

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

ANNEE: 2018

THESE N°: 47

APPORT DU SEQUENCAGE MULTIPLEX DU LIQUIDE
D'ASPIRATION BRONCHIQUE DANS LA PRISE EN CHARGE
DIAGNOSTIQUE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES
CHEZ L'ENFANT MOINS DE 5 ANS
(A PROPOS DE 700 CAS)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mr. M'barek AKANOU
Né le 25 Juin 1991 à Timzit, Taroudant

Pour l'Obtention du Doctorat en Médecine

MOTS CLES : Infection – Respiratoire – Séquençage – Multiplex – Enfant.

JURY

Mr. M. ZOUHDI Professeur de Microbiologie		PRESIDENT
Mr. H. TLIGUI Professeur de Parasitologie		RAPPORTEUR
Mme. M. SEFFAR Professeur de Microbiologie	}	JUGES
Mr. H. AIT OUAMAR Professeur de Pédiatrie		

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما
علمتنا إننا أنت العليم الحكيم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
العظيم

سورة البقرة الآية 31



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

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur 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
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS
ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne – *Clinique Royale*
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan Médecine Interne
Pr. YAHYAOUI Mohamed Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed Médecine Interne – *Doyen de la FMPR*
Pr. CHAD Bouziane Pathologie Chirurgicale
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation –Doyen de la FMPO
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – Dir. du Centre National PV
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOU DA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la FMPA
Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- Directeur CHIS
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne



Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbas
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*

Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Gynécologie – Obstétrique
Dermatologie

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

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur HMI Med V**
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie



Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation

Pr. KADDOURI Noureddine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Décembre 2000

Pr. ZOHAI ABDELAH*

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda

Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie
Neurologie – Doyen de la FMP Abulcassis
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie
Cardiologie

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie- Dir. Hop. Av. Marr.
Anesthésie-Réanimation Inspecteur du SSM
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne



Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie Directeur Hop. Chekikh Zaied
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Neurologie

ORL

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie

Pr. BENELBARHDADI Imane
 Pr. BENNANI Rajae
 Pr. BENOACHANE Thami
 Pr. BEZZA Ahmed*
 Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
 Pr. BOUMDIN El Hassane*
 Pr. CHAT Latifa
 Pr. DAALI Mustapha*
 Pr. DRISSI Sidi Mourad*
 Pr. EL HIJRI Ahmed
 Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 Pr. EL MADHI Tarik
 Pr. EL OUNANI Mohamed
 Pr. ETTAIR Said
 Pr. GAZZAZ Miloudi*
 Pr. HRORA Abdelmalek
 Pr. KABBAJ Saad
 Pr. KABIRI EL Hassane*
 Pr. LAMRANI Moulay Omar
 Pr. LEKEHAL Brahim
 Pr. MAHASSIN Fattouma*
 Pr. MEDARHRI Jalil
 Pr. MIKDAME Mohammed*
 Pr. MOHSINE Raouf
 Pr. NOUINI Yassine
 Pr. SABBAH Farid
 Pr. SEFIANI Yasser
 Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Gastro-Entérologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Rhumatologie
 Anatomie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie



Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 Pr. AMEUR Ahmed *
 Pr. AMRI Rachida
 Pr. AOURARH Aziz*
 Pr. BAMOU Youssef *
 Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 Pr. BENZEKRI Laila
 Pr. BENZZOUBEIR Nadia
 Pr. BERNOUSSI Zakiya
 Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie

Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOURIK Fatima
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*

Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Cardiologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie



(mise en disponibilité)

Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najja

Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale



Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GHARIB Noureddine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhoussein*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MRABET Mustapha*
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Monsef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
Pr. AGDR Aomar*
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AKHADDAR Ali*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMINE Bouchra
Pr. ARKHA Yassir
Pr. BELYAMANI Lahcen*
Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae*
Pr. BOUI Mohammed*

Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologie
Médecine préventive santé publique et hygiène
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale

Médecine interne
Pédiatre
Chirurgie Générale
Neurologie
Neuro-chirurgie
Radiologie
Rhumatologie
Neuro-chirurgie
Anesthésie Réanimation
Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie



Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
 Pr. ABOUELALAA Khalil*
 Pr. BELAIZI Mohamed*
 Pr. BENCHEBBA Driss*

Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Microbiologie *Directeur Hôpital My Ismail*
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-ptisiologie



Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie
 Anatomie pathologique

Chirurgie Pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Traumatologie Orthopédique

Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
0.
Pr. BENSGHIR Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad
Pr. EL JOUDI Rachid*
Pr. EL KABABRI Maria
Pr. EL KHANNOUSSI Basma
Pr. EL KHLOUFI Samir
Pr. EL KORAICHI Alae
Pr. EN-NOUALI Hassane*
Pr. ERRGUIG Laila
Pr. FIKRI Meryim
Pr. GHFIR Imade
Pr. IMANE Zineb
Pr. IRAQI Hind
Pr. KABBAJ Hakima
Pr. KADIRI Mohamed*
Pr. LATIB Rachida

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologie
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie
Radiologie
Médecine Nucléaire
Pédiatrie
Endocrinologie et maladies métaboliques
Microbiologie
Psychiatrie
Radiologie



Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
Pr. MEDDAH Bouchra
Pr. MELHAOUI Adyl
Pr. MRABTI Hind
Pr. NEJJARI Rachid
Pr. OUBEJJA Houda
Pr. OUKABLI Mohamed*
Pr. RAHALI Younes
Pr. RATBI Ilham
Pr. RAHMANI Mounia
Pr. REDA Karim*
Pr. REGRAGUI Wafa
Pr. RKAIN Hanan
Pr. ROSTOM Samira
Pr. ROUAS Lamiaa
Pr. ROUIBAA Fedoua*
Pr. SALIHOUN Mouna
Pr. SAYAH Rochde
Pr. SEDDIK Hassan*
Pr. ZERHOUNI Hicham
Pr. ZINE Ali*

Médecine Interne
Pharmacologie
Neuro-chirurgie
Oncologie Médicale
Pharmacognosie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique
Pharmacie Galénique
Génétique
Neurologie
Ophtalmologie
Neurologie
Physiologie
Rhumatologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Chirurgie Pédiatrique
Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
Pr. GHOUNDALE Omar*
Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Urologie
Médecine Interne

***Enseignants Militaires**



MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique

***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISSE KARIM

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

***Enseignants Militaires**



AOÛT 2015

Meziane meryem
Tahri latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootéchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines*





Dédicaces

A mon père

Le grand militant, qui a toujours été un exemple pour ses enfants, qui m'a toujours pousser à me surpasser dans tout ce que j'entreprends, qui m'a transmit cette rage de vaincre et la faim de savoir.

Celui qui a été ma source de motivation, le moteur de mes ambitions, qui m'a appris que le savoir est une richesse que nul ne peut voler.

Je te serai chère père reconnaissant toute ma vie, pour tout le mal que tu t'es donné pour moi à chaque étape de ma vie, pour ta patience et ton amour.

J'espère être l'homme et le fils que tu as voulu que je sois, et je m'efforcerai d'être digne de ce que tu aurais souhaité que je sois. Ce titre de Docteur en Médecine je le porterai fièrement et je te le dédie tout particulièrement.

A ma tendre mère

Le symbole du dévouement et du sacrifice, pour son amour son écoute permanente et son soutien inconditionnel.

*Ma mère qui a toujours été là dans les moments les plus difficiles de ma vie, qui m'a soutenu et protégé. Je te dédie cette thèse maman pour t'exprimer toute ma gratitude et je te dis tout simplement : je t'aime
maman, Merci.*

À tous mes très chers amis (es)

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères et sœurs et des amis sur qui je peux compter.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A mes frères et à mes sœurs

A travers ce travail je vous exprime tout mon amour et mon affection.

Sans vous ma vie n'aurait pas eu le même goût.

Je vous remercie pour tout ce que vous êtes, et je vous souhaite à tous beaucoup de réussite dans vos études mais aussi dans tout le reste.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère.



Remerciements

A notre maître et Président de thèse
Monsieur le Professeur M. ZOUHDI
Professeur de Microbiologie
CHU -RABAT

*Vous nous faites l'insigne honneur d'accepter la présidence de notre
thèse.*

Nous avons pu apprécier vos qualités humaines et professionnelles.

*Veillez cher président et maitre, croire à l'expression de notre plus
profond respect et notre sincère admiration.*

A notre maître et Rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur H. TLIGUI

Professeur de Parasitologie

CHU-Rabat

Vous nous avez inspiré le sujet de thèse, vous nous avez guidé tout au long de son élaboration, avec bienveillance et compréhension, flexibilité et disponibilité ont été les qualités les plus marquantes au cours de cette collaboration. Votre accueil si simple, pour l'un de vos élèves, vos qualités humaines rares, vos qualités professionnelles ont été un enseignant complémentaire pour notre vie professionnelle et privée. Veuillez accepter ici, cher maître, l'expression de notre gratitude et l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre maître et juge de thèse
Monsieur le Professeur M. SEFFAR
Professeur de Microbiologie
HSR-Rabat

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en
acceptant de juger cette thèse.*

*Nous avons apprécié vos qualités d'enseignant et de médecin, votre
dynamisme et votre extrême sympathie.*

*Veillez trouver ici, cher maître, l'expression de notre vive
reconnaissance et notre gratitude.*

A Notre maître et juge de thèse
Monsieur le Professeur H. AIT OUAMAR
Professeur de Pédiatrie
HER-Rabat

*Nous sommes particulièrement heureux et honorés que vous avez bien
accepté de juger notre thèse.*

*Nous avons été particulièrement touché par la simplicité, la gentillesse
et la rigueur de travail qui vous caractérisent.*

*Permettez nous de vous exprimer notre profond respect et vive
reconnaissance.*

A Mlle Sobha EL FTOUH

CHUIS – Laboratoire de recherche

Nous vous remercions de votre aide à l'élaboration de ce travail, votre soutien tout au long de la période de notre étude était de grand apport.

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.



Liste des illustrations

ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléiqu
ADV	: Adénovirus
AN	: Acides nucléiques
BALT	: Bronchial Associated Lymphoïde Tissue
CHIS	: Centre Hospi
CN	: Numéro de conditio
CRP	: C-réactive protéine
EMC	: Encéphalomyocardite
Gb	: Gigua bases
HER	: Hôpital d'enfant de rabat
hMpv	: Métapneumovirus humain
IAC	: Internal Amplification Control
IRA	: Infections respiratoires aiguës
IRABC	: Infections respiratoires aiguës basses communautaires
Hib	: Haemophilus influenzae type b
HID	: Analyse d'identification humaine
IgA	: Immunoglobuline A
IgD	: Immunoglobuline D
IgM	: Immunoglobuline M
MALT	: Mucosa Associated Lymphoïde Tissue

MLPA : Amplification multiplexe de sondes dépendant de ligation

MP : Mycoplasme pneumoniae

NGS : Next Generation Sequencing

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORL : Oto-rhino-laryngologie

PAC : Pneumonie aigue communautaire

PFLA : Pneumonie Franche lobaire Aiguë

PIV : Parainfluenza virus

PNI : Programme national d'immunisation

QV : Valeur de la qualité

RSV : Virus respiratoire syncytial.

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

VAS : voies aériennes supérieures

VAI : voies aériennes inférieures

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

DTCP : Dyskinésies ciliaires primitives

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'appareil respiratoire	5
Figure 2 : Différence entre désoxynucleotide et didésoxynucléotide	28
Figure 3 : Principe de la réaction de Sanger	29
Figure 4 : Exemple du tube de réaction du nucléotide G (dGTP, ddGTP).....	29
Figure 5 : Exemple de gel de migration pour une seule réaction : G réaction.....	30
Figure 6 : Lecture manuelle de la séquence d'AD	31
Figure 7 : Schéma résumant les différentes étapes du séquençage classique	32
Figure 8 : Exemple de 4 réactions (A, G, T et C) dans un seul tube.....	33
Figure 9 : Comparaison du séquençage classique vs séquençage fluorescent.....	34
Figure 10 : Pics des différents fragments.....	34
Figure 11 : Image du gel de migration automatisé avec les différentes couleurs des nucléotides	35
Figure 12 : Représentation des différents couleurs du gel sous forme de pics	36
Figure 13 : Schéma résumant le séquençage méthode moderne	36
Figure 14 : Exemple de sonde avec ces différentes parties	37
Figure 15 : Schéma des différentes étapes de la MLPA	38
Figure 16 : Identification des différents Virus en se basant sur la taille des fragments obtenus	39
Figure 17 : Représentation des résultats sous forme de pics.....	39
Figure 18 : Résultats de réaction de Sanger VS MLPA	41
Figure 19 : HITACHI Genetic Analyzer 3500.....	42
Figure 20 : Exemple de calibration spatiale.....	43
Figure 21 : Exemple de calibration spectrale de la Dye Set G5 Matrix Standard Set DS-33..	44

Figure 22 : Exemple de séquenceur à 16 capillaires :	45
Figure 23 : Différentes étapes d'un run effectué par l'analyseur génétique	46
Figure 24 : Conversion des bandes colorées sur dans le capillaire en donnée spectrales	48
Figure 25 : Fonctionnement du système	49
Figure 26 : Exemple de résultat obtenu suite à une réaction de séquençage par le système 3500 Genetic Analyzer	50
Figure 27 : Schéma résumant la procédure générale du kit d'isolation MagMax™ Total Nucleic Acid (Thermo Fisher Scientific)	53
Figure 28 : Principe du kit d'isolation MagMax™ Total Nucleic Acid (Thermo Fisher Scientific).....	54
Figure 29 : Schéma du protocole du séquençage au panel TrueScience™ RespiFinder®)	59
Figure 30 : Thermocycleurs du laboratoire recherche du CHIS	61
Figure 31 : Intervalle et taille des fragments du panel d'identification TrueScience™ RespiFinder®	70
Figure 32 : Echantillon positif avec le signal IAC	71
Figure 33 : Echantillon positif avec absence du signal IAC	71
Figure 34 : Echantillon à adénovirus positif avec deux pics différents.....	72
Figure 35 : Echantillon négatif avec le signal IAC au niveau de la position de la sonde IAC	72
Figure 36 : Echantillon raté.....	73
Figure 37 : Echantillon partiellement inhibée exemple 1	74
Figure 38 : Echantillon partiellement inhibée exemple 2	74
Figure 39 : Echantillon à profil augmenté	75
Figure 40 : Profil d'étude	82
Figure 41 : Répartition des patients selon l'âge	82

Figure 42 : Répartition des patients selon le sexe	83
Figure 43 : Répartition des nourrissons selon le mois d'hospitalisation	83
Figure 44 : Antécédents pathologiques répartis selon le nombre des cas.....	85
Figure 45 : Répartition des patients selon les symptômes cliniques présentés.....	86
Figure 46 : Antibiotiques utilisés avant l'hospitalisation	88
Figure 47 : Répartition des différentes anomalies radiologiques.....	89

Liste des des tableaux

Tableau 1 : Critères de gravité et d'hospitalisation.....	22
Tableau 2 : Antibiotiques utilisés dans le traitement des pneumonies bactériennes de l'enfant	24
Tableau 3 : Comparaison entre le séquençage de Sanger et la MLPA.....	40
Tableau 4 : Préparation de la Solution Lysis / Binding.....	56
Tableau 5 : Préparation du mélange Bead Mix.....	56
Tableau 6 : Différents types de panels RespiFinder.....	60
Tableau 7 : Programmes du cycleur thermique	61
Tableau 8 : Préparation du RT/PCR MIX	63
Tableau 9 : Préparation du Hybridation Mix	65
Tableau 10 : Préparation TwoStep Mix.....	66
Tableau 11 : Préparation de Standard Mix	68
Tableau 12 : Résultats de l'analyse biochimique de nos patients	90
Tableau 13 : Résultats des hémocultures effectuées chez nos patients.....	90
Tableau 14 : Détection des agents infectieux par séquençage multiplex dans les prélèvements naso-pharyngés.....	91



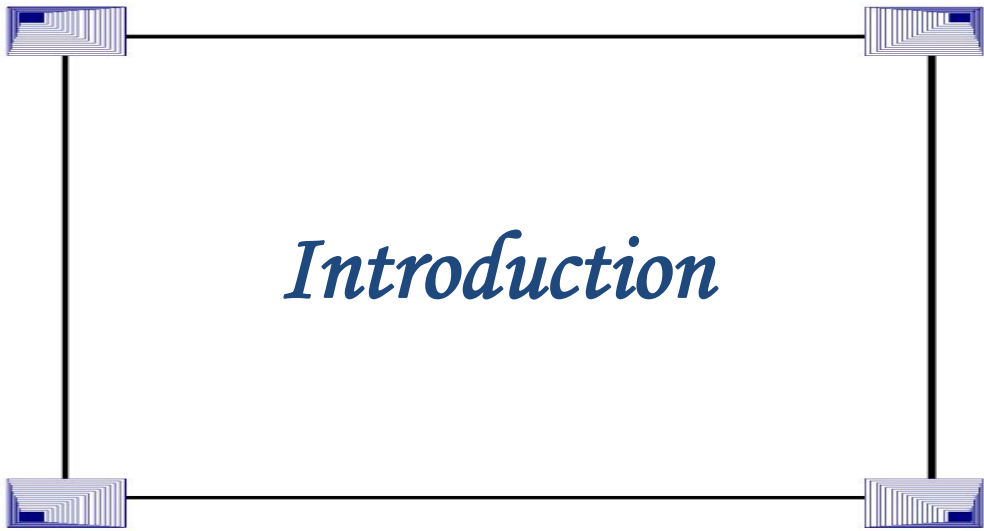
Sommaire

Introduction	1
Généralités	3
I. Définition :	4
II. Rappels anatomophysiologiques des voies respiratoires.....	4
A. Anatomie des voies respiratoires	4
B. Physiologie et mécanismes de défense.....	5
C. Physiopathologie :	10
III. Données épidémiologique.....	11
A. Morbidité et mortalité :	11
B. Facteurs de risque :	11
C. Etiopathogénie	12
IV. Etude sémiologique des infections respiratoires aigues basses.....	15
A. Diagnostic clinique.....	15
1. Diagnostic positif.....	15
2. Diagnostic différentiel :	17
B. Les tableaux cliniques	17
V. Prise en charge thérapeutique.....	22
A. Hospitalisation :	22
B. Traitement symptomatique	22
C. Antibiothérapie.....	23
D. Traitement en dehors de l'antibiothérapie.....	24
E. Prévention des IRA chez l'enfant :	25
Biologie moléculaire : Séquençage multiplex Multiplex	26
I. Introduction :	27
II. Généralités	28
A. Séquençage :	28
1. Méthode classique :	28
2. Méthodes modernes	32
3. Amplification multiplexe de sondes dépendant de ligation.....	36

4.	Réaction de Sanger Vs MLPA :	39
B.	Système du séquençage :	41
1.	Principe de fonctionnement :	41
2.	Préparation des échantillons :	43
3.	Préparation de l'instrument :	43
4.	Fonctionnement du système :	44
5.	Résultats :	49
III.	Mode opératoire :	51
A.	Introduction :	51
B.	Extraction des acides nucléiques.....	52
1.	Définition :	52
2.	Principe :	54
3.	Protocole :	55
C.	La technologie TrueScience™ RespiFinder®.....	58
D.	Electrophorèse capillaire (3500 GENETIC ANALYSER).....	68
1.	Combinaison de l'étalon de masse, du formamide et un produit PCR :	68
2.	Lancement du cycle de la plaque d'échantillons :	69
3.	Analyse des données :	69
4.	Interprétation des résultats :	69
	Matériel et méthodes	76
I.	Type d'étude :	77
II.	Critères d'inclusion :	77
III.	Critères d'exclusion :	77
IV.	Recueil des données :	78
V.	Etude statistique :	80
	Résultats.....	81
I.	Profil épidémiologique :	82
1.	Fréquence.....	82
2.	Age :	82
3.	Sexe.....	83

4. Mois d'hospitalisation :	83
5. Niveau socio- économique	84
6. Statut vaccinal	84
7. Allaitement maternel	84
II. Profil Clinique	85
A. Antécédents pathologiques	85
B. Symptomatologie clinique	86
C. Prise d'antibiotique préalable	88
III. Profil paraclinique	89
A. Radiographie pulmonaire	89
B. Analyse Biochimique	89
C. Analyse microbiologique:	90
IV. Profil thérapeutique	92
A. Traitements antibiotiques	92
B. Traitements associés	92
V. Profil évolutif	93
A. Evolution et complication	93
Discussion	94
I. Aspect épidémiologique	95
A. Définition :	95
B. Infections respiratoires aiguës en chiffres :	95
C. Facteurs de risques :	96
II. ASPECT CLINIQUE	98
A. Signes fonctionnels	98
B. Signes physiques	98
III. Aspect paraclinique	99
A. Radiographie thoracique	99
B. Analyse biochimique	99
1. Numération formule sanguine	99
2. Protéine C Réactive (CRP)	100

3. Procalcitonine	100
C. Analyse microbiologique.....	101
1. Hémoculture :	101
2. Biologie moléculaire :.....	101
a. Apport du séquençage multiplex dans la prise en charge diagnostique des infections respiratoires aiguës chez l'enfant moins de 5 ans	101
Conclusion	106
Résumés	108
Références	112

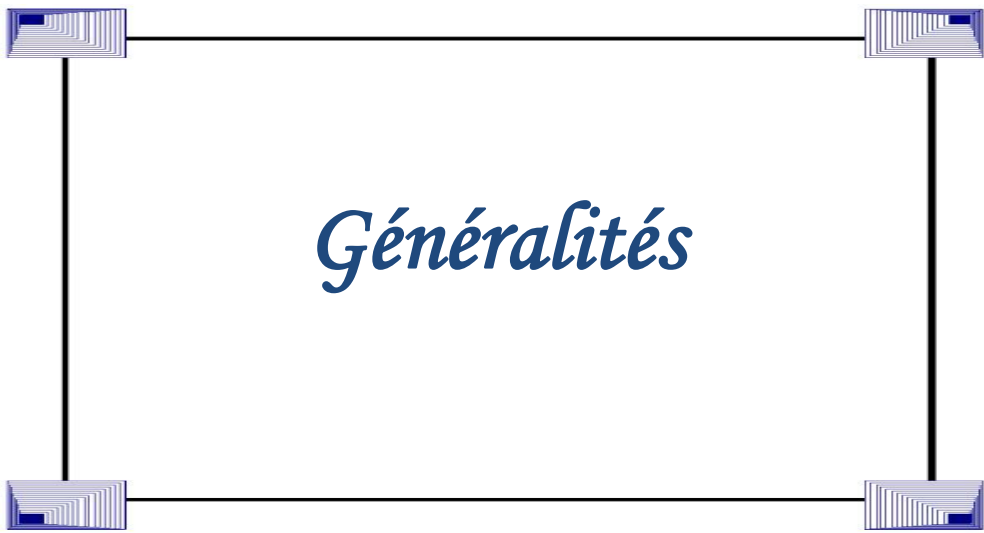


Les infections respiratoires aiguës (IRA) restent la principale cause de décès chez les jeunes enfants dans les pays de bas et moyen revenu, représentant près de 1,4 million de décès annuels et 18% des décès mondiaux chez les enfants de moins de cinq ans [1,2,3]. Des estimations récentes suggèrent que l'incidence mondiale des hospitalisations chez les jeunes enfants liées à des infections sévères ou très sévères des voies respiratoires inférieures peut atteindre 11,9 millions (IC 95,3 10,3-13,9 millions) et 3,0 millions (2,1-4,2 millions) d'épisodes annuels. Respectivement [2,4], représentant un fardeau énorme pour les systèmes de santé, généralement fragiles dans de tels contextes [4].

Les IRA sont parmi les causes les plus fréquentes de consultation chez les médecins dans le groupe d'âge pédiatrique [2]. Une proportion substantielle de cas de pneumonie et les décès sont attribuables à deux pathogènes bactériens, *Streptococcus pneumoniae* [5]. Et *Haemophilus influenzae type b (Hib)* [6]. Bien que leur charge et la répartition géographique diminuée depuis la mise en œuvre progressive des deux vaccins conjugués disponibles contre eux [7]. Inversement la charge des IRA liées au virus, tels que le *virus respiratoire syncytial (RSV)*, est de plus en plus reconnu cause de mortalité associée à la pneumonie [1, 3,8].

La capacité de détecter et de distinguer rapidement de multiples organismes infectieux est essentielle au diagnostic précis des épidémies saisonnières et sporadiques, et des pathogènes émergents [9]. Cela exige la disponibilité de tests de diagnostic suffisamment souples pour une identification rapide et précise de nouvelles cibles, car les tests de diagnostic conventionnel pour les pathogènes respiratoires sont limités par une sensibilité médiocre ou un temps d'exécution prolongé [10].

L'objectif de notre travail est de démontrer l'importance du séquençage multiplex (technique RespiFinder) basé sur l'amplification de la sonde multiplex ligand-dépendante (MLPA), dans la prise en charge diagnostique des infections respiratoires chez l'enfant de moins de 5 ans.



I. Définition :

Les IRA correspondent aux infections aiguës de l'oreille, du nez, de la gorge, de la trachée, de la broche, des bronchioles, ou des poumons. On distingue essentiellement deux types des IRA [11]:

- ❖ Les IRA du voies aériennes supérieures : infections du nez, de larynx, gorge, et de l'oreille moyenne
- ❖ Les IRA du voies aériennes inférieure : épiglotte, trachée, bronches, bronchioles, poumons.

