56 : 461-6
- [67] Renvoisé A, Raoult D. L'actualité des rickettsioses. Médecine et maladies infectieuses 2009; 39: 71-81
- [68] Berbis P. Quoi de neuf en dermatologie clinique. Annales de dermatologie et de vénéréologie 2008; 135: 317-25

- [69] Frémont G, Bourrat E, Mahé E, Flageul B. Lèpre de l'enfant: Un diagnostic à ne pas méconnaître. *Annales de Dermatologie Et De Vénérologie* 2010; 137: 359-63
- [70] Flageul B. Le Diagnostic De La Lèpre. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2011; 431: 37-42
- [71] Michela P, Maria P L, Vittorio S. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; 36: 6-16
- [72] Podglajen I, Mainardi JL. Apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des endocardites infectieuses. *Réanimation* 2007; 16: 193-9
- [73] Monteil H. En quoi le microbiologiste peut-il contribuer à l'amélioration de la qualité de l'antibiothérapie ? *Médecine et maladies infectieuses* 2003; 33: 1-12
- [74] Eric S, Odile LS, Patrick L. Approche moléculaire de la résistance à la méthicilline de *Staphylococcus aureus*. *Revue Française des Laboratoires* 1999; 315: 25-31
- [75] Pivert G. Les évolutions en biologie moléculaire. *IRBM News* 2010; 31: 23-5
- [76] Dekeyser S, Beclin E, Descamps D. Intérêt de la mise en place de la recherche des gènes vanA et vanB par technique PCR en système clos (Xpert vanA/vanB Cepheid®) dans un laboratoire de microbiologie dans le cadre de la gestion d'une épidémie à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (EfRG). *Pathol Biol (Paris)*. In press 2010
- [77] Surcouf C, Fabre M, Enouf V, Cadé S, Soler C, Mac Nab C, Samson T, Foissaud V. Portage d'entérocoques résistants aux glycopeptides : les techniques d'isolement et d'identification actuelles sont-elles suffisantes ?. *Pathol Biol (Paris)*. In press 2009
- [78] Billy C. Détection génotypique des résistances bactériennes : de la phénotypie à la génotypie, deux méthodes complémentaires. *Réanimation* 2003; 12: 192-7

- [79] Desenclos JC, Vaillant V, Delarocque Astagneau E, Camp  se C, Che D, Coignard B, Bonmarin I, Lévy Bruhl D, De Valk H. Les principes de l'investigation d'une épidémie dans une finalité de santé publique. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2007; 37: 77-94
- [80] Dereure O, Biologie moléculaire en dermatologie. *EMC-Dermatologie Cosmétologie* 2005; 2: 1-19
- [81] Besty F. *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*. Elsevier 2012
- [82] Naum M, Lampel K A. *DNA-Based Assays*. Editions Elsevier 2002; 1: 79-85
- [83] Warren N F, Mark H W. Molecular diagnostic techniques. *Medicine* 2005; 33: 26-32
- [84] Jiang F, Andrea J K, Kelly J H, Current Methods for the Rapid Diagnosis of Bioterrorism-Related Infectious Agents. *Pediatr Clin N Am* 2006; 53: 817-42
- [85] Pelletier N, La Scola B. Détection moléculaire et immunologique des bactéries dans le cadre du bioterrorisme. *Médecine et maladies infectieuses* 2010; 40: 506-16
- [86] Angelika N, Tanya M F, David S B. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in Biotechnology*. In press 2011
- [87] Gyorgy C. Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363: 6-31
- [88] Harshala J P, Cheulhee J, Joo-Hyung L, Hyun G P. A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 2010; 26: 667-73

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله العظم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترف.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحصى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

**إسهامات التقنيات الجزيئية
في علم البكتيريا**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرفه

السيد: فؤاد الشارفي

المزاد في 09 يوليوز 1986 بخنيفرة

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: بكتيريا – تقنيات جزيئية – تشخيص – فؤاد.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد: ميمون زهدي

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

السيد: ياسين سخسوخ

أستاذ مبرز في علم الأحياء الدقيقة

السيد: عبد القادر بلمكي

أستاذ في علم الدم

السيدة: سعيدة طلال

أستاذة مبرزة في الكيمياء الإحيائية