Dans notre travail on s'intéresse aux IRA des voies aériennes inférieures ou appelées également les infections respiratoires aiguës basses communautaires (IRABC).

II. Rappels anatomophysiologiques des voies respiratoires

A. Anatomie des voies respiratoires

Les voies respiratoires sont des canalisations permettant le passage de l'air depuis le nez et la bouche vers les poumons et les alvéoles pulmonaires au cours de la ventilation. Elles sont classées en :

- ❖ Voies respiratoires supérieures ou voies aériennes supérieures (VAS) qui sont extra thoraciques :
 - Nez et fosses nasales
 - La bouche
 - Pharynx (carrefour aérodigestif)
 - Larynx (la gorge)
- ❖ Voies respiratoires inférieures (VRI) ou voies aériennes inférieures (VAI) qui sont intra thoraciques et réparties en 2 zones :

- Zone de conduction et transition :
 - Voies extra pulmonaires : trachée
 - Voies intra pulmonaires : bronches
- Zone respiratoire
 - Conduits et sac alvéolaires, alvéoles pulmonaires

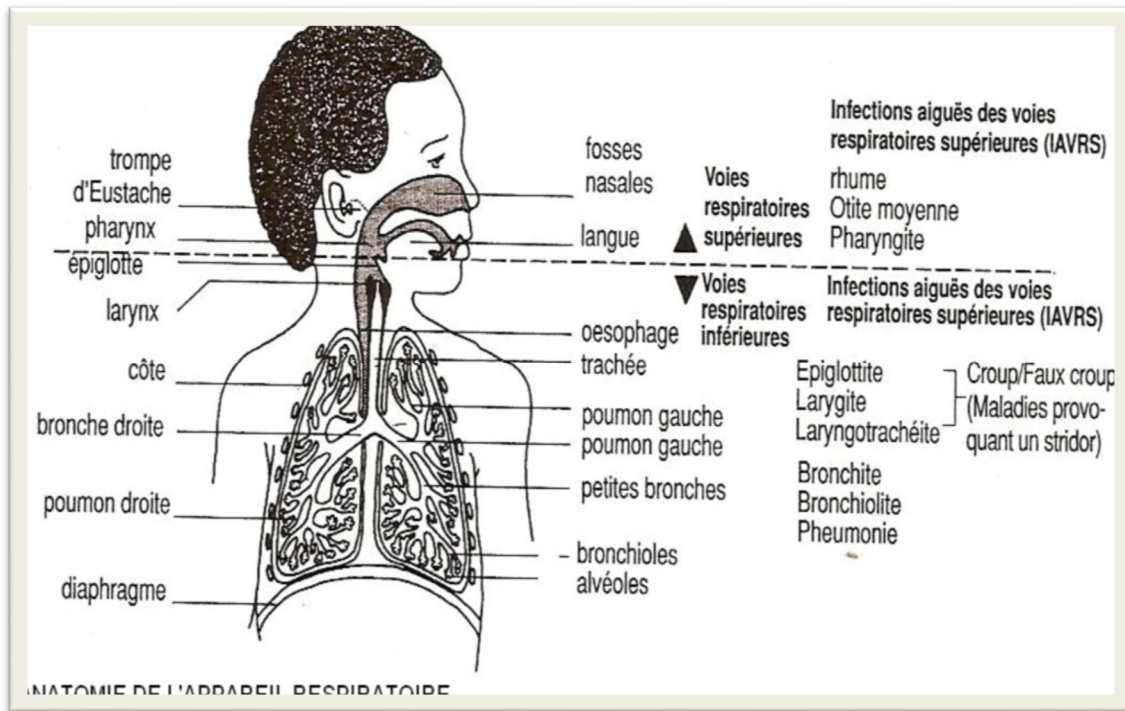


Figure 1 : Anatomie de l'appareil respiratoire [11- 12]

B. Physiologie et mécanismes de défense

1. Physiologie :

La physiologie respiratoire de l'enfant est différente de celle du jeune enfant surtout le nouveau-né. Normalement la pression partielle du sang en oxygène est de 75mmHg chez le nourrisson, le volume gazeux intra thoracique chez le nouveau-né est de 200ml, le rythme respiratoire du nourrisson varie entre 30 et 40 cycles/min. Par l'élimination de l'excès de CO_2 et l'enrichissement en O_2 du sang venant des cavités cardiaques droites, le poumon joue un rôle important dans la régulation de

l'équilibre acido-basique. Aussi les troubles de l'équilibre retentissent sur le poumon : il y a augmentation de la résistance artériolaire pulmonaire en cas d'acidose, l'alcalose provoque surtout des apnées [11].

2. Mécanismes de défense :

Les mécanismes de défense des voies aériennes sont nombreux, leur intrication garantit un résultat optimal. Dès la naissance, les voies aériennes supérieures (en particulier le rhino-pharynx) sont colonisées par une flore bactérienne saprophyte. Les voies aériennes basses, en particulier le « poumon profond », demeurent en principe stériles [13].

On décrit généralement deux lignes de défense. La première est constituée par le revêtement épithélial et l'appareil muco-ciliaire des voies aériennes, la seconde par le système immunitaire des muqueuses [14].

❖ Le revêtement épithélial :

Les cellules épithéliales (cellules ciliées, cellules caliciformes, cellules à bordure en brosse) constituent une ligne de défense mécanique car elles possèdent des récepteurs pour certaines protéines et pour des virus, en particulier les nombreux rhinovirus. Le renouvellement des cellules superficielles est assuré par les cellules basales. Toute rupture de la continuité cellulaire facilite la colonisation, puis la surinfection microbienne.

De plus, la structure anatomique des voies aériennes s'oppose à l'infection de façon mécanique par le jeu de la conformation anatomique particulière du nez et des fosses nasales, de nombreux changements de continuité, et des bifurcations bronchiques successives. Finalement, chez l'enfant, dans les conditions physiologiques, les voies aériennes inférieures sont normalement stériles.

❖ **L'appareil muco-ciliaire :**

Les cellules du revêtement épithélial sont munies de cils vibratiles en mouvement incessant ou métachrone. On désigne sous ce terme, un mouvement transmis de proche en proche, de cil à cil. Il est comparé de façon imagée aux ondulations que provoque le vent sur un champ de blé [14].

Les dyskinésies ciliaires primitives(DTCP) décrites par Afzelius sous le terme de « syndrome des cils immobiles » se traduisent par des infections sino bronchiques et par des bronchectasies en raison d'un défaut total et généralisé de l'épuration muco-ciliaire.

Toutes les agressions chimiques, physiques, ou infectieuses que subit la muqueuse respiratoire, entraînent des troubles plus ou moins durables du fonctionnement muco-ciliaire. Ainsi le tabagisme, passif ou actif, diminue la motilité ciliaire. De même l'infection à *virus respiratoire syncytial* (VRS) entraîne des lésions des cils (abrasion des cellules épithéliales, perte des cils, désorganisation de leur mouvement). Après la plupart des infections à virus ou à mycoplasmes, la normalisation de la fonction ciliaire demande largement plus de quatre semaines [14-15].

❖ **Le système immunitaire :**

Des formations lymphoïdes sont présentes sur toute la surface de la muqueuse respiratoire, ORL et bronchique. Ce système immunitaire muqueux est désigné sous le terme générique de MALT (Mucosa Associated Lymphoïde Tissue), constitué par le tissu lymphoïde de la muqueuse des fosses nasales et des sinus, de l'anneau de Waldeyer (végétations adénoïdes et amygdales palatines), et du BALT (Bronchial Associated Lymphoïde Tissue).

Son fonctionnement est schématiquement celui du système lymphoïde. Les stimulations antigéniques entraînent une multiplication, puis une différenciation des lymphocytes T (Th1 et Th2). Au cours de la réponse anticorps « primaire » les lymphocytes B immature produisent des immunoglobulines de type IgD et surtout des IgM, peu spécialisées. Les sollicitations antigéniques ultérieures des plasmocytes leur font produire des IgG et des IgA. La production des sous classes d'immunoglobulines est chronologiquement la suivante : IgG3, IgG1, IgA1, IgG2, IgG4, IgE, IgA2 [14-15].

Les IgA de sécrétion (IgAs) participent au phénomène d'exclusion antigénique.

Dès leur arrivée sur l'épithélium, les particules et surtout les germes sont captés par les IgAs, puis le tapis muco-ciliaire les entraîne vers le carrefour aérodigestif.

Au cours des déficits en IgA sériques et sécrétoires, ce défaut d'exclusion antigénique s'accompagne d'infections muqueuses digestives et respiratoires, plus fréquentes et/ou plus sévères.

❖ **Particularités pédiatriques :**

Le nouveau-né possède des anticorps de type IgG transmis par sa mère, qui va les perdre au cours des trois premiers mois, en particulier les IgG2. Dans le même temps, la capacité du jeune enfant à fabriquer des IgG2 est relativement limitée au cours des 12-18 premiers mois (« trou immunitaire »). Or ces immunoglobulines correspondent aux anticorps dirigés contre les polysaccharides constitutifs des capsules de nombreuses bactéries [14,16].

La production d'IgG chez le fœtus débute vers le 6ème mois, mais leur taux reste faible jusqu'au 8ème mois. Cette insuffisance est compensée par un transfert placentaire actif des IgG maternelles qui atteint son maximum à la 40ème semaine. Ainsi, le taux des IgG du nouveau-né normal peut être supérieur de 10% au taux de la mère. Les prématurés présentent, donc constamment une hypo-gamma-globulinémie : son intensité est corrélée au degré de la prématurité. De plus, le retard de croissance intra-utérin qui s'accompagne d'insuffisance placentaire entraîne aussi une hypo-gamma-globulinémie [14,17]. Par ailleurs, la synthèse des IgA est très lentement progressive : les valeurs définitives ne sont obtenues qu'après l'âge de 4 ans, souvent aux alentours de 8-10 ans. L'une des conséquences de cette immaturité immunitaire est le portage ORL de bactéries comme *streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella(Branhamella) catarrhalis* [17] . Le pourcentage d'enfants normaux dont le rhino-pharynx est colonisé par ces trois bactéries est relativement important : 19 à 26,7% pour *S. pneumoniae*, 13 à 18,7% pour *H. influenzae* et 28,3 à 36% pour *M. catarrhalis* [13,14]. Ainsi, à un moment donné, un enfant sur cinq est porteur au moins d'un de ces trois germes. Le pourcentage de colonisation dépend de l'âge, de l'ethnie, des conditions socio-économiques, de la présence d'une infection familiale, de la saison, du pays, des pathologies dont l'enfant est atteint, des antibiotiques reçus, des nombres de l'antibiothérapie, de la vaccination, et du mode de garde [17].

C. Physiopathologie :

La contamination des pneumopathies infectieuses est interhumaine. Les agents pathogènes responsables de la pneumonie ont plusieurs voies d'accès aux poumons. Bien que l'on dispose de peu d'informations sur la pathogénèse chez l'enfant, il est communément admis que souvent ce sont des bactéries déjà présentes dans le nez ou dans la gorge qui passent dans les poumons par inhalation et provoquent l'infection. Les agents pathogènes peuvent aussi être véhiculés par les gouttelettes en suspension dans l'air; la pneumonie peut aussi être consécutive à une infection du sang, l'inhalation des germes, parfois accidentelle (en cas de noyade, par exemple). Au moment de la naissance ou peu après, le nouveau-né court davantage de risques de contracter une pneumonie par exposition à des agents pathogènes dans la filière génitale, ou à des matières contaminées pendant l'accouchement [18].

III. Données épidémiologique

A. Morbidité et mortalité :

Parmi toutes les IRA, la pneumonie responsable de 15% du nombre total de décès des enfants de moins de 5 ans. C'est la première cause infectieuse de mortalité chez l'enfant. 922 136 enfants de moins de 5 ans sont morts de pneumonie en 2015. Elle représente 21% des décès en Afrique. Ce taux monte à 28% si on inclut la période néo-natale de 4 semaines après la naissance, soit près d'un tiers de la totalité des décès. La pneumonie à *pneumocoques* est plus meurtrière que la *rougeole*, le *paludisme* et le *sida* réunis alors que 30% seulement des malades ont accès aux traitements. La plupart des décès interviennent chez les enfants de moins de 2 ans et dans les pays les plus pauvres. Ce fléau peut être endigué notamment grâce à la vaccination anti-pneumococcique [19].

B. Facteurs de risque :

De nombreuses études ont mis en évidence la place des facteurs de risque dans l'importance des pneumopathies chez les enfants de moins de 5 ans. La fréquence annuelle des épisodes de pneumopathie se trouve élevée grâce aux facteurs et aussi ces facteurs augmentent le risque de complication surtout de détresse respiratoire [19] :

- Des facteurs saisonniers et climatiques : saison froide et saison des pluies dans les pays du Sud, influence directe du climat (température ambiante, teneur en eau de l'atmosphère) et indirecte (mode de vie, promiscuité)
- L'environnement : surpeuplement, pollution de l'air ambiant (tabagisme, fumées domestiques : feux de cuisine, chauffage au bois ou aux bouses)

- Le sexe masculin : sex-ratio 1,7/1
- L'âge : le risque de décès le plus élevé est chez le nourrisson de 1 à 3 mois
- La prématurité
- Déficit en zinc
- L'état nutritionnel : arrêt de l'allaitement maternel, malnutrition protéino énergétique,
- Un déficit immunologique congénital ou acquis (infection à VIH/Sida) - un bas niveau d'éducation du père et de la mère
- Un bas niveau socio-économique du pays.

C. Etiopathogénie

Les bactéries et les virus sont les principaux agents pathogènes responsables de broncho-pneumopathie chez l'enfant ; mais il est difficile de déterminer la part respective de ces agents.

De nombreuses études étiologiques ont montré que les infections bactériennes viennent compliquer les infections virales [11,20].

1. Les virus :

Ce sont le *virus syncytial* respiratoire et les *virus para influenzae I et II* ou *rhinovirus*. Leur porte d'entrée est surtout naso-pharyngien, ils entraînent des lésions locales ou étendues à tout le tractus respiratoire en se fixant sur les cellules épithéliales, par contre certains virus peuvent se diffuser dans l'organisme.

L'organisme a trois sortes de réactions face à l'agression virale :

- Réaction immuno-sécrétoire locale avec élévation des IgA sécrétoires.
- Réaction humorale qui intéresse surtout les IgG et IgM sériques.
- Réaction cellulaire.

2. Les bactéries :

Les plus fréquentes sont :

Haemophilus influenzae, le *pneumocoque* et le *staphylocoque*, l'infection bactérienne intéresse surtout la partie sous glottique de l'appareil respiratoire. L'étendu, la localisation et la systématisation des lésions déterminent la gravité du tableau clinique

2.1. Pneumocoque :

C'est le germe qui même s'il n'est pas le plus souvent en cause, doit être envisagé en premier car il donne les pneumonies les plus graves, quelques fois mortelles.

Selon une mise au point récente, publiée par “ British thoracic society” (BTS) ; on estime à 39% environ l'origine pneumococcique des pneumonies de l'enfant dans les pays développés [20].

2.2. Haemophilus influenzae type b :

L'hæmophilus influenzae est une bactérie présente dans le nasopharynx de plus de 15% des enfants non immunisés [20], La fréquence varie de 5 à 20% selon les pays et séries. Fréquent dans le tiers-monde, il tend à diminuer dans les pays où la vaccination est courante.

Les infections à *Haemophilus* ont toujours été très caractéristiques du jeune enfant de moins de un an.

2.3. Staphylocoque :

Il est devenu rare dans les pays occidentaux, 1% des causes de pneumonie après 18 mois à Paris. Il reste encore fréquent dans le tiers-monde et donne des atteintes pleuro pulmonaires gravissime avec une mortalité supérieure à 60 % à 4 jours d'évolution.

2.4. Mycoplasma pneumoniae

C'est la cause la plus fréquente des pneumonies de l'enfant de plus de 2 ans dans les pays occidentaux. La fréquence est sous-évaluée car l'infection n'est pas suffisamment recherchée.

Toutes les études ont bien montré que les infections à Mycoplasme sont exceptionnelles avant un an, assez rares entre 1 et 4 ans, et très fréquentes entre cinq et 15 ans [20].

Les infections respiratoires à mycoplasmes atteignent surtout l'enfant et l'adulte jeune et surviennent surtout en automne et en hiver.

2.5. Moraxella catharalis :

Le rôle de ce germe, assez fréquent dans les infections respiratoires hautes, est diversement apprécié dans les infections respiratoires basses.

2.6. Chlamydia pneumoniae :

Chlamydia pneumoniae est la principale chlamydia à l'origine des pneumonies communautaires. Leur fréquence dans les pneumonies de l'enfant est de l'ordre de 4 à 6 % et peut atteindre 10 à 14 % après dix ans quand on combine PCR et sérologie chez des patients ambulatoires [20], mais le portage asymptomatique peut alors entraîner une surestimation [20]

Chlamydia trachomatis : est à l'origine de pneumopathies sévères de la période néonatale, par transmission maternelle au moment de l'accouchement. Un germe dont l'importance est sous-estimé en pédiatrie

IV. Etude sémiologique des infections respiratoires aigues basses

A. Diagnostic clinique

Distinguer les infections des voies respiratoires hautes (au-dessus des cordes vocales) et basses (en dessous) nécessite une analyse clinique rigoureuse

L'inspection de l'enfant au repos, permet de juger de l'intensité et du type de dyspnée travers l'analyse des éléments suivants :

- Appréciation de l'état général ;
- Mesure de la fréquence respiratoire, au calme, (majorée par la fièvre);
- Recherche d'une cyanose
- Recherche de signes de lutte, parfois appelés signes de rétraction :
 - Battement des ailes du nez.
 - Tirage
- Geignements expiratoires ;
- Auscultation et percussion thoracique ;
- Examen des fosses nasales, de la cavité buccale et du pharynx ;
- Examen du tympan

Une atteinte des voies respiratoires basses peut être isolée ou être associée à une atteinte des voies respiratoires hautes. Toutefois la distinction entre infections des voies respiratoires hautes et basses n'est pas toujours facile, en particulier dans les infections d'origine virale.

1. Diagnostic positif

1.1. Examen Clinique :

Les éléments en faveur d'une infection respiratoire basse :

- Température supérieure à 38,5 °C ;
- Fréquence respiratoire (Fr) :

→ Tachypnée +++ :

- De 1- 12 mois > 50 cycles/min
- De 12 mois - 5 ans : > 40 cycles /min.

- Geignement expiratoire ;
- Refus ou difficultés de boire, surtout chez le nourrisson de moins de 1 an;
- Signes de lutte ;
- Anomalies à l'auscultation pulmonaire, diffuses ou localisées.
- La toux

1.2. Examen paraclinique :

1.2.1. Examen radiologique :

La preuve d'une pneumonie ne peut être obtenue que par la radiographie de thorax. Le diagnostic radiologique de pneumonie repose sur la présence d'une opacité parenchymateuse :

Opacité alvéolaire unique ou multiple, exceptionnellement bilatérale souvent systématisée avec éventuel broncho gramme aérien.

Atteintes interstitielles (réticulaires ou reticulo-nodulaires) des hiles vers la périphérie.

1.2.2. Examens biologiques

Limites en ambulatoire à la Numération de formule sanguine (NFS), la CRP et la procalcitonine

1.2.3. Examens microbiologiques

→ Hémoculture :

Examen de référence avant l'antibiothérapie, sans la retarder. Positive, elle apporte la certitude

→ Examen cyto bactériologique des crachats :

Réalisation et interprétation difficile chez l'enfant

Pas d'intérêt en ambulatoire.

→ Sérologies :

Intérêt épidémiologique certain.

→ Biologie moléculaire PCR (Polymérase Chain Réaction) :

❖ PCR multiplex (15-20 agents détectés)

Analyse sur séquenceur automatique/ analyse par approche Luminex :

2. Diagnostic différentiel :

a. Infection des voies respiratoires hautes. En faveur :

- Rhinorrhée, obstruction nasale, pharyngite, otite ;
- Une auscultation normale des deux champs pulmonaires.

b. Corps étranger infra-bronchique :

- Début rapide, sans rhinite préalable ;
- Interrogatoire des parents : syndrome de pénétration ?

B. Les tableaux cliniques

La plupart des décès par les infections respiratoires aiguës sont dus à des infections aiguës des voies respiratoires inférieures [21].

Cependant toutes les infections aiguës des voies respiratoires inférieures ne sont pas graves par exemple la bronchite est relativement fréquente mais rarement mortelle [22].

1. La bronchite ou la trachéobronchite aiguë :

C'est l'inflammation de l'arbre trachéobronchique le plus souvent d'origine virale (Virus Respiratoire Syncytial, Virus para influenza, Virus influenza A et B.). Cependant des bactéries (*Hémophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) sont responsables des poussées de surinfection des bronchites chroniques.

Une toux fréquente parfois émetisante, en général plus nette en couchée que debout caractérise cette entité.

2. La bronchiolite aiguë du nourrisson :

L'étiologie est presque exclusive : le *Virus Respiratoire Syncytial*.

Toujours précédée par une infection des voies aériennes supérieures, la bronchiolite peut s'installer brusquement par une dyspnée impressionnante; la respiration rapide et superficielle avec tirage sous et intercostal et balancement thoraco-abdominal, le thorax dévie distendu, hypersonore, A l'auscultation il existe un sifflement avec quelques râles fins disséminés et des sibilants. L'auscultation à distance retrouve souvent un « wheezing ».

La radiographie pulmonaire montre une hyperclarté diffuse avec abaissement des coupes diaphragmatiques, une distension thoracique avec horizontalisation des côtes.

La cyanose, la sueur, les troubles de la conscience signent la gravité de cette pathologie et indiquent l'épuisement. En cas de répétition de ces symptômes à plus de deux reprises, il est préférable de parler alors **d'Asthme du nourrisson**.

3. La staphylococcie pleuro pulmonaire :

Survient à tout âge mais surtout avant 6 mois. Le tableau clinique associe :

- Des signes généraux : température à 39-40°C, asthénie ;
- Des signes respiratoires : **polypnée**, toux sèche, tirage, cyanose ;
- Des signes abdominaux : **météorisme abdominal** qui peut faire penser à une occlusion.

L'examen physique retrouve surtout une matité et parfois une diminution modérée du murmure vésiculaire.

4. La pneumonie franche lobaire aiguë (PFLA) :

Souvent due au pneumocoque, le début est brutal avec des signes généraux, une fièvre sup à 39 °C avec frissons et une altération de l'état général, le tout accompagne de douleurs thoraciques à type de point de cote associé a une tous productive.

L'examen physique retrouve une matité localisée, une augmentation des vibrations vocales, une diminution du murmure vésiculaire et un souffle tubaire parfois entouré de râles crépitants.

La radiographie thoracique de face et profil montre une opacité homogène segmentaire bien limitée avec bronchogramme aérique.

Deux formes cliniques importantes marquent la particularité chez l'enfant :

- Des vomissements et des douleurs abdominales pouvant simuler une urgence abdominale ;
- La forme pseudo méningée avec céphalées, vomissements, nuque douloureuse, faisant discuter l'opportunité d'une ponction lombaire.

5. Les pneumopathies virales ou apparentées :

Elles ont comme prototype la pneumonie atypique primitive à *Mycoplasma pneumoniae*. Comparativement à la PFLA, les signes distincts de la pneumonie atypique ont un début moins brutal, une fièvre moins élevée avec des symptômes ORL associés et surtout une toux sèche puis productive. L'aspect radiologique typique est celui de la pneumonie interstitielle. Le diagnostic est confirmé par la sérologie.

La triade symptomatique, trouble respiratoire avec altération fébrile de l'état général, et signes neurologiques doit orienter vers une adénovirose, surtout s'il existe des symptômes associés tels que les adénopathies, une pharyngite, une conjonctivite et une éruption diverse.

Le diagnostic d'une broncho-pneumopathie d'origine viral repose sur des arguments épidémiologiques (notion d'une épidémie de crèche...), cliniques (catarrhe oculo-nasal) et biologique (leuconéutropénie, lymphocytose).

6. Les pneumopathies récidivantes :

Se définissent comme des foyers radiologiques persistant plus de 15 jours ou se répétant à quelques mois d'intervalle (2 ou 3) dans le même territoire. La radiographie du thorax doit être faite non seulement devant un épisode fébrile avec foyer auscultatoire mais également devant une toux qui persiste plus de 15 jours ou qui récidive.

❖ **La pneumopathie récidivante ou persistante dans le même territoire :**

La fibroscopie bronchique s'impose à la recherche :

- D'un corps étranger passé inaperçu et qui, laissé en place
- D'une compression extrinsèque par une adénopathie ou une malformation congénitale (kyste broncho génique, malformation vasculaire ou bronchique...)
- Des tumeurs plus rares telles les carcinomes mucoépidermoïdes ou autre tumeur.
- D'un granulome tuberculeux

❖ **Les pneumopathies récidivantes dans des territoires différents :**

Quatre étiologies doivent être évoquées :

- La sinusite ou le foyer infectieux ORL.
- L'asthme se révèle fréquemment par des épisodes de pneumopathies récidivantes de l'enfant.
- La mucoviscidose.
- La résistance aux antibiotiques est une hypothèse qu'il faut systématiquement étudier surtout si la pneumopathie récidive dans un laps de temps court (inférieur à un mois).

V. Prise en charge thérapeutique

A. Hospitalisation :

L'hospitalisation est rarement nécessaire. Elle doit être demandée en cas de gravité du tableau clinique

Tableau 1: Critères de gravité et d'hospitalisation

❖ Signes respiratoires :
- Tachypnée > 60c /min pour enfant plus de 2 ans et > 70 si moins de 2 ans - Signes de lutte respiratoire - Geignement - SaO ₂ < 92 % - Signes d'Hypercapnie : sueurs, HTA
❖ Signes digestifs :
- Vomissements, Refus de boire, Déshydratation. - Fièvre mal tolérée ; asthénie importante.
❖ Terrain :
- Déficit immunitaire, Drépanocytose, Cardiopathie congénitale, Mucoviscidose Dysplasie broncho-pulmonaire, Age < de 6 mois, Asthme sévère
❖ Signes radiologique :
- Abscès, extension aux deux lobes, Epanchement pleural

B. Traitement symptomatique

- Repos au lit, maintenir l'enfant dans des bonnes conditions thermiques.
- Dégager le nez.
- Oxygénothérapie
- Eviter la déshydratation.
- Prévenir la malnutrition.

C. Antibiothérapie

L'impossibilité d'écarter un processus bactérien explique la décision de mise en route rapide d'une antibiothérapie probabiliste sans délai quel que soit l'âge, avec réévaluation clinique indispensable à 48-72 heures [23]. Voir (tableau 2).

1. Avant l'âge de 3 ans :

L'amoxicilline per os (80 à 100 mg/kg en trois prises par jour) est recommandée en première intention pendant dix jours. Le pneumocoque étant le 1^{er} agent responsable des pneumonies de l'enfant avant 3 ans [23].

2. Après l'âge de 3 ans :

L'amoxicilline (80 à 100 mg/kg en trois prises par jour) est prescrite en première intention avec un macrolide (14 jours) s'il y a suspicion de pneumonie atypique (*Mycoplasma et C. pneumoniae* [23]).

En l'absence d'amélioration ou devant une aggravation, un facteur de risque doit être recherché, tel que la drépanocytose, une infection à *VIH/Sida*, ... Une autre étiologie que le pneumocoque, une résistance du pneumocoque aux antibiotiques prescrits doivent aussi être recherchées [19].

Tableau 2: Antibiotiques utilisés dans le traitement des pneumonies bactériennes de l'enfant

a.	Amoxicilline : 100 à 200 mg/kg/24H per os, par I.V. en 4 fois
b.	Amoxicilline +acide clavulanique : 80 mg/kg/24H en 3 fois
c.	Erythromycine : 50 mg/kg/24H per os en 3 fois
d.	Oxacilline : 150 à 200 mg/kg/24H par I.V. en 3 à 4 fois
e.	Gentamycine : 5 mg/kg/24H par I.M. en 2 fois
f.	Céfotaxime : 50 à 100 mg/kg/24H par I.V. en 3 à 4 fois
g.	Cefazoline : 100 mg/kg/24H par I.V. en 3 à 4 fois
h.	Cortimoxazole : 8 mg/kg/24H de triméthoprim per os en 2 fois
i.	Cefuroxime : 20 à 30 mg/kg/24H per os en 3 fois

D. Traitement en dehors de l'antibiothérapie

1. Kinésithérapie respiratoire :

Il faut la débiter à la phase sécrétant de la pneumopathie pour une durée de 6 séances, l'accélération du flux expiratoire semble la méthode de référence. Elle augmente la clairance du mucus. Malheureusement il n'existe pas d'études évaluant l'action de la kinésithérapie. Mais il semble évident qu'un jeune enfant dont la toux est peu efficace va bénéficier de ce drainage [20].

2. Fluidifiants bronchiques :

IL s'agit des mucolytiques vrais et mucorégulateurs tel que (Apixol®, Akintex®, Stodal ®, Drill®). Bien que leur prescription soit fréquente, aucune étude pédiatrique n'a montré leur intérêt dans ce contexte et il n'existe aucune étude de pharmacocinétique chez l'enfant. La prescription de ces produits n'est donc pas justifiée dans les pneumopathies communautaires de l'enfant [20].

3. Antis inflammatoires :

La corticothérapie est proposée en cas de pneumopathie avec Atélectasie d'un lobe ou d'un segment sans que cette attitude ait été évaluée par des études randomisées et contrôlées [20].

E. Prévention des IRA chez l'enfant :

Pour diminué le nombre des décès par pneumonie, il faut aussi appliquer des mesures préventives efficaces afin que les enfants soient en meilleure santé et courent moins de risques de contracter cette pathologie [24].

1. Mesures spécifiques : les vaccinations

La vaccination permet de lutter contre les décès dus à la pneumonie. Elle évite d'abord que l'enfant ne contracte des infections, à *Haemophilus influenzae* type b (Hib) par exemple, susceptibles d'entraîner directement des pneumonies, ou d'autres maladies infectieuses dont la pneumonie pourrait être une complication (coqueluche ou rougeole, par exemple) [24].

Le programme national d'immunisation (PNI), intégrée trois vaccins peuvent réduire sensiblement le nombre des décès d'enfants par pneumonie, par exemple les vaccins antirougeoleux, antipneumococcique conjugué, et anti-Hib (voir Annex2)

2. Mesures non spécifiques

La prévention passe principalement par une nutrition adéquate (notamment l'allaitement au sein et l'apport en zinc), et la lutte contre la pollution de l'air à l'intérieur des locaux. Les enfants séropositifs courent moins de risques de contracter une pneumonie associée au *VIH* si on leur administre une dose quotidienne de co-trimoxazole. Selon de récentes études, le lavage des mains permettrait aussi de réduire l'incidence de la pneumonie [24].



*Biologie moléculaire :
Séquençage multiplex
Multiplex*

I. Introduction :

L'ordre des nucléotides dans les chaînes des acides nucléiques (AN) détient le secret de l'hérédité, des propriétés biochimiques du métabolisme et des maladies. Ainsi le séquençage devient indispensable dans les domaines de la recherche, de la biotechnologie et du diagnostic médical [25].

Le domaine du séquençage a pu se développer suite au principe de Sanger et Gilbert qui a mérité le prix Nobel en 1977. C'est un séquençage par des techniques de terminaison de chaîne ou de fragmentation chimique couplées à la séparation granulométrique par électrophorèse sur gel.

Dans le séquençage de Sanger l'ADN cible est copié plusieurs fois en produisant des fragments d'ADN de longueur différente. Des nucléotides fluorescents, terminateur de chaîne, marquent la fin du fragment et arrêtent le séquençage [26].

Au cours des années, la méthode de Sanger est devenue la méthode de choix, et a connu un certain nombre d'améliorations facilitant le développement des machines de séquençage de plus en plus automatisées. En 2005 les technologies NGS (Next Generation Sequencing) ont révolutionné de nouveau le monde des analyses et de la recherche médicale. De ce fait on parle de séquenceur de 1^{ère} génération, 2^{ème}, 3^{ème} et récemment 4^{ème} génération.

Dans cette partie nous détaillons le séquençage de 1^{ère} génération qui à la différence de la 2^{ème} et 3^{ème} génération nécessite la préparation de la librairie d'ADN (1^{ère} PCR qui résultent en amplicons) avant l'étape de séquençage. Ceci en utilisant la technologie Respifinder.

II. Généralités

A. Séquençage :

Est une technique de biologie moléculaire qui se base sur l'utilisation de marqueurs de couleurs fluorescentes (Fluorochromes) pour chaque type de base. Ces marqueurs sont attachés aux quatre didésoxynucleotides terminaux utilisés lors de la réaction du séquençage de l'ADN selon le principe de Sanger. Ce dernier repose sur le même principe de la PCR et fait appel aux mêmes ingrédients avec un plus qui est le didésoxynucleotide [26].

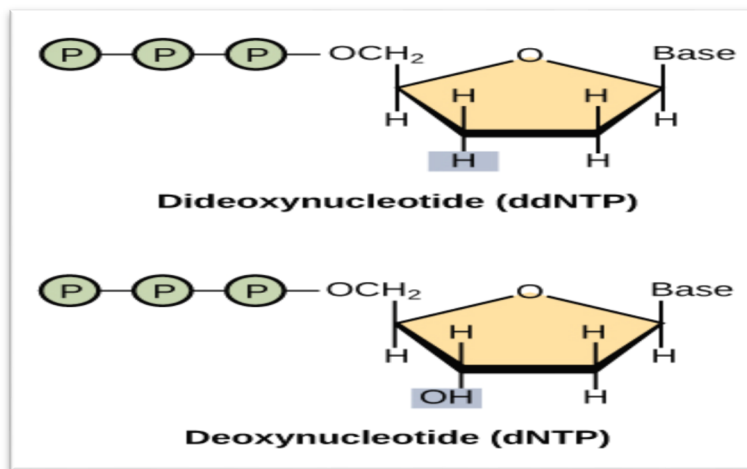


Figure 2: Différence entre désoxynucleotide et didésoxynucleotide

1. Méthode classique :

a. Principe

Dans la méthode classique dite également manuelle : la réaction nécessite une amorce d'ADN, une matrice monocaténaire, une enzyme ADN polymérase, ainsi que des désoxy- et didésoxy-nucléotides. L'ADN est divisé en quatre parties aliquotés dans 4 tubes différents, dont chacun contient les quatre désoxynucleotides standards (dATP, dGTP, dCTP et dTTP) avec l'un des quatre didésoxy-nucléotides (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) en présence de de l'ADN polymérase. En effet on effectue quatre différentes réactions de séquençage (Voir figure ci-dessous).

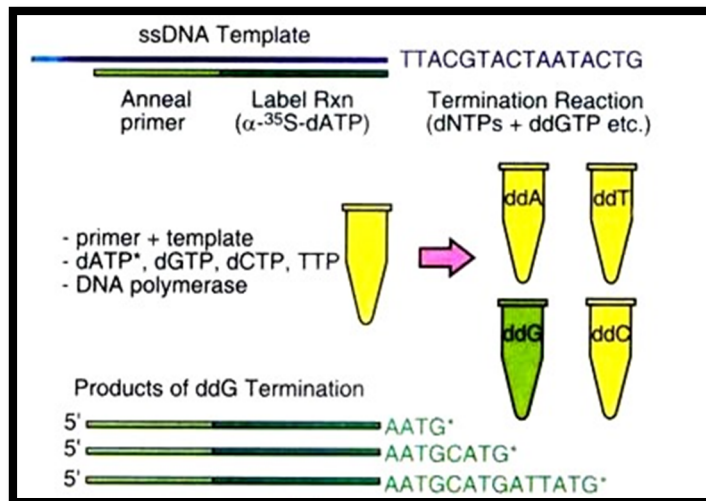


Figure 3 : Principe de la réaction de Sanger

Chaque réaction aboutit à la formation d'un segment d'ADN de taille différente suite à l'incorporation du nucléotide modifié (didésoxynucléotide) par l'ADN polymérase. La réaction d'élongation s'arrête et permet d'identifier la base finale [26]. (Voir exemple ci-dessous)



Figure 4: Exemple du tube de réaction du nucléotide G (dGTP, ddGTP)

Ces fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Leur migration se fait selon la différence de taille. Après séparation de chacune des quatre réactions dans l'une des quatre voies individuelles (lignes A, T, G, C), les bandes d'ADN sont visualisées soit par autoradiographie soit par lumière UV, et la séquence est lue manuellement à partir des quatre cycles parallèles.

b. Lecture manuelle :

Lire du plus petit au plus grand :

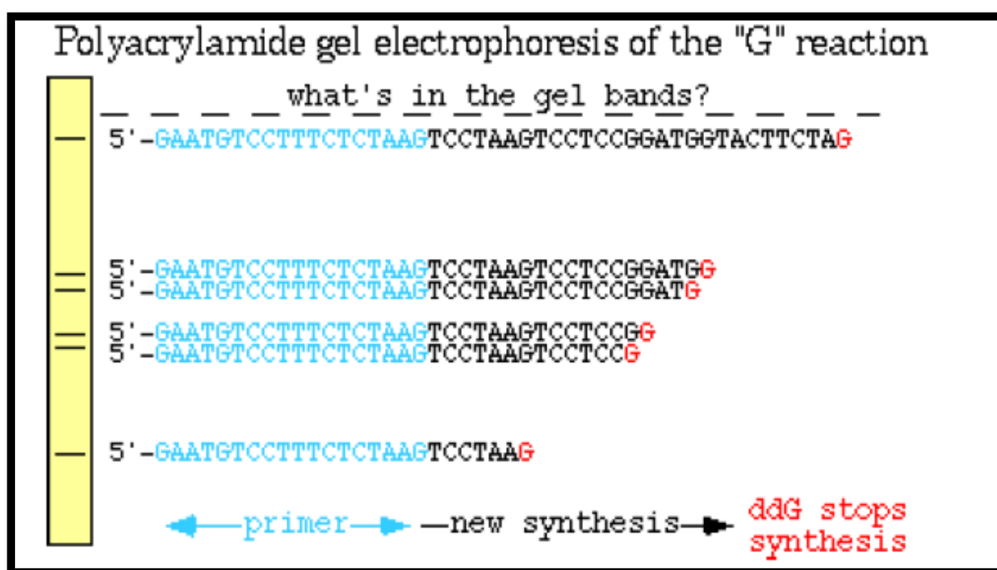


Figure 5: Exemple de gel de migration pour une seule réaction : G réaction

- ❖ Pourquoi lire du plus petit au plus grand ?
- ❖ Lire du plus petit vers le plus grand revient à lire de la ligne d'arrivée vers la ligne de départ (puits de migration). Le plus petit fragment correspond au nucléotide stop le plus proche de l'amorce tandis que le plus grand segment correspond au didésoxynucléotide le plus loin de l'amorce. De ce fait, nous avons une partie fixe qui se répète dans chaque fragment. Autrement dit : le grand segment inclut les autres petits qui sont partis loin de ce dernier et ainsi de suite.

De la même façon que l'exemple de la réaction G, les quatre réactions peuvent être migrées l'une à côté de l'autre sur le même gel, et la séquence de l'ADN est déduite suite à l'alignement des différents fragments des quatre réactions (G, A, T et C); du plus petit fragment au plus grand sous forme d'échelle (voir schéma ci-dessous).

De cette façon, nous arrivons à reconstituer le segment 5'-3' (TCCTAAG ...), et par la suite déduire le segment du départ par complémentarité, DNA Template, (AGGATTC ...) [27].

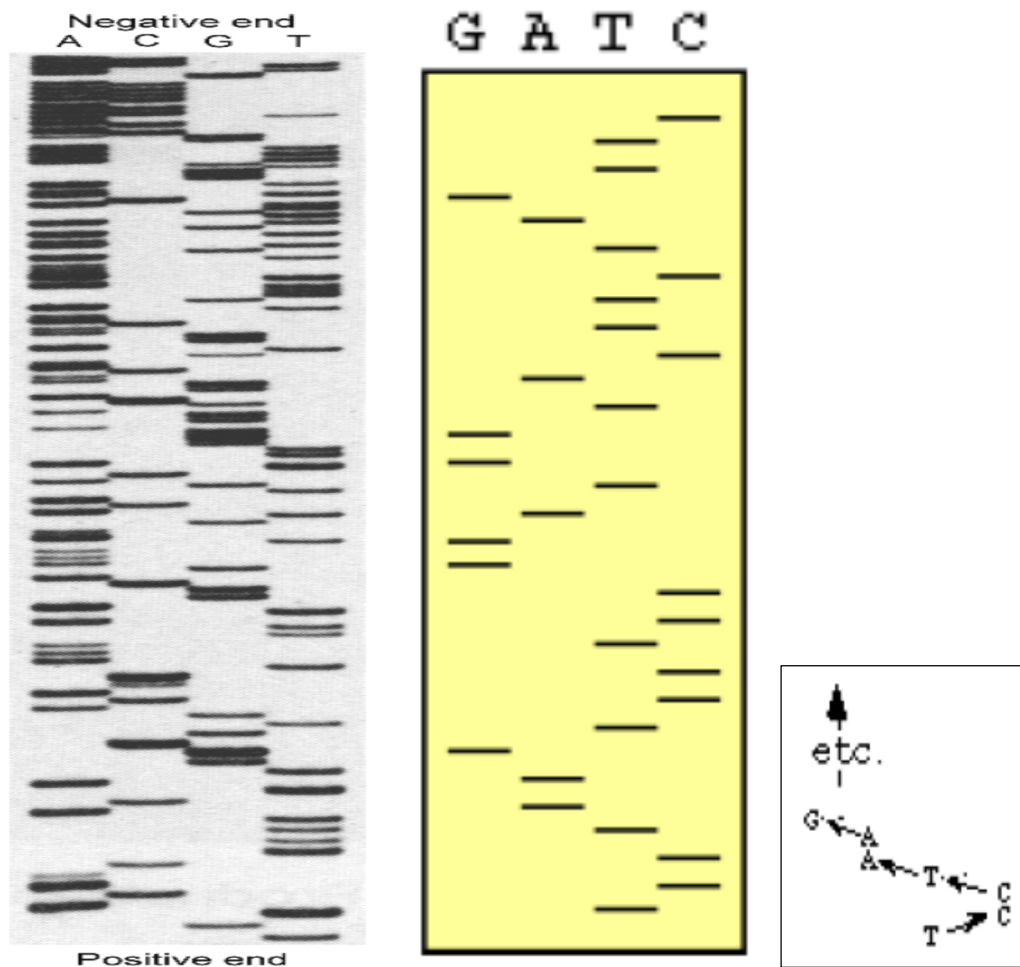


Figure 6: Lecture manuelle de la séquence d'AD

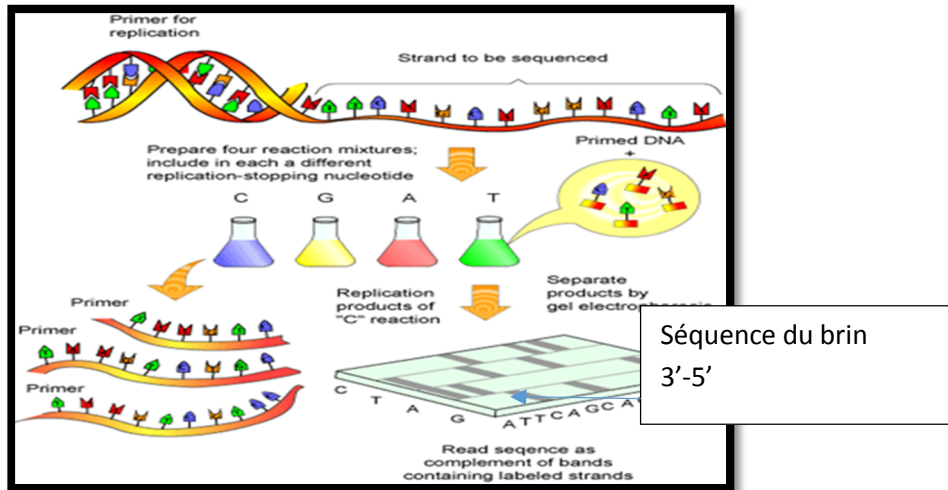


Figure 7: Schéma résumant les différentes étapes du séquençage classique

2. Méthodes modernes [27]

a. Principe :

Dans les méthodes modernes, le séquençage s'effectue en une seule réaction : un seul tube peut contenir l'ensemble des ingrédients précédents et les quatre didésoxynucléotides lesquels, cette fois ci, sont marqués (fluorochromes).

De cette façon, on obtient des fragments de différentes tailles dont la terminaison est un didésoxynucleotide fluorescent (couleur bleue, rouge, verte et jaune).

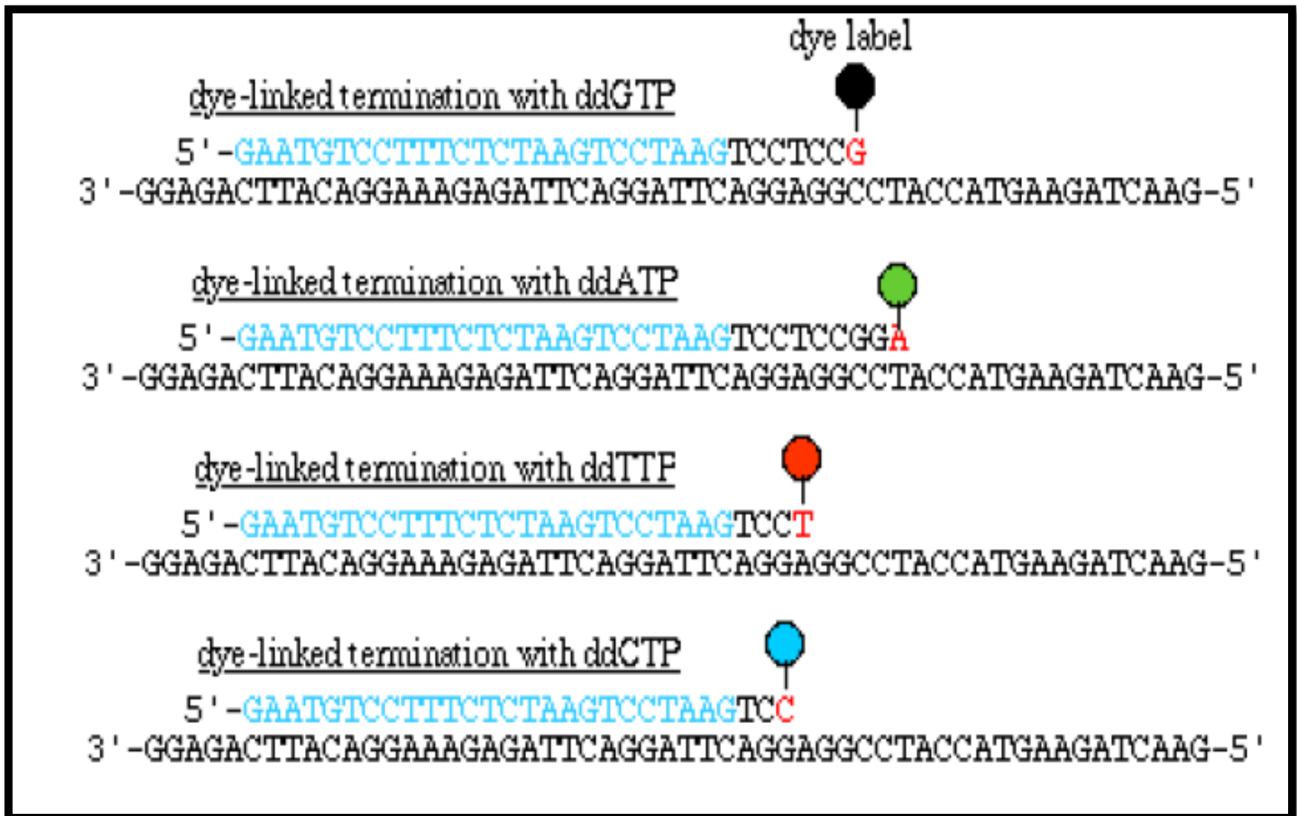


Figure 8 : Exemple de 4 réactions (A, G, T et C) dans un seul tube

Ces bases sont par la suite séparées par électrophorèse capillaire à travers un polymère fluide pompé dans chaque capillaire : quatre réactions se font dans une seule voie sur un gel.

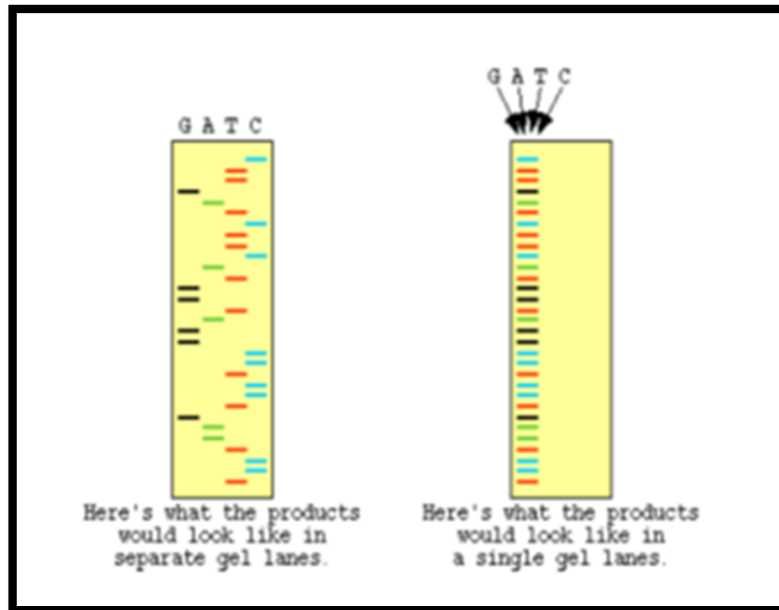


Figure 9: Comparaison du séquençage classique vs séquençage fluorescent

Une machine balaie la voie avec un laser. La longueur d'onde de fluorescence du marqueur conjugué aux ddNTP est interprétée par la machine comme une indication de la réaction (ddG, ddA, ddT ou ddC) d'une bande d'ADN particulière. L'intensité de la fluorescence se traduit en données sous formes de pics (Voir exemple ci-dessous).

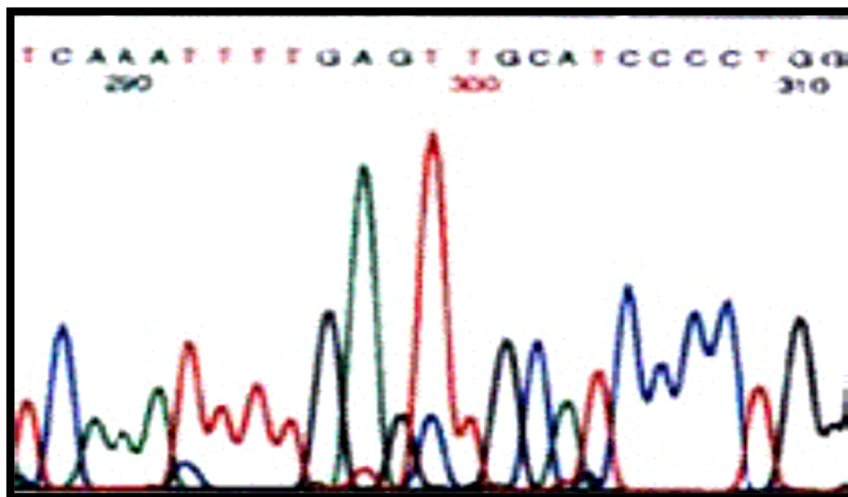


Figure 10: Pics des différents fragments

b. Lecture automatisée :

Les petits fragments migrent plus vite que les plus gros et atteignent le détecteur en premier. Dans la cellule de détection les fluorochromes fixés à l'ADN sont excités par un étroit faisceau de la lumière laser qui est dirigé dans le plan des capillaires des deux côtés à la fois du dessus et de dessous. Le système capte la lumière fluorescente sur l'optique de l'instrument, tout en bloquant la lumière laser. Ils sont convertis en données multi-colorants pour l'ensemble de l'exécution grâce à des programmes informatiques. L 'analyseur génétique est un exemple pratique de la dite technologie [28].

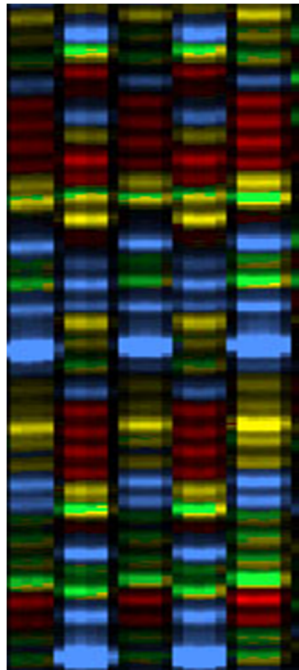


Figure 11 : Image du gel de migration automatisé avec les différentes couleurs des nucléotides

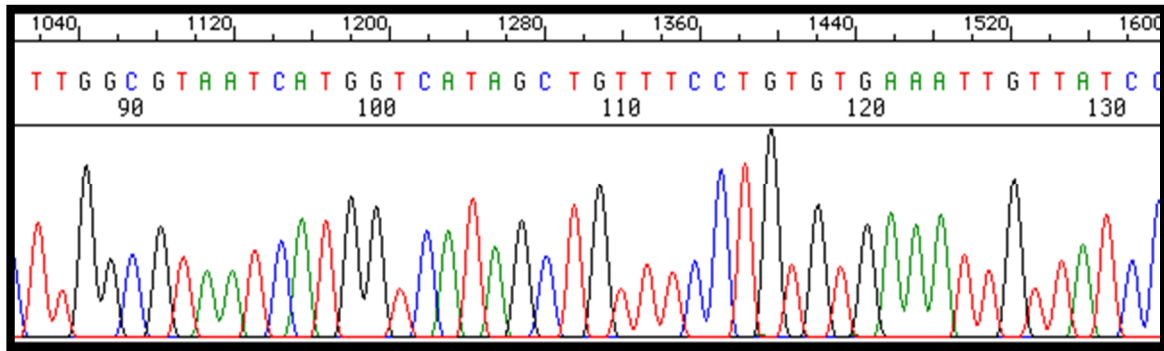


Figure 12: Représentation des différents couleurs du gel sous forme de pics

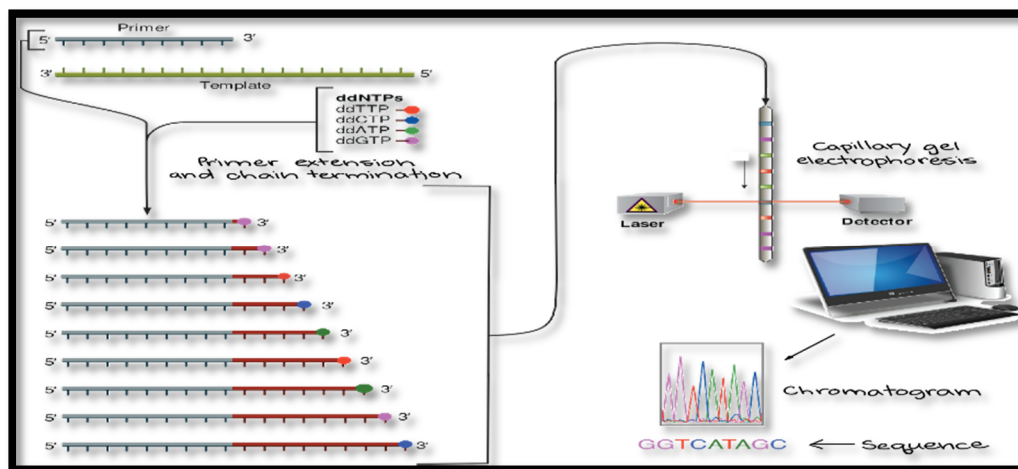


Figure 13 : Schéma résumant le séquençage méthode moderne

3. Amplification multiplexe de sondes dépendant de ligation

a. Définition :

La MLPA (Mutiplex Ligation Probe Dependent Amplification) est une technique de quantification relative puisqu'elle se fait toujours par rapport à un ou plusieurs témoins négatifs étudiés en parallèle et issus d'un échantillon de même nature. C'est un séquençage ciblé, la région à détecter est déjà limitée par les sondes (voir figure 14) [29-30, 31-32].

b. Principe :

Le principe général est fondé sur l'hybridation à une séquence cible spécifique de deux oligonucléotides adjacents formant une sonde unique après ligation en utilisant une enzyme thermostable appelée ligase. Ces produits de ligation seront ensuite amplifiés par PCR multiplexe grâce aux amorces universelles. Le produit d'amplification de chaque sonde a une longueur unique allant de 130 pb à 400 pb. On obtient vers la fin comme dans la réaction de Sanger des fragments de différentes tailles (voir figure 15).

L'une des deux amorces étant marquée par un fluorochrome, permettra la détection des différents fragments obtenus, après leur séparation électrophorétique sur un automate de séquençage. Les signaux fluorescents des sondes seront normalisés afin de permettre la quantification de la séquence cible [29-30, 31-32].

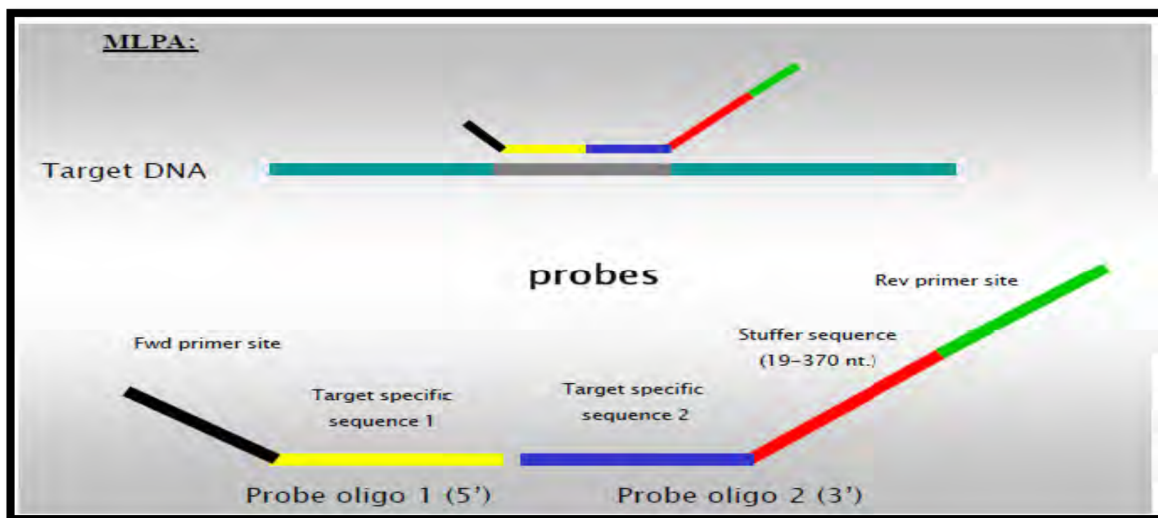


Figure 14 : Exemple de sonde avec ces différentes parties

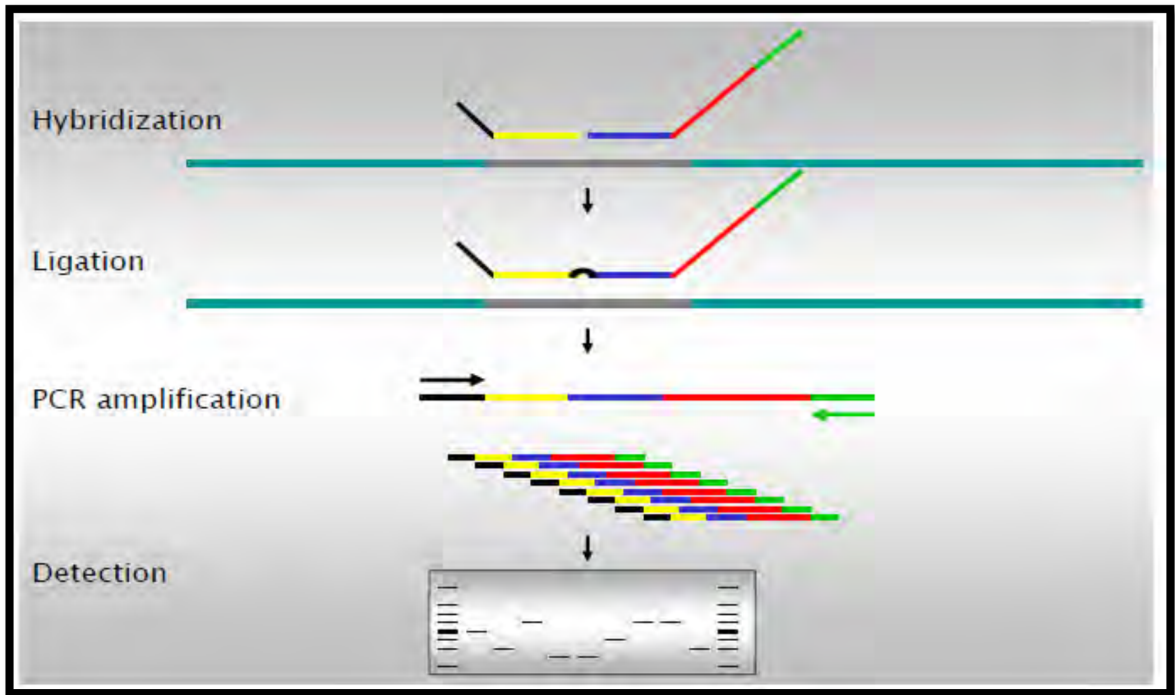


Figure 15 : Schéma des différentes étapes de la MLPA

c. Lecture :

De même que la réaction de Sanger, l'identification des fragments se fait par électrophorèse capillaire selon le même principe (voir figure 16). Cependant la différence réside dans le logiciel utilisé : dans le cadre de la MLPA on parle d'analyse de fragments et le programme assurant la correspondance taille du fragment-séquence cible s'appelle Size Calling au lieu de Base Calling.

Ainsi et afin de quantifier les éventuelles variations observées, on procédera à la normalisation des intensités des signaux des sondes amplifiées. Cette normalisation se fera à la fois par rapport à des sondes de référence (ou contrôles) incorporées dans le mélange réactionnel et servant « d'étalon interne » et par rapport aux échantillons d'ADN de même nature servant de contrôles négatifs [29-30, 31-32].

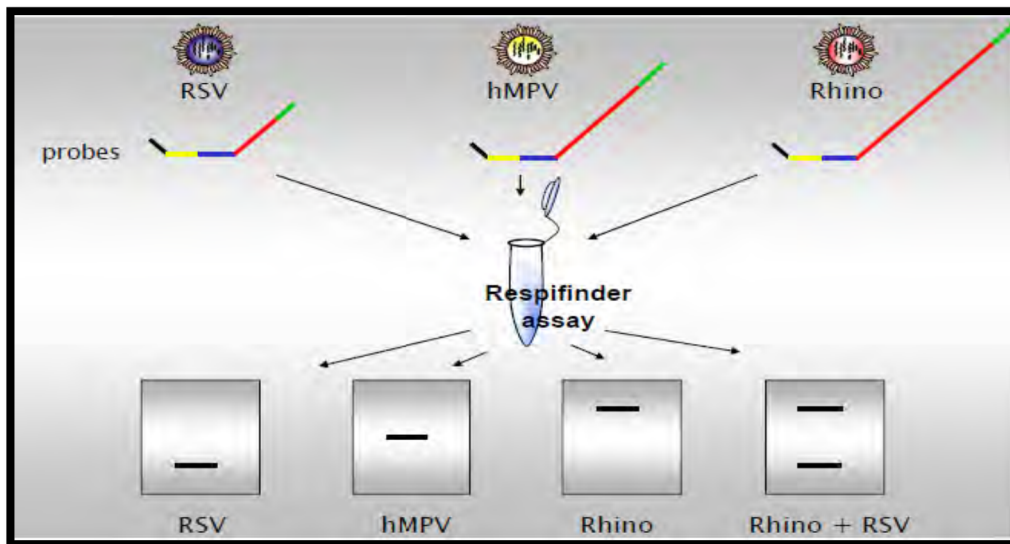


Figure 16 : Identification des différents Virus en se basant sur la taille des fragments obtenus

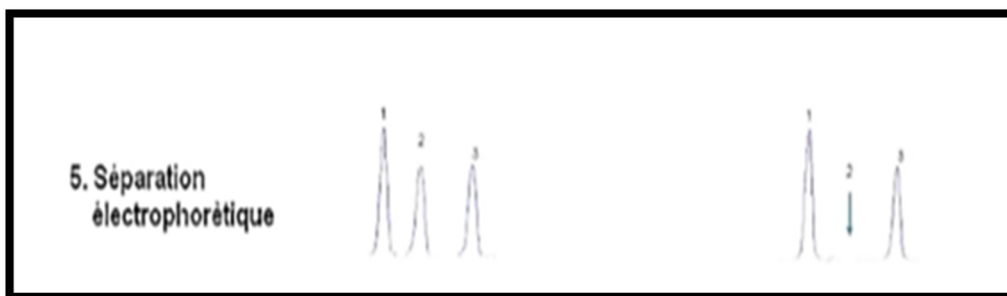


Figure 17 : Représentation des résultats sous forme de pics

4. Réaction de Sanger Vs MLPA :

Le séquençage selon la réaction de Sanger reste la technique de référence. Malgré le développement de plusieurs technologies, elle est toujours utilisée pour étudier les zones non analysables par les autres techniques nouvellement développées. Ceci, car elle assure l'analyse d'un exon par exon même s'il s'agit d'une analyse d'un seul gène. Egalement elle est sollicitée pour la confirmation des mutations découvertes pour éliminer les faux positifs toujours présents dans les nouvelles techniques.

La MLPA de son coté est une technique de séquençage de plusieurs gènes mais d'une manière ciblée, elle fait appel à des sondes qui limitent la région de séquençage.

Les deux techniques aboutissent vers la fin à l'obtention de fragments de taille différente, marqués par fluorescence (amorces ou bien didéoxynucléotide). La migration de ces derniers se fait dans l'analyseur génétique le 3500 via l'électrophorèse capillaire. L'identification des morceaux et des séquences diffère de point de vue le logiciel utilisé (Size Calling ou Base Calling).

Le tableau ci-dessous résume les points de convergences et de divergences entre les deux techniques :

Tableau 3 : Comparaison entre le séquençage de Sanger et la MLPA

	Réaction Sanger	MLPA
Définition	Séquençage	Séquençage ciblé
Principe	Amorces Didéoxynucléotides fluorescents	Amorces +Sondes Amorces fluorescentes
	Dénaturation Hybridation Séquençage	Dénaturation Hybridation Ligation Amplification
Fluorescence	Les didéoxynucléotides (ddNTP)	Les amorces
Lecture	Purification	Pas de purification
	Electrophorèse capillaire	Electrophorèse capillaire
	Détermination de l'ordre des bases du fragment d'ADN	Détermination de la taille des différents fragments
	Base calling	Size calling

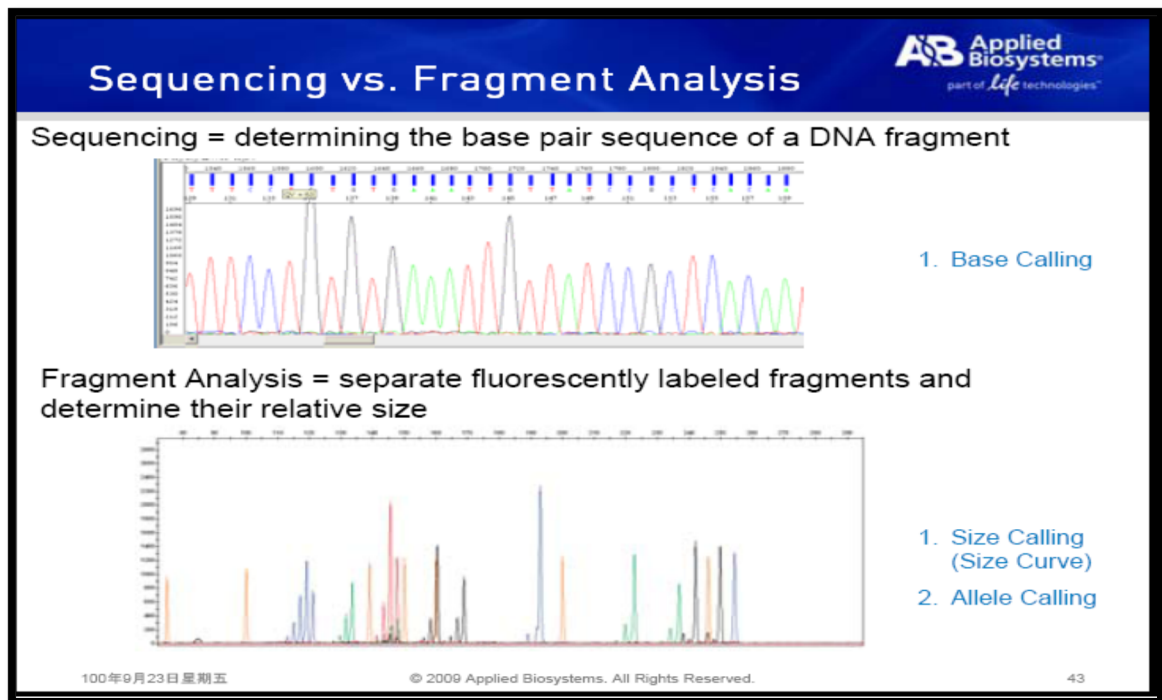


Figure 18: Résultats de réaction de Sanger VS MLPA

B. Système du séquençage :

“ Analyseur génétique 3500”

1. Principe de fonctionnement :

C'est un instrument d'analyse d'ADN basé sur la fluorescence, en utilisant la technologie d'électrophorèse capillaire dotée de 8 capillaires à la différence du 3500 xL (24 capillaires). C'est un système semi-automatisé depuis le chargement de l'échantillon jusqu'à l'analyse des données dans les différentes applications, à savoir : le séquençage, l'analyse des fragments et l'analyse d'identification humaine (HID) C'est à la fois un analyseur de fragment et un séquenceur [33].



Figure 19: HITACHI Genetic Analyzer 3500

2. Préparation des échantillons :

Consiste en l'attachement des fluorochromes à l'ADN (KIT Respinfinder)

3. Préparation de l'instrument [34]:

Elle englobe deux calibrations :

- Une calibration spatiale : qui consiste en la détermination de la position de l'image de chaque capillaire par rapport au capteur CCD

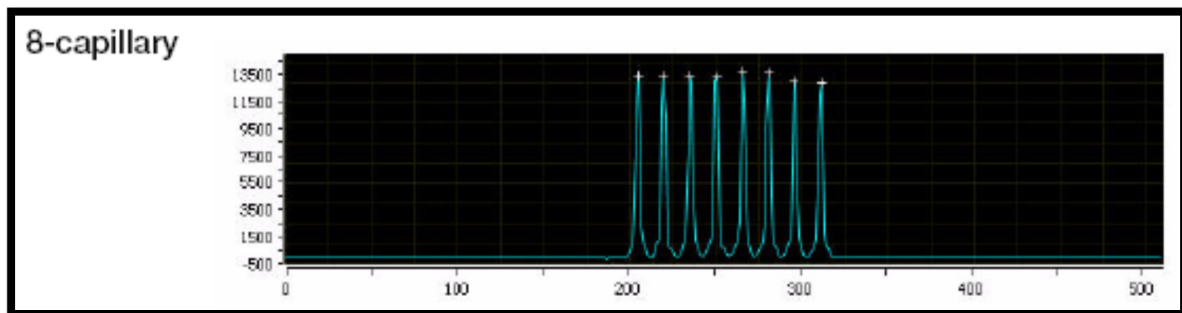


Figure 20 : Exemple de calibration spatiale

- Une calibration spectrale : qui a pour but de compenser le chevauchement des colorants. Elle permet ainsi de convertir les données de 20 couleurs en 4- 5 ou 6 couleurs.) elle se fait pour chaque capillaire à l'aide d'une gamme étalon à savoir **Multi-Capillary DS-33** et **Dye Set G5 Matrix Standard**. Dans cette calibration on vérifie deux paramètres essentiels :

- QV (Spectral quality Value) : Valeur de la qualité spectrale. Elle reflète la confiance de la séparation des signaux d'émission des colorants individuels du signal de fluorescence global mesuré. Une valeur de qualité de 1,0 indique une cohérence élevée, fournissant une matrice idéale. Dans notre étude le QV du Multi-Capillary DS-33 et Dye Set G5 Matrix Standard est de : 0,95

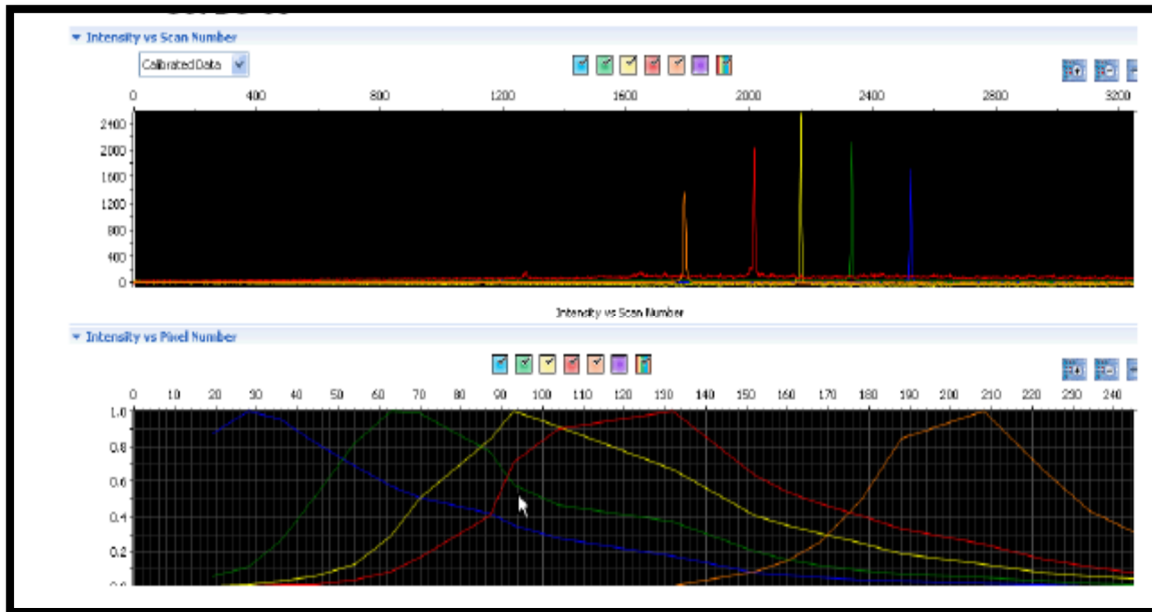


Figure 21 : Exemple de calibration spectrale de la Dye Set G5 Matrix Standard Set DS-33

- Condition Number (CN) : le numéro de condition indique la quantité de chevauchement des pics colorés dans les spectres d'émission de fluorescence par rapport à l'ensemble des fluorochromes. S'il n'y a pas de chevauchement, le numéro de condition est 1,0 (conditions idéales), Le nombre de conditions augmente avec l'augmentation du chevauchement des pics.

4. Fonctionnement du système :

- L'électrophorèse capillaire dépend de plusieurs paramètres dont l'essentiel est le polymère de migration. Ce dernier sert de tamis pour les différents segments à séparer. Le plus utilisé et qui témoigne d'une forte résolution est le gel de polyacrylamide. Pour l'analyseur génétique 3500, il est recommandé d'utiliser le Pop-7(960) dont la capacité est de 960 échantillons [35,36].

•Le nombre des capillaires varie d'un séquenceur à un autre. On en distingue des séquenceurs de 1, 4, 8,16, 24, 48, jusqu'au 96 capillaires conçus par Applied Biosystem. Chaque capillaire est le support d'un seul gel de migration. Celui-ci ne contient qu'une seule voie de migration. Ainsi dans un seul capillaire il aura lieu à une seule migration (une ligne avec différentes couleurs : figure ci-dessous) qui correspond à un seul échantillon. Dans notre cas pour 96 échantillons avec 8 capillaires on aura besoin de 12 Run pour faire passer tous les échantillons [35,36].

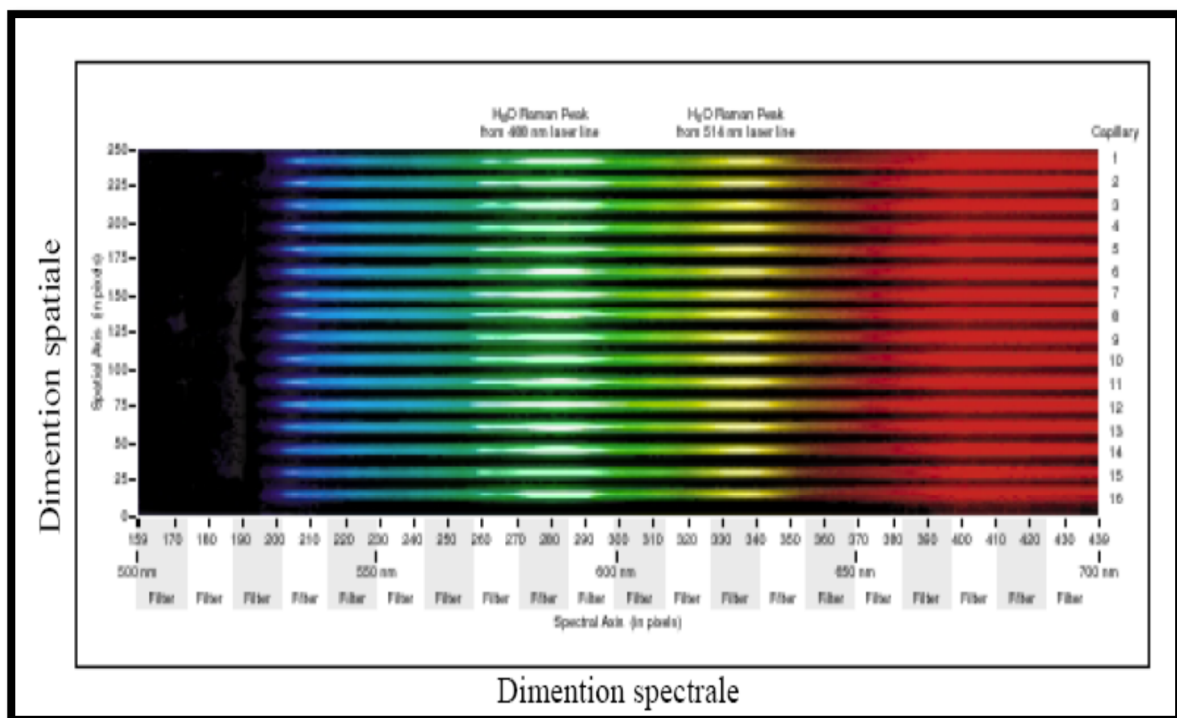


Figure 22 : Exemple de séquenceur à 16 capillaires

➔ Positionnement de 16 capillaires à un instant t sur la caméra CCD (axe des ordonnées : dimension spatiale) et décomposition spectrale de la fluorescence émise par chaque capillaire (axe des abscisses : dimension spectrale).

Le Run en général c'est le lancement de la boucle : injection du polymère (2), migration des segments d'ADN (3,4, 5,6) et obtention des données(6,1) [36].

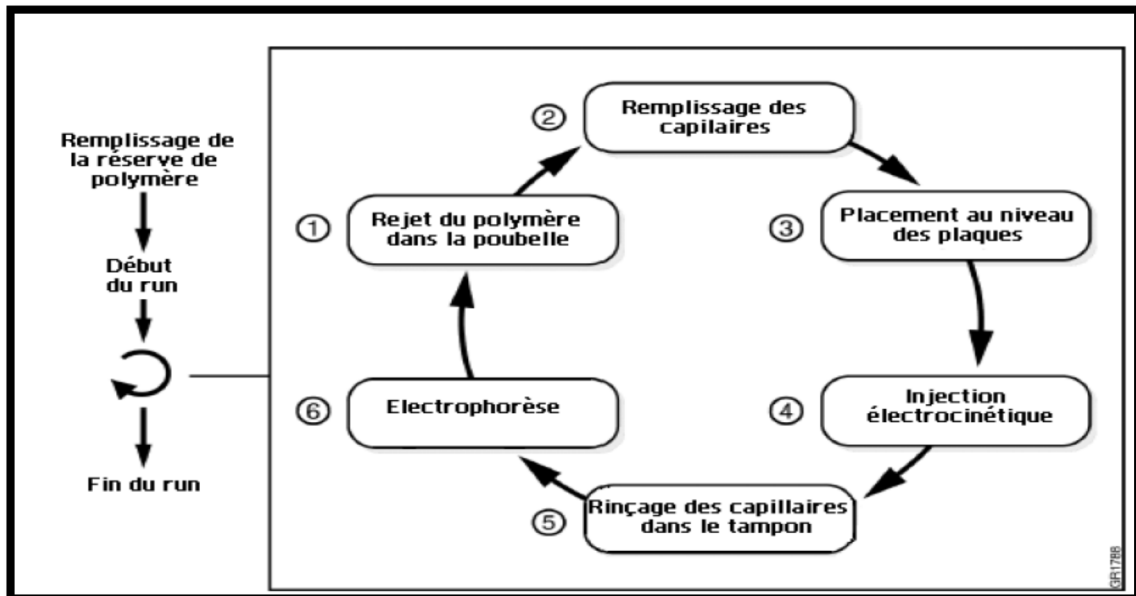


Figure 23: Différentes étapes d'un run effectué par l'analyseur génétique

- Pendant la migration le système prépare le capillaire en pompant la solution de polymère frais sous haute pression depuis la pompe d'alimentation en polymère jusqu'à la position des déchets au niveau du réservoir de la solution tampon de la cathode (CBC)

- Ensuite, il injecte de manière électrocinétique l'échantillon dans le tube capillaire en utilisant une basse tension pendant quelques secondes

- Le système accélère le voltage jusqu'à obtenir un voltage constant : un fort champ électrique est créé entre l'extrémité de masse du récipient de tampon d'anode et la tension négative appliquée à l'en-tête du réseau capillaire de la charge. Ce domaine tire l'ADN chargé négativement à travers le polymère de

séparation. Les petits fragments migrent plus vite que les plus gros fragments et atteignent le détecteur en premier. Pour assurer une séparation optimale et pour maintenir la dénaturation de l'ADN, les capillaires sont thermiquement contrôlés dans le four et dans la cellule de détection.

- Dans la cellule de détection les fluorochromes fixés à l'ADN sont excités par un étroit faisceau de la lumière laser qui est dirigé dans le plan des capillaires des deux cotés à la fois du dessus et de dessous.

- Le système capte la lumière fluorescente sur l'optique de l'instrument, tout en bloquant la lumière laser. La lumière passe à travers un réseau de transmission et est reflétée sur un capteur d'image (CCD).

- Pour chaque migration, les 20 couleurs captés sont convertis en données multi-couleurs pour l'ensemble de l'exécution.

- Dans l'application de séquençage 4 couleurs fluorescentes sont utilisées pour la détermination des 4 bases A (Adénine), G(Guanine), C(Cytosine) et T(Thymine) ; alors que pour les autres applications on peut utiliser jusqu' 6 couleurs en augmentant ainsi le débit [37].

En augmentant le nombre de capillaire on augmente la rapidité, la résolution et la sensibilité de détection. Ceci en jouant sur les paramètres suivants :

- Run time : dépend du polymère utilisé et de la longueur du capillaire : exprimés en min, heures
- Taille de lecture : exprimée en paire de base (pb) (résolution)
- Nombre de lecture : exprimée en 10^6 , 10^9 .
- Données générées : exprimée en gigabases (Gb)
- Débit : 1Gb/ jour



Figure 24: Conversion des bandes colorées sur dans le capillaire en donnée spectrales

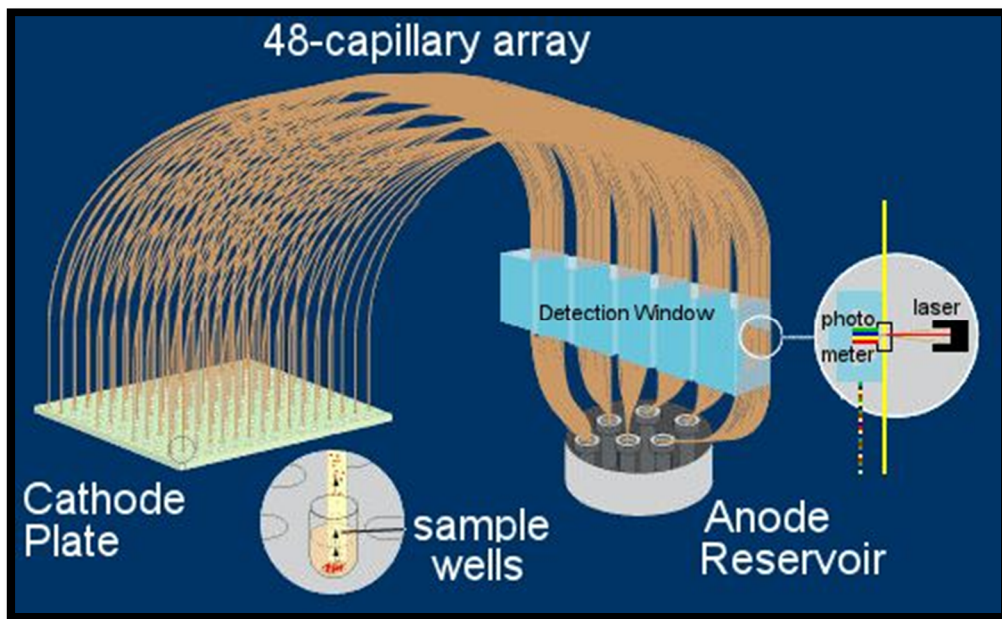


Figure 25: Fonctionnement du système

5. Résultats :

A la fin d'une réaction de séquençage le profil brut des bases (fichier trace) est converti en séquence suite à un ensemble d'opérations à savoir : lecture de bases, comparaison des séquences, régénération de plateforme de correction. Ceci à l'aide d'un processus informatique appelé Base Calling

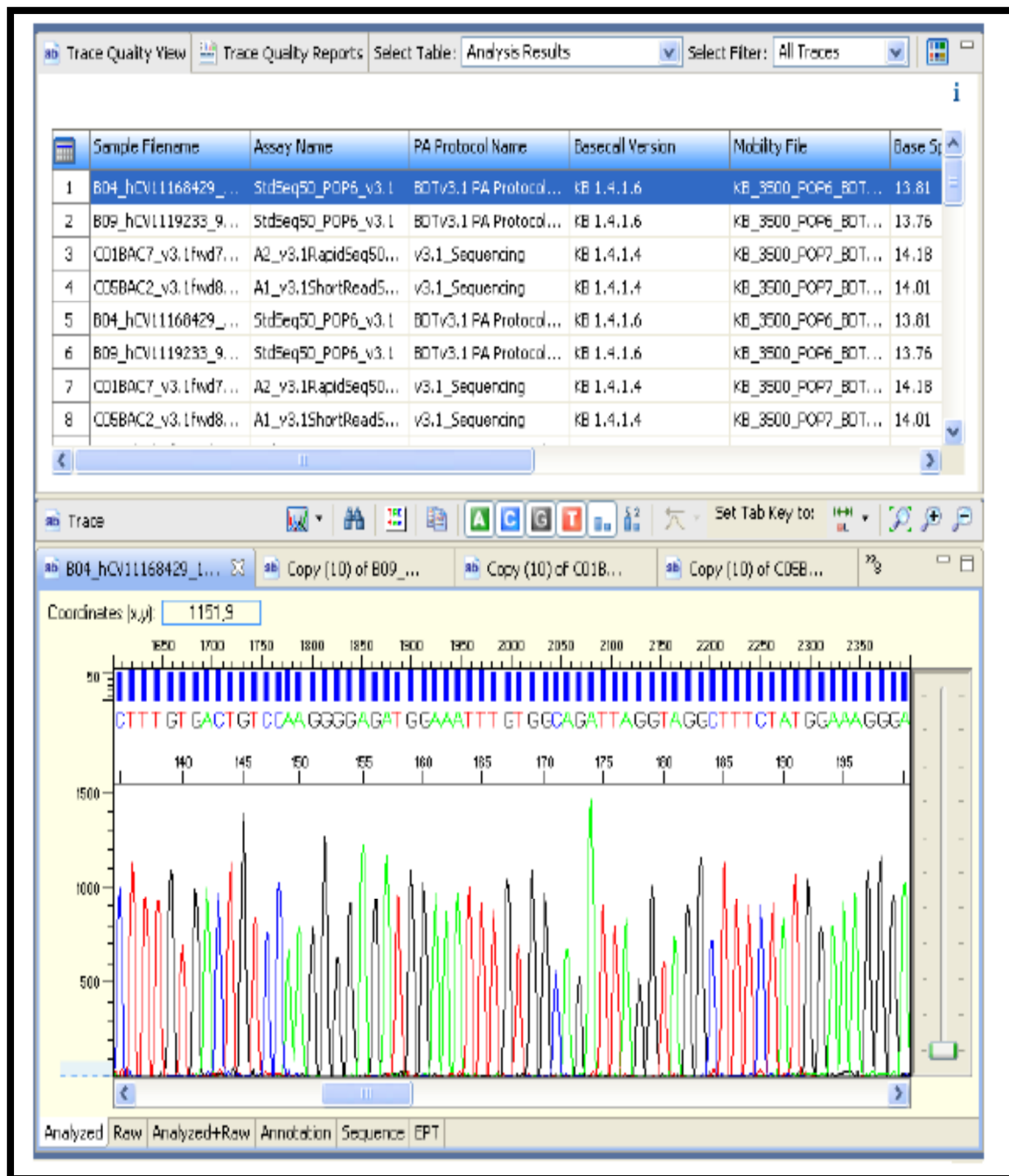


Figure 26: Exemple de résultat obtenu suite à une réaction de séquençage par le système 3500 Genetic Analyzer

III. Mode opératoire :

A. Introduction :

Les aspirations nasales collectées au sein du laboratoire de Recherche du CHIS servent de source d'Acide nucléiques (AN) afin de lancer le séquençage par la suite.

En premier temps il y a la phase préparation de librairie : qu'on entame tout d'abord par extraction d'AN selon les modalités du kit **MagMax™ Total Nucleic Acid** et puis une purification à l'aide de l'agitateur **Mag Max**. (Figure)

Après l'extraction, on effectue une 1ère PCR dans le but d'amplifier la quantité d'ADN. Cependant les échantillons à ARN subissent une transcription inverse avant de passer à l'étape de la PCR. L'ensemble de ces deux réactions se fait dans le même tube en présence des ingrédients nécessaires à des températures spécifiques à l'aide des thermocycleurs.

Une fois on obtient les produits de la 1ère PCR (les amplicons), on passe au vrai séquençage (la 2ème PCR) en faisant appel à la technologie TrueScience™RespiFinder® 19 Pathogen Identification Panel permettant d'identifier 14 virus à ARN, 1 virus à ADN et 4 bactéries. (Figure)

En 2ème temps vient la phase d'électrophorèse capillaire assurée par le séquenceur 3500. Cette dernière a pour élément d'entrée la librairie d'AN préétablie au préalable (1^{er} et 2^{ème} PCR), à laquelle s'ajoute une autre étape préparative à la migration sur capillaire.

A la fin de l'électrophorèse les résultats sont obtenus sous forme d'électrophérogramme qui présente les pathogènes identifiés au niveau des échantillons. (Figure ...)

B. Extraction des acides nucléiques [38] :

1. Définition :

L'extraction des AN est une technique qui isole l'AN à partir d'une cellule en quantité et qualité suffisante pour permettre son analyse. Elle est requise pour des applications de biologie moléculaire telles que la PCR, pour l'analyse d'échantillons médico-légaux et cliniques de même que pour les échantillons de terre et environnementaux.

Elle se fait en 3 étapes :

- Destruction des tissus et des cellules : libération de l'AN.
- Élimination des protéines et des peptides.
- Précipitation de l'AN et purification.

Les méthodes d'extraction d'AN se distinguent en techniques classiques (organiques/non organiques) et techniques modernes largement utilisées dans les kits courants telles que : la technologie utilisant la silice, méthode d'échange d'anion et celle par séparation magnétique qui fera l'objet du kit **MagMaxTM Total Nucleic Acid** utilisé dans cette étude. C'est une technique rapide et adaptable à l'automatisation.

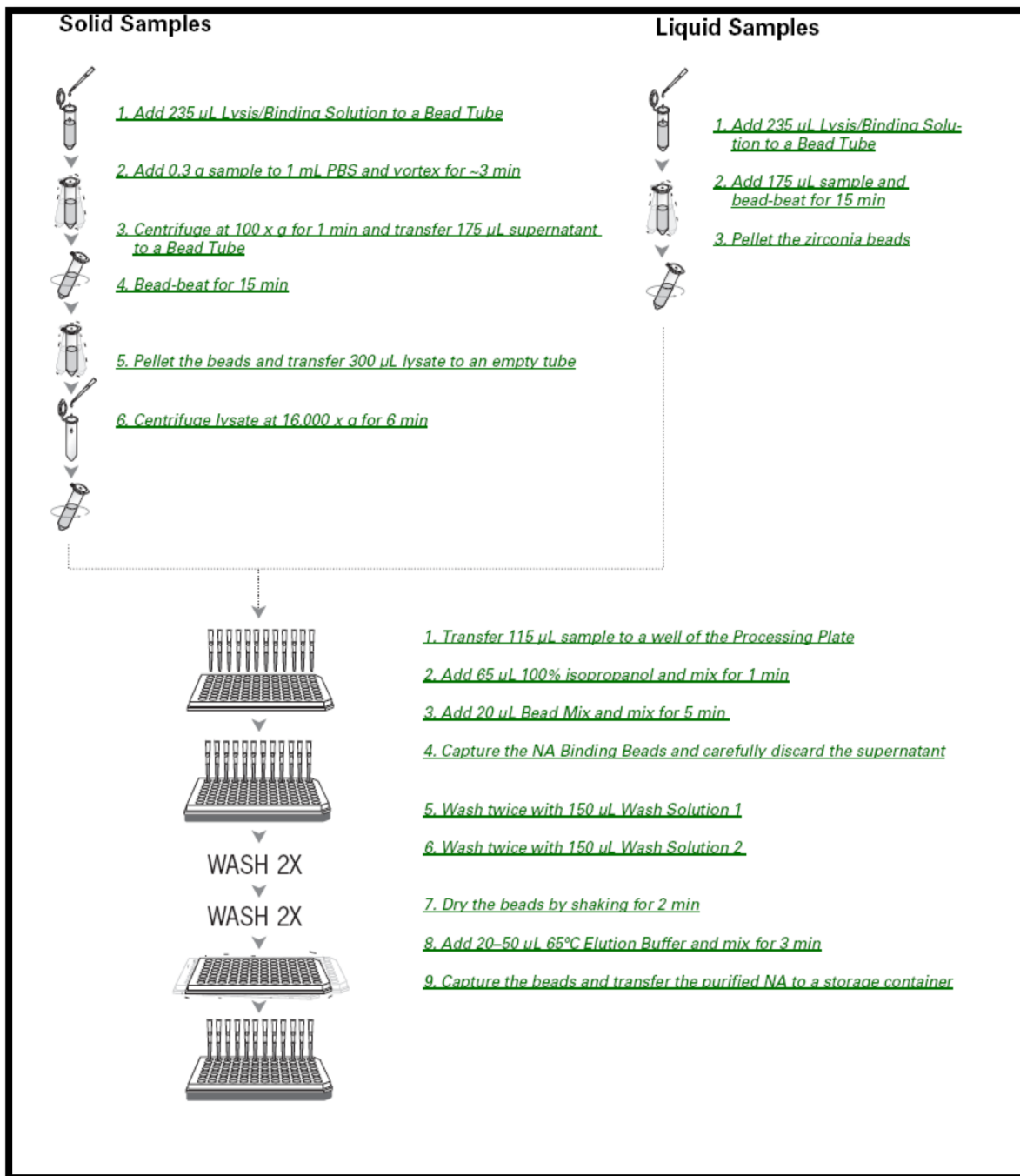


Figure 27: Schéma résumant la procédure générale du kit d'isolation MagMax™ Total Nucleic Acid (Thermo Fisher Scientific)

2. Principe :

Le kit *MagMax™ Total Nucleic Acid* (Thermo Fisher Scientific), se base sur la perturbation mécanique des échantillons avec des billes de zircone dans une solution de base de thiocyanate de guanidinium, permettant ainsi une libération rapide de l'acide nucléique (AN) tout en inactivant les nucléases présentes dans l'échantillon avec un fort rendement dans une durée qui ne dépasse pas une 1h.

Les échantillons sont par la suite dilués et lavés avec de l'isopropanol et de billes paramagnétiques qui présentent une forte surface d'adhésion.

L'ensemble est immobilisé par des aimants. Ils subissent par la suite deux lavages :

Un premier lavage (solution de lavage 1), pour éliminer les protéines et d'autres contaminants.

Un second lavage (solution de lavage 2), pour éliminer la solution de fixation résiduelle, et enfin, AN est élué dans un petit volume de tampon pauvre en sel.

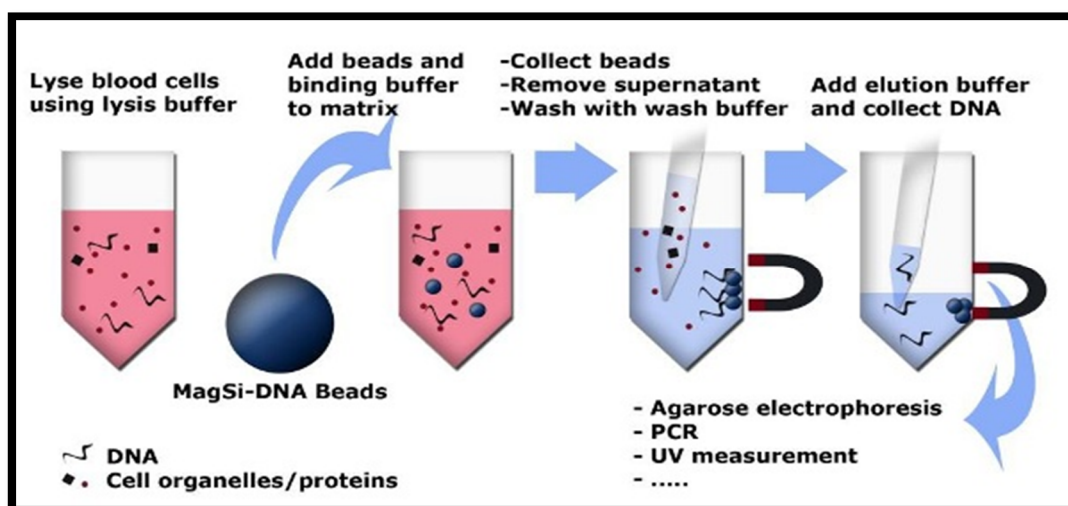


Figure 28: Principe du kit d'isolation MagMax™ Total Nucleic Acid (Thermo Fisher Scientific)

3. Protocole :

- Le port des gans est obligatoire afin de protéger le manipulateur d'une part et d'autre part d'éviter toute contamination de l'ARN des nucléases présentes sur la peau
- Décontamination des paillasse et du matériel avec une solution RNase (exemple Ambion RNase Zap Solution)

a. Préparation des solutions :

Consiste en la préparation de solution de lavage, solution Lysis-Binding et la solution mélange Bead Mix

➤ Préparation des solutions de lavage

- Ajouter 12 ml 100% d'isopropanol à la bouteille étiquetée solution de lavage 1 Concentré et bien mélanger : ce mélange est appelé Wash Solution 1
- Ajouter 32 ml d'éthanol à 100% de la bouteille étiquetée comme solution de lavage 2 Concentré et bien mélanger : ce mélange est appelé Wash Solution 2
- Marquer les étiquettes pour indiquer que les solutions de lavage sont préparées.
- Conserver les solutions de lavage à température ambiante. La solution est stable pendant un mois.

➤ Préparation de la Solution Lysis / Binding

- Préparer la quantité nécessaire de la Solution Lysis / Binding pour un mois comme indiqué dans le (tableau 4). Si le flacon est entièrement préparé, compter 10% du volume pour couvrir la perte de pipetage

- Une fois le Carrier NA est ajouté la solution est stable pendant un mois

Tableau 4: Préparation de la Solution Lysis / Binding

	Par réaction	Flacon entière
Solution de Lysis/Binding Concentré	232 μ l	28 ml
Carrier NA (1 μ g/echantillon)	3 μ l	360 μ l

- Mélanger en retournant le tube plusieurs fois
- Conserver la Solution Lysis / Binding préparée à température ambiante.

➤ **Préparation du mélange Bead Mix**

Chaque réaction d'isolement nécessite 20 μ L de mélange **Bead Mix**. Bien que le mélange est stable à 4°C pendant 2 semaines, il est recommandé de préparer juste la quantité qu'elle sera utilisée le jour même.

- Préparer le mélange Bead Mix en suivant le tableau ci-dessous en fonction du nombre d'isolation qui sera faites :

Tableau 5: Préparation du mélange Bead Mix

	Par réaction	Pour 96 réactions (+10%)
NA Binding Beads*	10 μ l	1.1 ml
Lysis/Binding Enhancer	10 μ l	1.1 ml

- Bien mélanger au vortex doucement
- Placez le mélange de billes (**Bead Mix**) préparé sur la glace jusqu'au moment de son utilisation

b. Extraction des AN :

Il est recommandé d'utiliser des connes avec filtre sans nucléase pour gérer les solutions de lavage et l'élution et éviter de mettre des connes d'occasion dans les réactifs du Kit. Elle se fait selon les étapes suivantes :

- Distribuer 235 μ l de Solution Lysis / Binding dans Bead Tube pour chaque échantillon.
- Ajouter 175 μ l de l'échantillon à chaque Bead Tube contenant la solution Lysis / Binding
- Passer les Bead tube dans Fast PrepR -24 (Vitesse : 6,5 m/s, temps : 1 min Deux cycles de 1 min chacune. Laisser reposer 2 min entre les cycles) (Programme 1) Cette étape lyse les cellules pour libérer les acides nucléiques par rupture physique avec les billes de zircone.
- Centrifuger les Bead tube à 16 000 xg pendant 3 min.
- Ajouter l'IAC à raison de 5 μ l d'IAC pour chaque 100 μ l du tampon d'élution.
- Bien homogénéiser
- Passer à la Purification des AN

c. Purification des acides nucléaires sur l'agitateur Mag Max

Utiliser des connes avec filtre sans nucléase pour gérer les solutions de lavage et l'élution et éviter de mettre des connes d'occasion dans les réactifs du Kit

Sur une plaque de traitement :

- Distribuer 65 μ L d'isopropanol à 100% pour chaque échantillon dans la plaque de traitement dans la ligne A

- Transférer 115 µL de surnageant de chaque échantillon dans chaque puits de la plaque de traitement dans la ligne A
- Ajouter 20 µl du mélange Bead Mix de billes dans la ligne A
- Distribuer 150 µl de la solution de lavage Wash 1 dans les lignes B et C
- Distribuer 150 µl de la solution de lavage Wash2 dans les lignes D et E
- Distribuer 50 µl de la solution Elution Buffer dans la ligne F
- Mettre la plaque sur l'agitateur MagMax et appuyer sur Start (programme 1)
- Transférer le surnageant de la ligne F, qui contient l'AN, à un tube approprié sans nucléase, et conserver le à -20° C. (*S'il y a des restes des billes dans les puits mettre la plaque de traitement sur un support magnétique pour fixer les billes et aspirer le surnageant avec précaution*)

C. La technologie TrueScience™ RespiFinder®

1. Description :

Les TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels utilisent la technique PCR multiplexe permettant de détecter et d'identifier les agents pathogènes pouvant entraîner des infections des voies respiratoires à partir d'acides nucléiques totaux purifiés.

C'est une application de la MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) généralement utilisée pour la détermination et le dosage relatif de l'ADN dans un échantillon. Elle a été désignée comme outil d'analyse pour la détection des maladies responsables de mutations génétiques. Récemment cette technique a connu plusieurs modifications et évolution. C'est une technologie qui combine la rapidité, la haute sensibilité avec un très fort débit ce qui permet la capacité de détection simultanée des pathogènes [39].

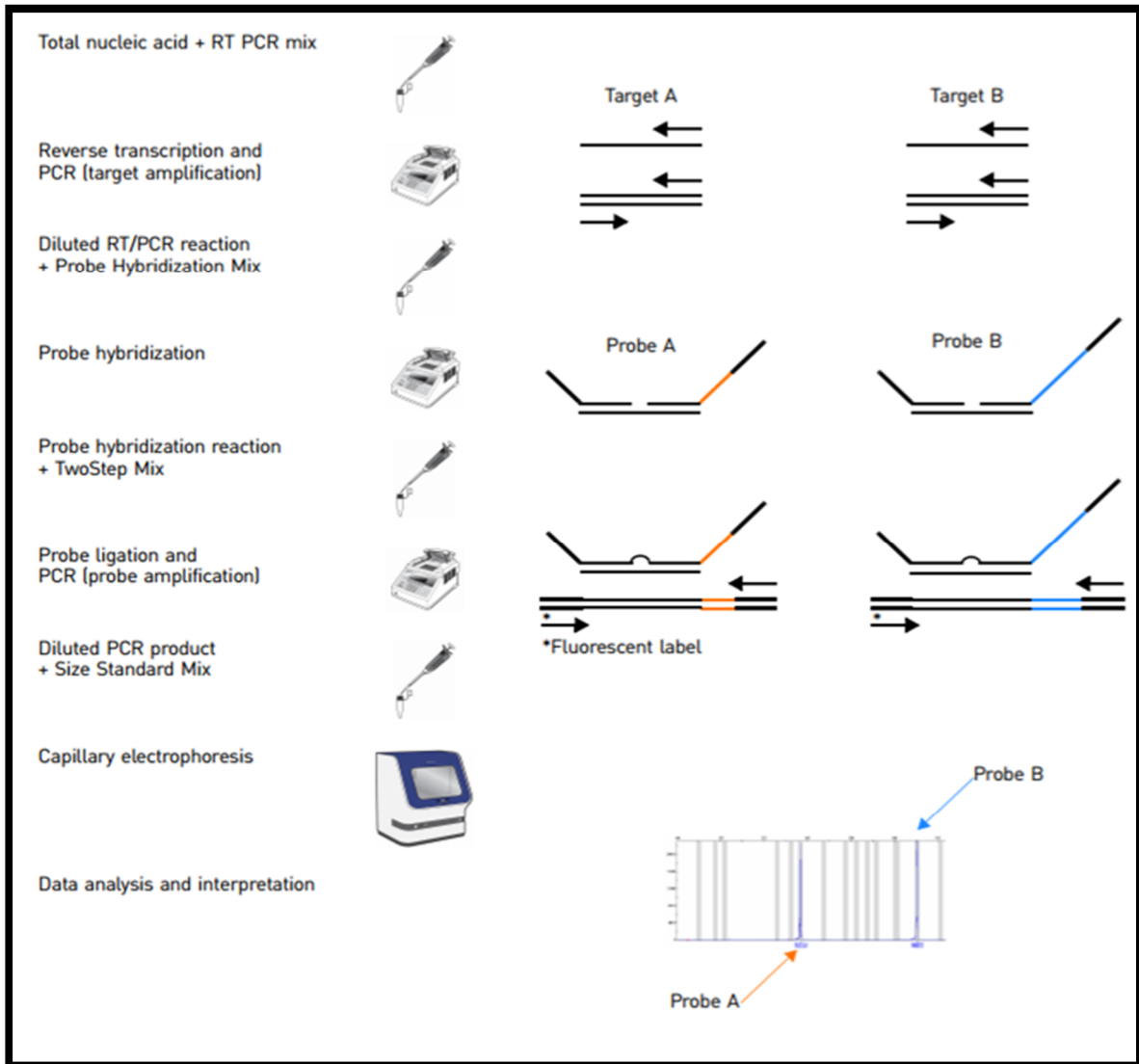


Figure 29: Schéma du protocole du séquençage au panel TrueScience™ RespiFinder®)

2. Principe

Le panel d'identification TrueScience™ RespiFinder® (Tableau 6) inclut une phase de transcription inverse/PCR combinée (pour convertir un ARN viral en ADN complémentaire et pour amplifier l'ADN/ADNc cible), une phase d'hybridation de sonde et une phase de ligature/amplification de sonde. Un contrôle d'amplification interne (IAC : Internal Amplification Control) est inclus dans le test

afin de différencier les échantillons vrais négatifs des faux négatifs qui peuvent être générés par une dégradation d'acide nucléique, une inhibition de PCR ou des erreurs de manipulation. Les cibles peuvent être détectées via l'analyse de fragment d'ADN utilisant l'électrophorèse capillaire [39].

Tableau 6: Différents types de panels RespiFinder

Panel	Agents pathogènes détectés	Nombre d'ensembles de sondes cibles	Gamme de tailles de sonde
TrueScience™RespiFinder® 15 Viral Identification Panel	14 virus à ARN et 1 virus à ADN	15 plus IAC	163 à 498 nucléotides
TrueScience™RespiFinder® 19 pathogen Identification Panel	14 virus à ARN, 1 virus à ADN et 4 bactéries	19 plus IAC	

3. Protocole [39] :

a. Phase pré-analytique

➤ Préparation des zones de travail

Pour empêcher la contamination, il est fortement recommandé de réaliser les activités expérimentales dans des zones séparées

➤ Programmation du cycleur thermique

Programmer le cycleur thermique à l'aide des trois programmes suivants (Tableau 7) :

Tableau 7: Programmes du cycleur thermique

1 Transcription inverse et programme PCR			2 Programme d'hybridation de sonde			3 Ligature et programme PCR		
Phase	Temp	Duré (mm : ss)	Phase	Temp	Duré (mm : ss)	Phase	Temp	Duré (mm : ss)
Transcription inverse	50 °C	30 :00	Dénaturation ADN	98 °C	10 :00	Ligature de sonde	54°C	15 :00
Activer démarrage à chaud Taq	95 °C	15 :00	Hybridation de sonde	60 °C	60 :00	Dénaturation initiale	95°C	2 :00
Cyclage : 30 cycles	94 °C	00 :30	Pause	60°C	Passer directement à la phase suivante	Cyclage : 33 cycles	94 °C	00 :30
	55 °C	00 :30					60 °C	00 :30
	72 °C	01 :00					72 °C	01 :00
Pause	20 °C	Passer directement à la phase suivante au stocker ↑				Pause	20 °C	Passer directement à l'électrophorèse capillaire ou stocker ↑



Figure 30 : Thermocycleurs du laboratoire recherche du CHIS

➤ **Configuration du logiciel de collecte de données :**

Avant d'utiliser les TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels pour la première fois, configurer 3130/3130xl Data Collection Software v3.0 ou v3.1 ou 3500 Data Collection Software v1.0.

➤ **Préparation des échantillons cliniques :**

Elle consiste en :

- La collecte des échantillons : sécrétions rhinopharyngées prélevées par aspiration nasales
- La conservation des échantillons à -20°C
- L'extraction et purification d'AN (selon le kit MagMax™ *Total Nucleic Acid* (Thermo Fisher Scientific) puis l'ajout du IAC en suivant la démarche suivante :
- Préchauffer les échantillons s'ils sont visqueux et/ou contiennent des composants cellulaires solides.
- Extraire les acides nucléiques totaux (ARN et ADN) à l'aide du kit d'extraction MagMax™ Total Nucleic Acid (Thermo Fisher Scientific). Pour la plupart des méthodes d'extraction, il est recommandé d'utiliser 200 µl de matériau d'échantillon et d'éluer dans 100 µl de tampon d'élution.
- Après incubation de l'échantillon avec le tampon de lyse, ajouter l'IAC, puis bien mélanger. Ajouter 5 µl d'IAC pour chaque 100 µl de tampon d'élution.
- L'IAC est un transcrit d'ARN SP6 du gène polyprotéine (PP) du virus de l'encéphalomyocardite (EMC) et est fourni comme témoin pour l'extraction ARN / ADN. C'est un contrôle pour le test TrueScience™ RespiFinder® Panneaux d'identification, et une vérification des éventuels inhibiteurs de la PCR.

Pour les échantillons à concentration élevée et / ou contenant des infections multiples, le fragment IAC peut ne pas être visible dans l'électrophérogramme, car de grandes quantités d'AN de pathogènes ont consommé la plupart des réactifs du dosage. Par conséquent, si le signal IAC est absent en présence d'un ou de plusieurs fragments spécifiques indiquant une infection, le test est toujours valide.

b. Phase analytique : PCR multiplexe

Consiste en premier temps en la préparation de trois Mix (RT/PCR Mix, Probe Hybridation Mix, TwoStep Mix). En deuxième temps en la réalisation de deux PCR : une après la transcription inverse et une deuxième à la fin qui est une PCR tronquée (séquençage) après une phase d'hybridation.

➤ Préparation et pipetage du RT/PCR Mix

Elle se fait selon les indications du tableau ci-dessous toute en respectant les conditions de préparation de chaque réactif :

Tableau 8 : Préparation du RT/PCR MIX

RT/PCR Mix component	Volume per reaction
Dilution Buffer	5.5 uL
5X RT-PCR Buffer	5.0 uL
Pre-Amplification Primer Mix	2.5 ul
dNTP-PCR Mix	1.0 uL
RT-PCR Enzyme Mix	1.0 uL
Total volume RT/PCR Mix per reaction	15 uL

Conditions à respecter :

- Dégeler les éléments suivants (AN - Dilution Buffer - 5× RT-PCR Buffer - Pre-Amplification Primer Mix - dNTP Mix), puis les conserver sur de la glace.
- Préparer une quantité suffisante de RT/PCR Mix pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipetage.
- Lors de la préparation du mélange, suivre les directives de manipulation spécifiques à ce réactif :
 - Pour le RT-PCR Enzyme Mix : sortir le mélange du stockage immédiatement avant le pipetage. Centrifuger le mélange pendant 5 secondes, puis mélanger en retournant doucement la pipette. Utiliser des embouts de pipette à faible rétention lors de la manipulation du mélange. Replacer le mélange dans le lieu de stockage immédiatement après utilisation.
 - Pour tous les autres réactifs et pour le modèle d'acide nucléique total : immédiatement avant utilisation, passer les tubes au vortex et les centrifuger brièvement.
- Passer brièvement au vortex le RT/PCR Mix, placer 15 µl dans des tubes PCR de 0,2 ml, puis fermer les tubes. Conserver les tubes PCR sur de la glace.

➤ **Préparation et pipetage du Probe Hybridization Mix**

- Dégeler le Dilution Buffer, le Hybridization Buffer et le Probe Mix, puis conserver ces éléments sur de la glace.
- Immédiatement avant utilisation, passer chaque réactif au vortex et le centrifuger brièvement.

- Préparer une quantité suffisante de Probe Hybridization Mix pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipetage selon le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : Préparation du Hybridation Mix

Probe Hybridization Mix component	Volume per reaction
Dilution Buffer	3.0 uL
Hybridization Buffer	1.5 uL
Probe Mix	1.5 uL
Total volume Probe Hybridization Mix per reaction	6.0 uL

- Pipeter 6 μ L de Probe Hybridization Mix dans de nouveaux tubes PCR de 0,2 ml, fermer les tubes, puis conserver les tubes PCR à 4 °C jusqu'à utilisation.
- **Configuration et réalisation d'une transcription inverse et PCR (1^{ère} PCR)**
- Ajouter 10 μ l de modèle d'acide nucléique total à chaque tube PCR qui contient 15 μ l de RT/PCR Mix. Bien mélanger le contenu en retournant doucement la pipette, puis centrifuger brièvement. Conserver les tubes PCR sur de la glace jusqu'au préchauffage du cycleur thermique.
 - Si les procédures de laboratoire internes imposent la réalisation d'un contrôle négatif, ajouter 0,25 μ l d'Internal Amplification Control à 10 μ l d'eau exempte de DNase/RNase, puis ajouter ce mélange dans un tube PCR contenant 15 μ l de RT/PCR Mix.
 - Lancer le programme du cycleur thermique Transcription inverse/PCR. Lorsque la température atteint 50°C, placer les tubes PCR dans le cycleur thermique.

➤ Configuration et réalisation d'une hybridation de sonde

- Ajouter 100 µl d'eau stérile (non fournie) à chaque réaction transcription inverse/PCR, puis bien mélanger en retournant doucement la pipette.
- Ajouter 2 µl de la réaction transcription inverse/PCR diluée à chaque tube qui contient 6 µl de Probe Hybridization Mix, puis centrifuger brièvement.
- Placer les tubes PCR dans le cycleur thermique, puis réaliser le programme d'hybridation de sonde.
- Au cours des 60 dernières minutes d'hybridation de sonde, préparer le TwoStep Mix. Après l'hybridation de sonde, procéder immédiatement à la ligation puis à la réalisation PCR. Maintenir les tubes PCR dans le cycleur thermique à 60 °C jusqu'à être prêt à procéder à la ligation et la réalisation PCR.

➤ Préparation du TwoStep Mix (En cours d'hybridation de sonde)

- Dégeler le TwoStep Buffer, puis le conserver sur de la glace.
- Préparer une quantité suffisante de TwoStep Mix pour le nombre d'échantillons à traiter plus un volume supplémentaire pour les pertes se produisant pendant le pipetage selon le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Préparation TwoStep Mix

TwoStep Mix component	Volume per reaction
TwoStep Buffer	30.6 uL
Ligase Enzyme	1.0 uL
Taq Polymerase	0.4 uL
Total volume TwoStep Mix per reaction	32.0 uL

- Conserver le mélange sur de la glace jusqu'à utilisation. Lors de la préparation du mélange, suivre les directives de manipulation spécifiques à ce réactif :
 - Pour Ligase Enzyme et Taq Polymerase : sortir chaque réactif du stockage immédiatement avant le pipetage. Centrifuger chaque réactif pendant 5 secondes, puis mélanger chaque réactif en retournant doucement la pipette.
 - Utiliser des embouts à faible rétention lors de la manipulation de ces réactifs. Replacer les réactifs dans le lieu de stockage immédiatement après utilisation.

➤ **Configuration et réalisation de la ligature et de la PCR
(Immédiatement après l'hybridation de sonde)**

- Arrêter le programme d'hybridation de sonde et démarrer immédiatement le programme de ligature et PCR.
- Lorsque le cycleur thermique atteint 54 °C, appuyer sur Pause pour maintenir la température du bloc du cycleur thermique à 54 °C.
- Préparer les réactions de l'hybridation de sonde pour la ligature et PCR :
 - Sortir les réactions d'hybridation de sonde du cycleur thermique.
 - Ajouter 32 µL de TwoStep Mix à chaque 8 µL de réaction d'hybridation de sonde.
 - Remettre les tubes dans le cycleur thermique.
- En cas de réalisation d'un grand nombre de réactions, procéder par lot. Par exemple, en cas d'utilisation de tubes à 8 bandes, sortir 8 réactions, ajouter le TwoStep Mix, puis replacer les tubes dans le cycleur thermique avant de sortir les 8 réactions suivantes.
- Redémarrer immédiatement le programme de ligature et PCR mis en pause.

D. Electrophorèse capillaire (3500 GENETIC ANALYSER)

Elle se fait en deux phases principales : tout d'abord la combinaison du marqueur du poids, formamide et les produits PCR et puis le lancement du programme de la plaque portant les échantillons.

1. Combinaison de l'étalon de masse, du formamide et un produit PCR :

- Préparer le Mix étalon des tailles (Size Standard Mix) [37]. selon le tableau ci-dessous :

Tableau 11: Préparation de Standard Mix

Size Standard Mix component	Volume per reaction (PCR product or Reference marker)
GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard (PN 4366589 or PN 4408399)	0.5 uL
Hi-Di™ Formamide (PN 4311320 or 4440753)	10.0 uL
Total volume Size Standard Mix per reaction	1.5 uL

- Dans une plaque optique à 96 puits, pipeter 10,5 µl du Size Standard Mix dans chacun des nombre requis de puits.
- Pipeter 1 µl de Reference Marker (FAM™) dans un des puits contenant le Size Standard Mix. Utiliser la pipette pour mélanger.
- Pour chaque échantillon de produit PCR :
 - Diluer 5 µL de produit PCR échantillon dans 45 µL d'eau désionisée.
 - Pipeter 1 µL du produit PCR dilué dans un puits contenant le Size Standard Mix, puis utiliser la pipette pour mélanger.
 - Remarque : Dans certains cas (par exemple, charge virale élevée), il peut être nécessaire de diluer encore le produit PCR afin d'éviter les pics hors échelle. Pour plus d'informations, voir TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Protocol.
 - Sceller la plaque avec un couvercle adéquat

2. Lancement du cycle de la plaque d'échantillons :

- Centrifuger la plaque à 1 000 × g pendant 10 secondes pour diriger le liquide vers le fond des puits et supprimer les bulles d'air.
- Charger la plaque dans l'analyseur génétique, configurer le logiciel de collecte de données comme décrit dans le TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels Software Setup and Data Analysis User Guide (PN 4460428), puis lier la plaque et démarrer le cycle.

3. Analyse des données :

Effectuer l'identification du statut de candidat pathogène en analysant les données en utilisant paramètres d'analyses et panneaux recommandés.

Pour des instructions, reportez-vous à Panneaux d'identification TrueScience™ RespiFinder® Configuration du logiciel et utilisateur de l'analyse des données Guide (PN 4460428) sur www.appliedbiosystems.com/respifinderlit.

4. Interprétation des résultats [39]:

- Voir l'électrophérogramme pour identifier les pathogènes spécifiques présents dans les échantillons. Les échantillons positifs présentent un ou plusieurs pics signifiant correspondant aux intervalles de taille de référence

- Inclure la sonde référence au moins une fois dans chaque plaque d'électrophorèse capillaire pour établir les intervalles de taille exacts pour chaque sonde. La taille d'intervalle c'est la mesure de la longueur de la séquence de la sonde référence.

- Un vrai négatif ne présente aucun pic dans la fourchette d'intervalles défini au préalable par les sondes références et il doit obligatoirement contenir un pic du contrôle interne (IAC).

- En cas d'absence du pic de l'IAC et du fragment spécifique le résultat n'est pas validé

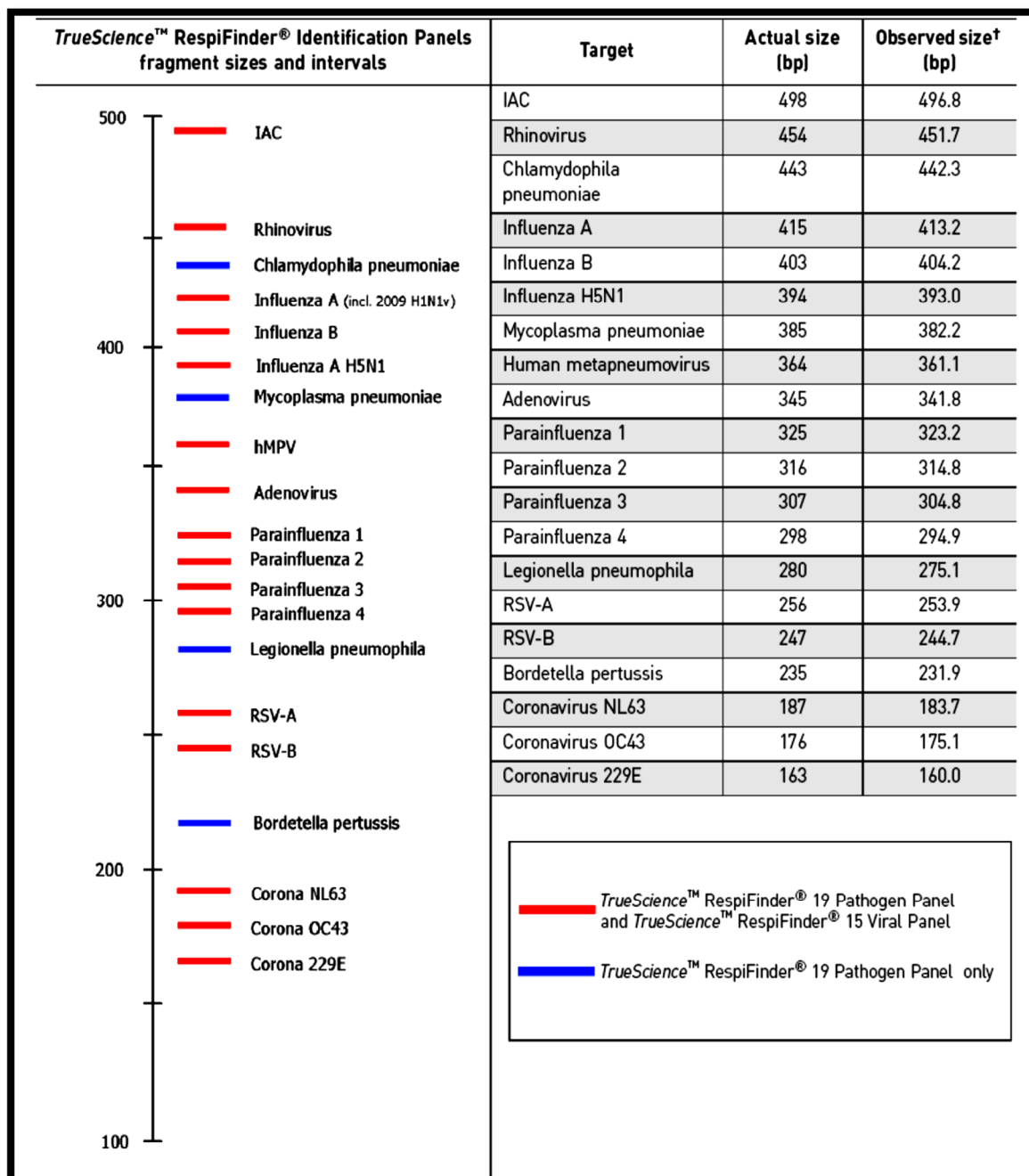


Figure 31: Intervalle et taille des fragments du panel d'identification TrueScience™ RespiFinder®

a. Echantillon positif :

Un échantillon positif est détecté par un ou deux pics significatifs situés au sein de l'intervalle de tailles des fragments (échelle de référence). En se rapportant à la concentration de l'agent infectieux le signal (IAC) peut être absent ou présent.

Dans les échantillons avec une faible concentration de l'agent infectieux le IAC est normalement présent alors que chez les échantillons à forte concentration en agent infectieux le IAC est soit absent soit très faible

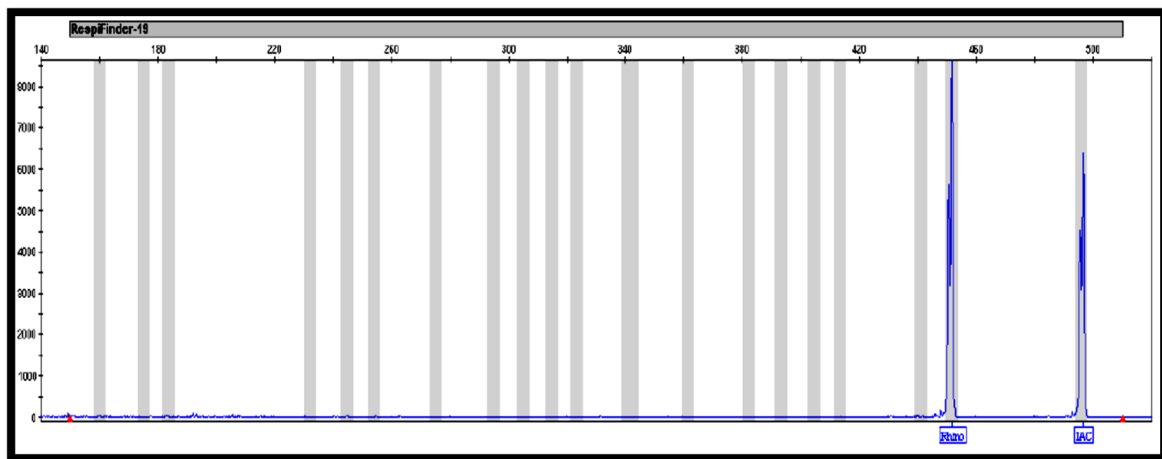


Figure 32: Echantillon positif avec le signal IAC

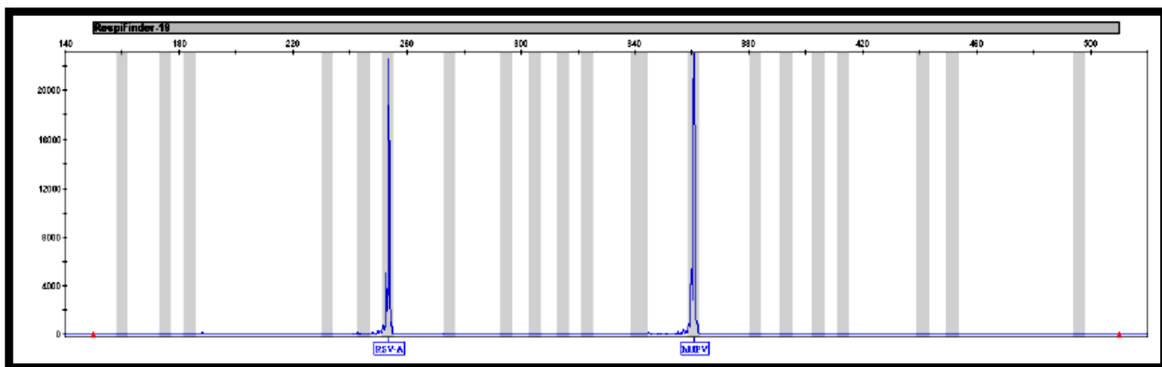


Figure 33: Echantillon positif avec absence du signal IAC

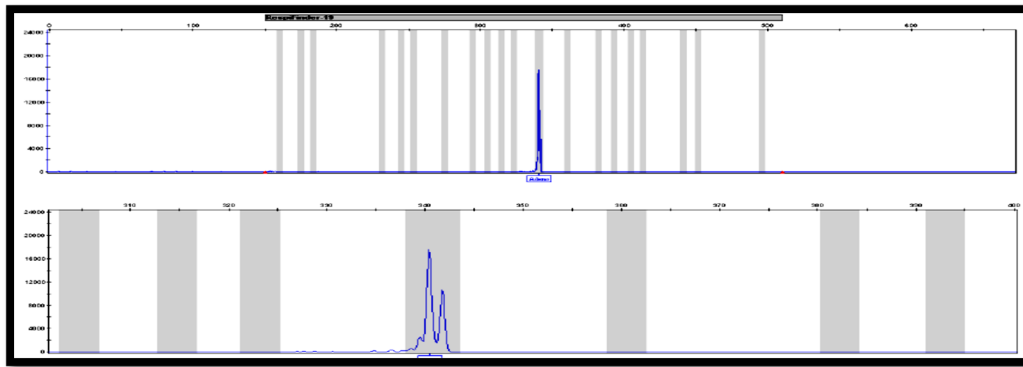


Figure 34: Echantillon à adénovirus positif avec deux pics différents

La sonde Adénovirus est constituée de deux sondes apparentées conçues pour couvrir les six sous-genres. La plupart des espèces d'Adénovirus sont détectées par les deux sondes, ce qui donne un profil de pic typique avec deux pics, comme indiqué dans la Figure ci-dessus.

Un petit nombre de souches Adénovirus réagissent avec une seule de ces sondes. Ces signaux doivent également être considérés comme un échantillon positif d'adénovirus (le 2^{ème} électrophérogramme de la figure ci-dessus)

b. Echantillon négatif

Un échantillon vrai négatif ne présente aucun pic. Cependant il doit avoir un pic IAC dans l'électrophérogramme.

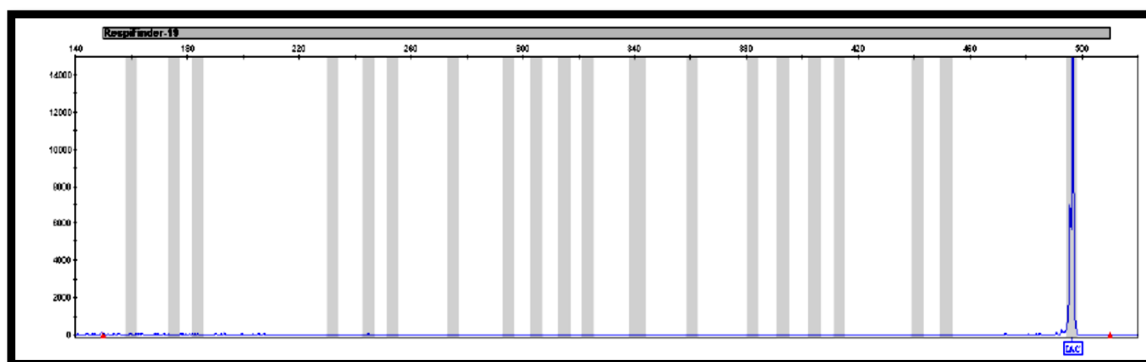


Figure 35: Echantillon négatif avec le signal IAC au niveau de la position de la sonde IAC

c. Echantillon raté :

Un échantillon raté ne présente aucun signal au niveau de toutes les positions des sondes références incluant même l'IAC. Ce sont des échantillons invalides.

Les échantillons ratés peuvent être dû à la dégradation d'AN, l'inhibition de la PCR, aux erreurs de manipulation ou autres causes lors de la réaction.

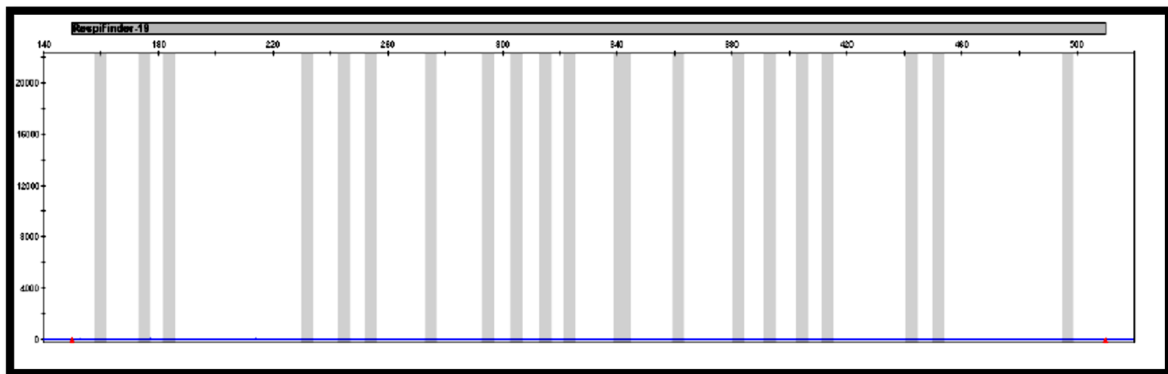


Figure 36: Echantillon raté

d. Echantillon partiellement inhibé :

C'est un échantillon présentant des hauteurs de pic inférieures à la normale, par exemple :

i. Un échantillon avec une hauteur de pic d'IAC inférieure aux hauteurs de pic d'IAC typiques pour d'autres échantillons traités dans la même plaque, et n'ayant pas d'autres pics

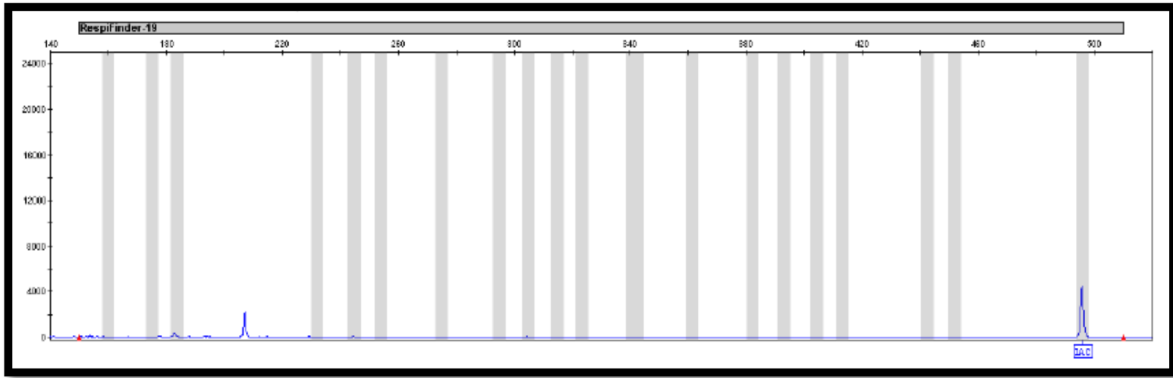


Figure 37: Echantillon partiellement inhibée exemple 1

ii. Un échantillon positif qui contient des hauteurs inhabituellement basses par rapport aux autres échantillons traités dans le même lot.

Aucun résultat ne peut être revendiqué concernant ces échantillons.

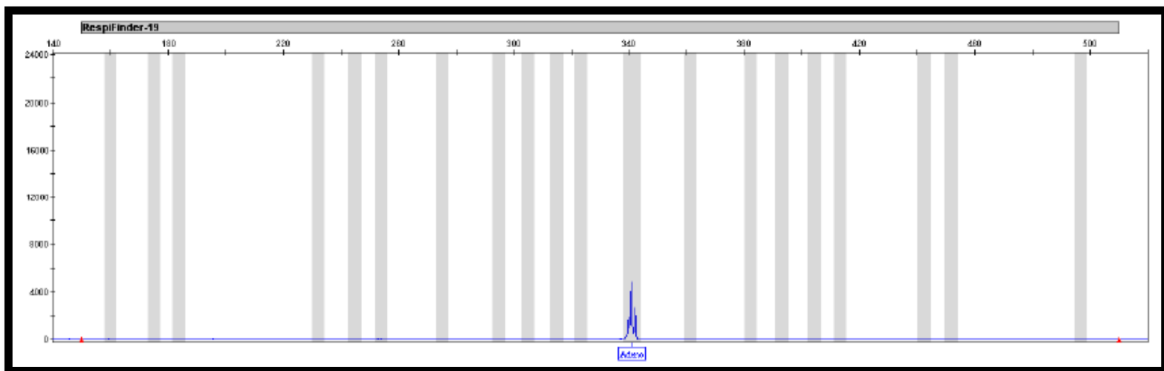


Figure 38: Echantillon partiellement inhibée exemple 2

e. Echantillon a profil augmenté :

Est défini comme de nombreux pics en dehors des intervalles de taille définis par le marqueur de référence. Ces modèles peuvent être le résultat de la présence d'une forte concentration d'ADN humain dans l'échantillon. Aucun résultat ne peut être revendiqué concernant cet échantillon.

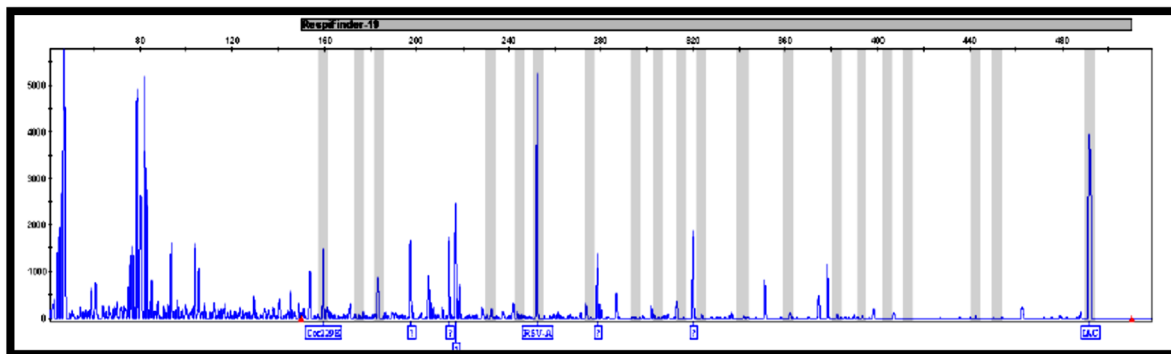


Figure 39: Echantillon à profil augmenté

f. Phase post-analytique :

Lors de cette phase les résultats obtenus par l'appareil sont validés et interprétés par le biologiste. Tout résultat doit être confronté au tableau clinique et radiologique.

Cette technique nous permet de détecter les associations de gènes lors d'infections respiratoires :

Association virus-virus ou virus-bactérie atypiques ou bactérie- bactérie atypique, aussi de détecter les bactéries atypiques qui ne poussent pas sur les milieux usuels en bactériologie.



I. Type d'étude :

C'est une étude transversale rétrospective portant sur 700 cas des enfants atteints d'une infection respiratoire aiguë, hospitalisés au niveau de l'hôpital d'enfant de Rabat.

Ce travail est étalé sur une période de dix mois, de novembre 2010 à Décembre 2011.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'intérêt du séquençage multiplex réalisé chez les enfants hospitalisés pour pneumopathie aiguë et d'étudier son impact sur la prise en charge de ces enfants.

II. Critères d'inclusion :

Nous avons inclus tous les enfants âgés entre 2 mois et 59 mois, présentant une symptomatologie respiratoire aiguë au cours de la période d'étude et admis au sein de l'hôpital d'enfant de Rabat.

La définition retenue est la définition de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de la pneumonie grave : Enfant ayant une toux ou des difficultés respiratoires avec augmentation du rythme respiratoire (Rr) selon l'âge accompagné d'un tirage ou un stridor, mais pas de cyanose centrale.

III. Critères d'exclusion :

Nous avons exclu tous les enfants ayant un antécédent :

- D'une pathologie sous-jacente (cardio-pulmonaire, neuromusculaire, digestive ou maladie de système).
- Les enfants n'ayant pas bénéficié d'un écouvillon nasopharyngé.

IV. Recueil des données :

Le recueil des données a été fait au niveau de l'hôpital d'enfant de Rabat à partir des dossiers d'hospitalisation des 700 patients inclus dans l'étude. Les données étaient recueillies sur une fiche d'exploitation réalisée à cet effet comportant les données de :

1. L'interrogatoire :

- La base démographique
 - Le sexe
 - L'âge par mois
 - Le nombre d'enfants de mêmes parents
- L'histoire sanitaire
 - Prématurité
 - L'allaitement maternel
 - Patients atteints d'une maladie chronique diagnostiquée
 - Patient asthmatique connu
 - Admission préalable en raison d'une maladie respiratoire
 - Fémur à la maison
- Statut vaccinal des patients
- Les signes fonctionnels
 - Fièvre
 - Ecoulement Nasal
 - Troubles digestifs
 - Somnolence

2. L'examen clinique :

- L'évaluation à l'entrée : Réactivité – SpO2 – fréquence cardiaque – fréquence respiratoire – température axillaire –
- Examen pulmonaire : Signes de lutte respiratoire – auscultation Pulmonaire (normale, râles sibilants, frein expiratoire isolée ou râles ronflants) Retentissement sur l'alimentation.

a. Les critères d'hospitalisation :

Âge < 6 semaines, apparence toxique, prématurité <34 SA, troubles digestifs, apnée/cyanose, épuisement respiratoire, SPO2<94%, polypnée fréquence respiratoire > 60 cycles par min ou difficulté du suivi en ambulatoire [1].

b. Les examens par aciniques :

- **La radiographie thoracique :**

Normale, distension thoracique, syndrome bronchique, trouble de ventilation, syndrome de condensation ou cardiomégalie).

- **Les examens biologiques :** NFS, CRP, Procalcitonine, zinc plasmatique
- **La biologie moléculaire** (séquenceur multiplex)
- **Profil thérapeutique :**
- **Evolution et complication.**

V. Etude statistique :

A. Gestion des données et analyse statistique

- Tous les questionnaires d'étude ont été saisis deux fois dans la base de données en utilisant un programme écrit dans Filemaker Pro 12 (Filemaker Inc., Santa Clara, Californie, États-Unis).
- L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Stata 11 (Stata Corp., College Station, TX, États-Unis). Les variables quantitatives ont été exprimées en moyenne \pm l'écart-type, les variables qualitatives en pourcentage. Les résultats sont rapportés sous forme de graphiques et de tableaux commentés. Une valeur de p inférieure à 0.05 a été considérée



I. Profil épidémiologique :

1. Fréquence

Sur une période de 14 mois, 3202 enfants âgés de 2 à 59 mois ayant des problèmes respiratoires ont visité l'hôpital d'enfant de rabat. Parmi ces enfants seulement 1334 (42%) ont été hospitalisés et 700 (52,4%) ont été inclus dans notre étude.

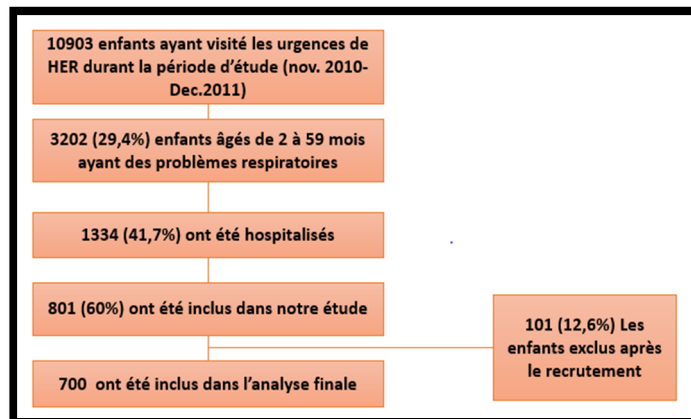


Figure 40 : Profil d'étude

2. Age :

L'âge des patients inclus dans notre étude varié entre 2 à 59 mois soit une médiane d'âge de 21.5 (14.5%) mois. L'âge de prédilection se situait entre 2 et 17 mois, et le pic de fréquence à 3 mois.

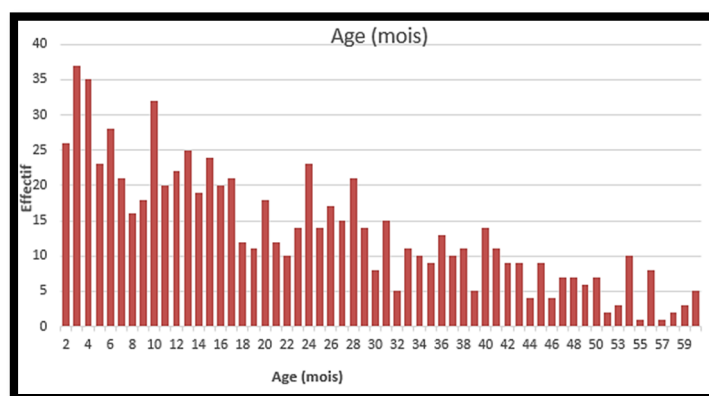


Figure 41 : Répartition des patients selon l'âge

3. Sexe

Dans notre étude, on note une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,7. Sur les 700 patients, on a 448 (64%) garçons et 252 (36%) filles.

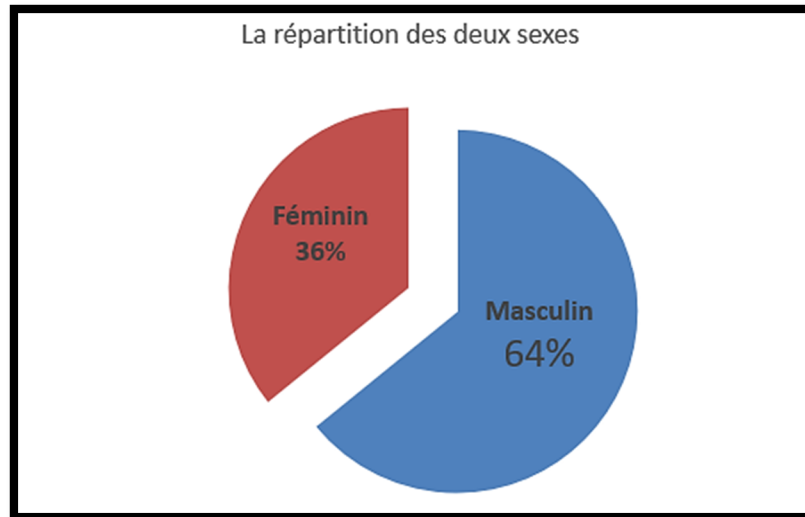


Figure 42 : Répartition des patients selon le sexe

4. Mois d'hospitalisation :

En 2011, le mois d'octobre a connu le pic d'hospitalisation avec plus 100 hospitalisations.

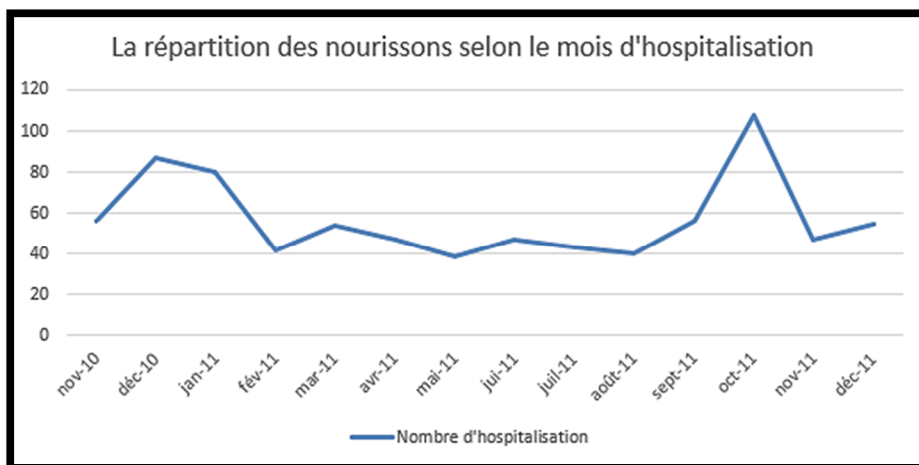


Figure 43 : Répartition des nourrissons selon le mois d'hospitalisation

5. Niveau socio- économique

Dans notre étude au moins un parent, était analphabète dans 43.4% des cas alors qu'au moins un des parents avaient un niveau universitaire dans 13.7% des cas. Les deux parents, étaient fonctionnaire dans 58/691 (8.4%) alors que 120/691 (17.4%) ne l'étaient pas.

6. Statut vaccinal

Dans notre étude 606/698 (86,8%) des enfants étaient vaccinés selon le programme national d'immunisation (PNI) y compris contre le pneumocoque et l'hémophilus, 684/700 (97,8%) enfants avaient reçu au moins une dose de vaccin anti-Hib, et 117/700 (16,7%) enfants avaient reçu aussi au moins une dose de vaccin antipneumococcique.

7. Allaitement maternel

Dans notre série 422/697 (60.6%) des enfants avaient eu un allaitement maternel lors des 6 premiers mois au moins, et 69/698(9.9%) des enfants avaient un allaitement artificiel exclusif.

II. Profil Clinique

A. Antécédents pathologiques

Des antécédents pathologiques particuliers ont été retrouvés chez plusieurs enfants et ont été répartis comme suit :

- Un antécédent de prématurité avait été retrouvé chez 52/699 des enfants (7.4%)
- Une maladie chronique diagnostiquée avait été notée chez 25/698 (3.6%)
- Une exposition au tabac avait été notée chez 282/699 (29.4%)
- 191 enfants avaient un asthme connu (27.3%)
- Une admission préalable en raison d'une maladie respiratoire avait été retrouvée chez 227/700 (32.4%)

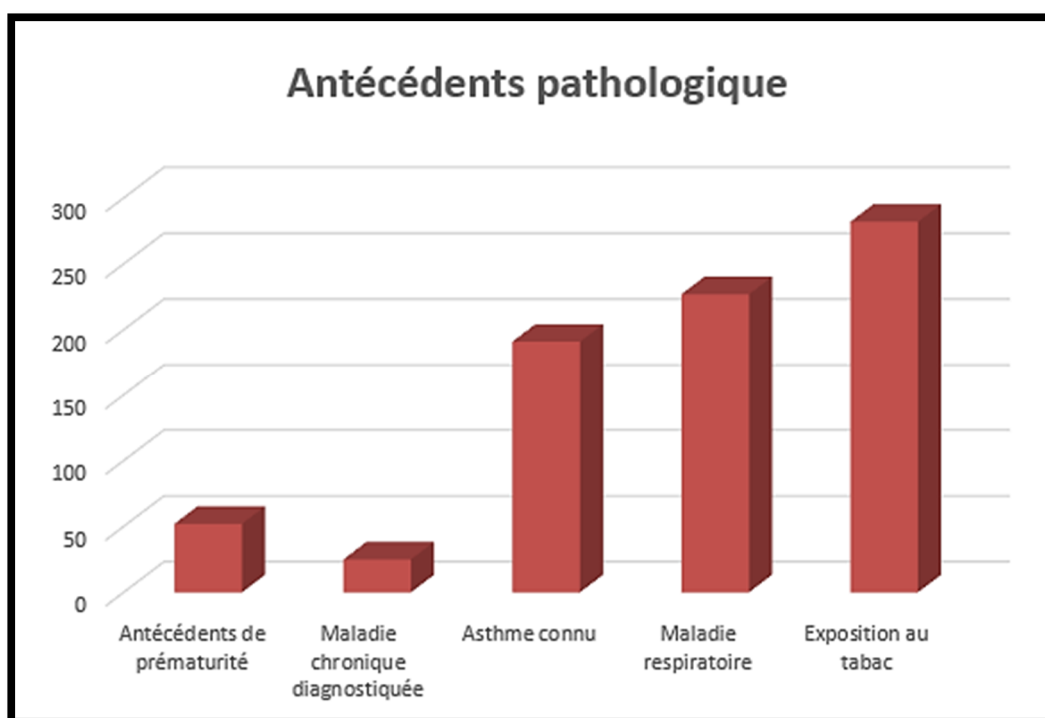


Figure 44: Antécédents pathologiques répartis selon le nombre des cas

B. Symptomatologie clinique

Le tableau clinique est fait de plusieurs symptômes, qui sont résumés par le nombre de patients dans la figure suivant :

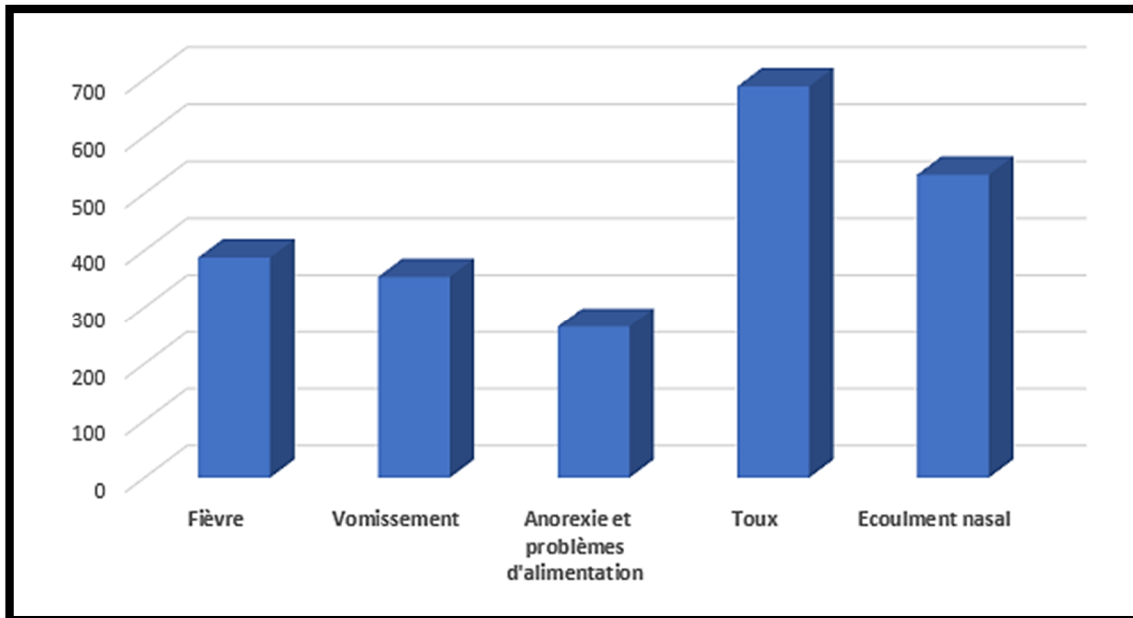


Figure 45 : Répartition des patients selon les symptômes cliniques présentés

1. Fièvre

La température moyenne à l'admission était de 39,01 °C (+0.76).

2. Détresse respiratoire :

Définie par la présence des signes de lutte respiratoire ; à type de battement des ailes du nez, d'un tirage sus sternal, d'un tirage sous ou intercostal et/ ou d'un balancement thoraco-abdominal.

3. Toux

La toux était présente à l'admission chez 688/698 de nous patients soit 98.6%

4. Autres signes cliniques

Dans l'étude de notre série, d'autres symptômes et signes cliniques ont été notés en Association aux précédents :

- **Malnutrition** (WAZ < -1 SD) : elle a été observée chez 205/687 (29.8%)
- **Malnutrition sévère** (WAZ < - 3 SD) observé essentiellement chez 37/687 (5.4%)
- **Vomissements** : étaient présentes chez 354/699 (50.6%)
- **Anorexie / problèmes d'alimentation** : a été notée chez 266/647 (41.1%)
- **Hypoxémie (SatO₂ <90%)** : a été observée chez 53/671 (7,9%)
- **Cyanose** : observé chez **63** patients sur 700 (9.0%)

5. Anomalies à l'auscultation pulmonaire :

Dans notre étude, la majorité de nos patients avaient des anomalies auscultatoires diffuses ou localisées, dont 50.7% des cas présentaient des râles ronflants et 66% des cas, des sibilants et 10% des enfants avaient des râles crépitants.

C. Prise d'antibiotique préalable

Avant l'hospitalisation un traitement antibiotique a été administré chez un tiers de nos patients (206/700). Ce traitement était constitué d'une monothérapie chez 171 patients (24.4%) et d'une bithérapie initiale chez 34 patients. Les pénicillines du groupe A (amoxicilline et amoxicilline protégée) ont été les antibiotiques les plus administrés (55%). Les autres antibiotiques prescrits étaient les céphalosporines de troisième génération chez 19 patients (10 %) et les macrolides chez 35 patients (17%), quatre patients ont reçus la cotrimoxazole.

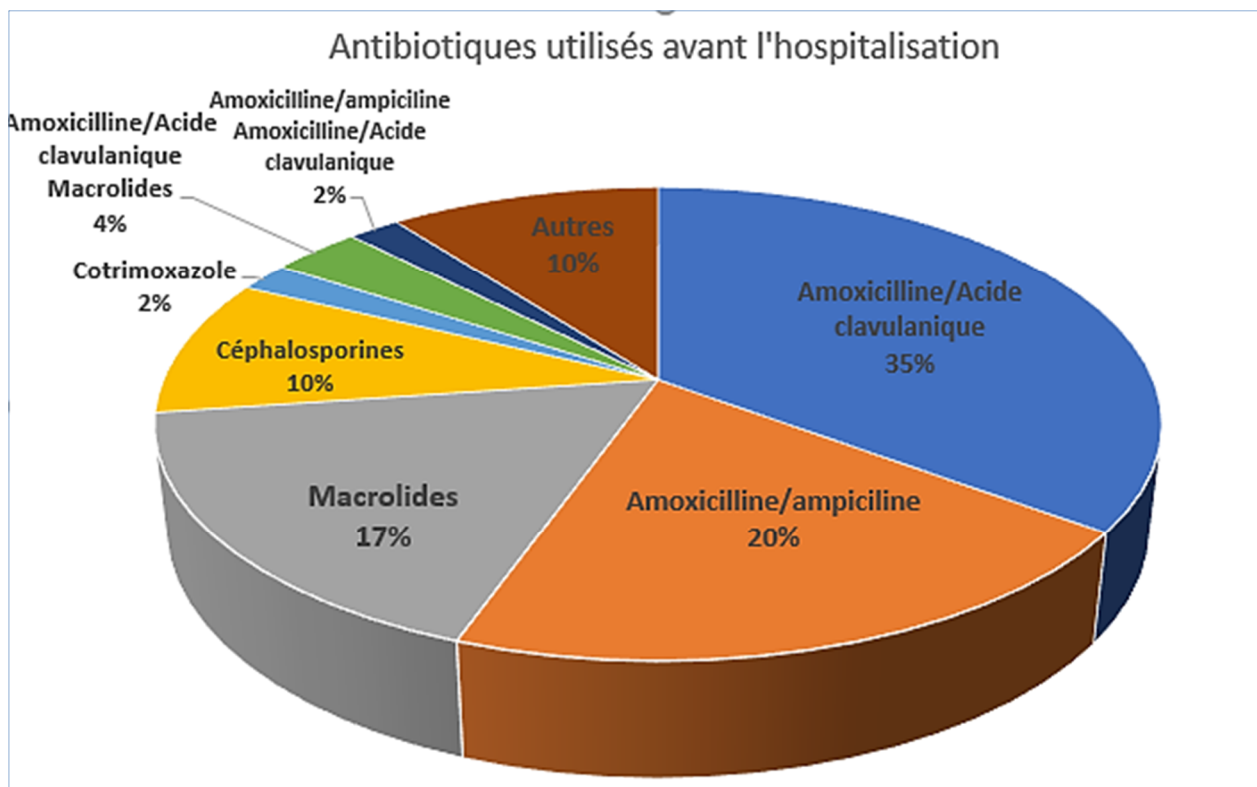


Figure 46 : Antibiotiques utilisés avant l'hospitalisation

III. Profil paraclinique

A. Radiographie pulmonaire

Dans notre étude des radiographies pulmonaires ont été réalisées chez 593(84,7%) enfants parmi 700 avec un diagnostic final.

Les radiographies thoraciques étaient considérées comme normales (71%), tandis que 19% ont montré des consolidations alvéolaires typiques [six cas (1%) avec épanchement pleural] et 10% a montré d'autres infiltrats non alvéolaires.

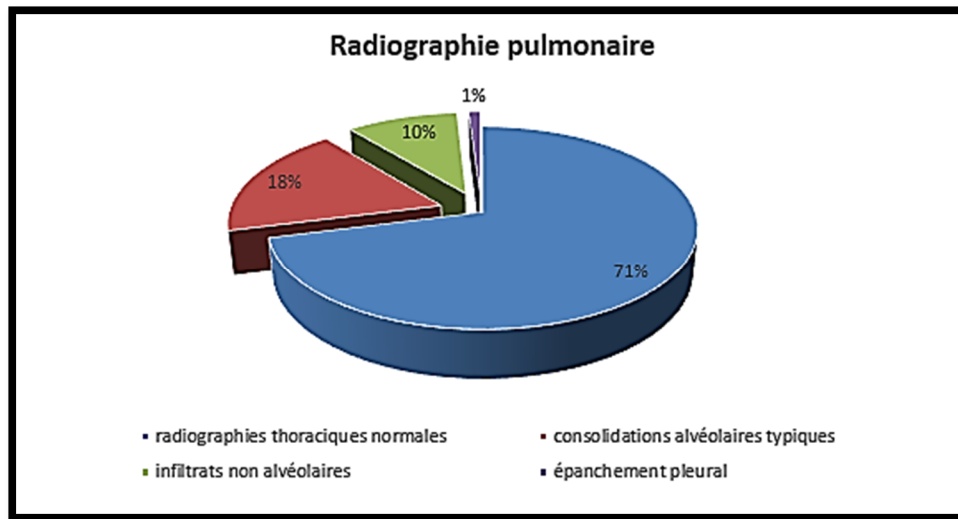


Figure 47 : Répartition des différentes anomalies radiologiques

B. Analyse Biochimique

Un syndrome infectieux a été apprécié biologiquement par la présence d'une hyperleucocytose (globules blancs $>10000/\text{mm}^3$), une CRP $>5 \text{ mg / ml}$, et une procalcitonine $>5 \text{ ng / ml}$. La numération de la formule sanguine a été réalisée chez 516 patients, alors que CRP et la procalcitonine ont été réalisées chez tous nos patients.

Dans notre série 23, 28 et 22% des patients avaient augmentation de la CRP, du PCT ou du nombre total de globules blancs respectivement, alors que 9% (7/79) avaient une faible valeur plasmatique au niveau de zinc. Voir tableau

Tableau 12 : Résultats de l'analyse biochimique de nos patients

Les variables du patient	Patients hospitalisés n/N (%)
<i>CRP (mg/dl)</i>	
Moyenne (écart-type)	2,7 (3,4)
Haute CRP (<5 mg /DL)	161/690 (23,3)
<i>Procalcitonine PCT (ng / ml)</i>	
Moyenne (écart-type)	3,4 (18,0)
Haute PCT (<5 ng /ml)	191/684 (27,9)
<i>Zinc plasmatique (µg / dl)</i>	
Moyenne (écart-type)	191(190)
Faible teneur en zinc (<65 "g / dl)	7/79 (8,9)
<i>Glycémie (mg /dl)</i>	
Moyenne (écart-type)	109 (58)
Hypoglycémie (< 60 mg /dl)	8/106 (7.6)
<i>Numération formule sanguin (NFS)</i>	
Augmentation du nombre de globules blancs	(> 20* 103 / µl)

C. Analyse microbiologique:

1. Hémoculture :

Lors de l'hospitalisation tous nos patients ont eu des hémocultures, 14 patients parmi 689 avaient une hémoculture positive soit (2%) des cas, on a mis en évidence un pneumocoque chez deux patients (0.3%) et Hib chez un patient (0.1%). voir (tableau 13)

Tableau 13 : Résultats des hémocultures effectuées chez nos patients

<i>Stérile</i>	675(98%)
<i>S. pneumoniae</i>	2
<i>Hib</i>	1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	2
<i>S. marcescens</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Salmonella spp</i>	1

2. Biologie moléculaire :

2.1. Etude de liquide d'aspiration bronchique par séquençage (tech Respifinder)

Dans notre série 684 de nos patients ont bénéficié d'une étude de liquide d'aspiration bronchique par séquençage (technique appelée Respifinder).

Le virus était presque universel (628/684, 92%). Infections mixte (double, triple, quadruple ou même quintuple) est survenue chez 40% des patients hospitalisés. RhiV était le virus le plus fréquemment détecté (53%) suivis par le VRS (18%) et l'ADV (17%), et 9% les patients hospitalisés étaient infectés par le Hmpv.

Tableau 14 : Détection des agents infectieux par séquençage multiplex dans les prélèvements naso-pharyngés

Les variables des patients	Patients hospitalises n/N (%)
Détection Virale	
Au moins un virus détecté dans l'APM	628/684 (91.8)
RSV	125/684 (18.3)
Hmpv	62/684 (9.1)
Rhinovirus	360/684 (52,6)
Adénovirus	116/684 (17,0)
Infection virale simple dans l'IR	352/684 (51,5)
Infections virales mixtes	276/684 (40.4)
Détection Bactérienne	
Mycoplasmes dans l'APM	10/684 (1.5)
Bordetella pertussis dans l'IR	5/684 (0,7)

IV. Profil thérapeutique

A. Traitements antibiotiques

Dès leur admission, 286/700 patients ont reçus un traitement antibiotique avant les résultats de la bactériologie.

➤ Dans notre étude :

- 263 patients ont reçu des β -lactamines dont 32% des céphalosporines de troisième génération (ceftriaxone 50mg/kg/j), 5,7% de l'amoxicilline –acide clavulanique (80 à100 mg/kg/j).
- Une association a un aminoside(Gentamicine) a été notée chez 36 patients
- Trois patients ont reçu l'oxacilline
- 20 patients ont reçu d'autres traitements antibiotiques

B. Traitements associés

1. Antipyrétique :

Un traitement antipyrétique a été prescrit chez tous les enfants présentant une fièvre persistante ou supérieure à 38.5°C a type de paracétamol à raison de 60mg/kg par jour en quatre ou six prises (sans dépassé 80mg/kg/jour).

2. Les bronchodilatateurs et corticoïdes

Dès leur admission, 501/700 enfants (72%) ont reçus des bronchodilatateurs, et (402/700) ont reçus des corticoïdes soit (57%).

3. Oxygénothérapie

Une oxygénothérapie a été nécessaire chez 535/700 de nos patients soit (76%).

V. Profil évolutif

A. Evolution et complication

L'évolution a été favorable chez 502 patients (72.8%), avec un délai moyen d'hospitalisation de 4 jours (IQR 2-7).

Au cours de cette étude Il y a eu 28 décès avec seulement sept d'entre eux ayant une prédisposition chronique ou état clinique prédisposant. Huit pour cent (57/699) des patients ont été admis à l'unité de soins intensifs, où les CFR ont augmenté de façon spectaculaire à 42% (23/55, $p < 0,001$).



I. Aspect épidémiologique

A. Définition :

Les Infections Respiratoires Aiguës basses (IRA basses) sont définies comme une atteinte infectieuse du parenchyme pulmonaire, des bronches et de la trachée, ces infections comportent trois entités qu'il importe de distinguer car elles diffèrent par les agents infectieux responsables, leur pronostic, leur lieu de prise en charge, leur traitement :

- **Pneumonie** : désigne un foyer de condensation pulmonaire d'origine infectieuse, indépendamment de l'agent causal, bactérien ou viral.
- **Bronchite ou trachéobronchite** : C'est une inflammation de l'arbre trachéo-bronchite, le plus souvent d'origine virale.
- **Bronchiolite** : c'est une pathologie obstructive expiratoire des voies aériennes respiratoires basses, d'étiologie très souvent virale.

B. Infections respiratoires aiguës en chiffres :

Les infections respiratoires aiguës basses (IRAB), telles que pneumonie et la bronchiolite, sont une cause majeure de la morbidité et la mortalité chez les jeunes enfants [3], L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que les infections des voies respiratoires inférieures (IRA basses) sont responsables d'environ 20% des décès chez les enfants de moins de cinq ans dans le monde, dont 90% sont des pneumonies [40].

Des estimations récentes suggèrent que l'incidence mondiale des hospitalisations chez les jeunes enfants liées à des infections sévères ou très sévères des voies respiratoires inférieures peut atteindre 11,9 millions et 3,0 millions d'épisodes annuels. Respectivement [2,41].

Au Maroc Les infections respiratoires aiguës basses (IRAB) représentent une importante cause de mortalité chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, Leur incidence a augmenté de façon statistiquement significative entre 2005 et 2011, avec un changement annuel en pourcentage (APC = 3,1 %) [42].

À notre connaissance, c'est la première série de données épidémiologiques, cliniques et de laboratoire décrivant les enfants marocains admis avec IRA.

Ces données mettent en évidence la charge et l'impact de la maladie respiratoire pédiatrique au niveau de l'hôpital pédiatrique (HER) au Maroc, et présentent probablement une bonne description de la maladie respiratoire pédiatrique dans tout le pays, entraînant une élévation inacceptable de taux de létalité de cas associés, et affectant, comme précédemment décrit dans d'autres contextes, principalement des nourrissons [41].

Dans cette série d'étude les IRA ont représenté une grande proportion de toutes les causes de consultations à HER, et leur taux de létalité associé (4,1%) était dans la partie supérieure de ce qui a été décrit précédemment pour paramètres similaires ou encore plus pauvres (allant de 0,8 à 4,8%) [41, 43].

C. Facteurs de risques :

1. Facteurs liés au terrain

L'OMS définit comme facteurs de risques majeurs des infections respiratoires basses chez l'enfant :

- La malnutrition.
- Le faible poids de naissance.
- L'absence d'allaitement maternel (pendant les 4 premiers mois de vie).
- L'absence de vaccination pendant la première année de vie.

- Pathologies associées : asthme, cardiopathie, les carences....

Dans notre étude tous ces facteurs ont été explorés. Nos résultats ont montré que 9.9% de nos patients avaient un allaitement artificiel exclusif, 3.7% n'étaient pas vaccinés et 3.6% avaient une maladie chronique diagnostiquée, 27.3% avaient un asthme connu, et 7.4% avaient un antécédent de prématurité.

2. Facteurs liés à l'environnement

Comme facteurs majeurs, on trouve :

- La pollution.
- Promiscuité et le manque d'hygiène.

D'autres facteurs ont probablement une part dans le développement des IRA basses :

- Tabagisme parental.
- Le niveau d'éducation des parents surtout de la maman

Ces facteurs ressortent clairement dans notre étude puisque au moins un parent, était analphabète dans 43.4% des cas et 29.4% de nos patients avaient une exposition au tabac.

II. ASPECT CLINIQUE

Le diagnostic d'une pneumonie de l'enfant selon les recommandations de la Haute Autorité de santé (HAS), repose sur une suspicion clinique et une confirmation radiologique, seule référence de l'atteinte parenchymateuse. Aucun signe clinique ne permet à lui seul d'écarter ou d'affirmer le diagnostic de pneumonie [20,44]

Aucun signe clinique ne permet de différencier une infection virale d'une infection bactérienne [23], ce d'autant qu'une infection virale peut précéder l'infection bactérienne. Cependant, selon le BTS (the British Thoracic Society) [20,45], la fièvre supérieure à 38.5°C, une polypnée supérieure à 50 cycle /min et des signes de lutte respiratoire sont suggestifs d'une cause bactérienne.

A. Signes fonctionnels

Il s'agit classiquement d'une fièvre, d'une toux ou d'une gêne respiratoire. D'autres symptômes peuvent être rapportés ou s'y associés, tel un malaise, une douleur abdominale ou thoracique, vomissements ...

B. Signes physiques

Les symptômes cliniques en faveur d'une atteinte des voies aériennes basses sont la fièvre, l'augmentation de la fréquence respiratoire, l'existence de signes de lutte et la présence d'anomalies à l'auscultation pulmonaire, localisées ou diffuses. Certains signes cliniques associés sont particulièrement en faveur d'une infection respiratoire basse, d'autres orientent vers le pneumocoque [23, 45].

Dans notre série, les signes respiratoires et les symptômes étaient fréquents, avec prédominance de bronchospasme (respiration sifflante 66% et rhonchi 51%).

III. Aspect paraclinique

A. Radiographie thoracique

Une radiographie pulmonaire de face, en inspiration profond, et en position debout est le seul cliché à demander. Elle possède une valeur prédictive positive de 88% et une valeur prédictive négative de 97% [44]. Le cliché de profil ne se justifie qu'en deuxième intention. Dans tous les cas, la radiographie ne doit jamais retarder la mise en route du traitement.

Dans notre série, une radiographie de thorax a été réalisée chez 593 (84,7%) de nos patients. Nos résultats ont montré que seulement 19% des patients avaient des signes radiologiques compatibles avec une pneumonie.

B. Analyse biochimique

En pratique, les examens biologiques se limitent à la C-réactive protéine (CRP). Et la numération formule sanguine (NFS).

Ces différents tests ne peuvent à eux seuls différencier avec certitude une pneumonie bactérienne d'une pneumonie virale, ni une pneumonie pneumococcique des autres pneumonies bactériennes [46- 47].

Seul un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques peut orienter le diagnostic étiologique et de ce fait la décision thérapeutique.

1. Numération formule sanguine

L'existence d'une hyperleucocytose ($GB > 20000/mm^3$) à prédominance de polynucléaires neutrophiles est évocatrice d'un syndrome infectieux bactérien, mais non spécifique.

Dans notre série, sur les 516 patients, 115 avaient des $GB > 20000/mm^3$, soit **22.3%**

2. Protéine C Réactive (CRP)

La CRP est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Elle reste le plus sensible des marqueurs habituellement employés, mais manque de spécificité [46].

D'après les données de la littérature et selon AJaye ; la CRP permet rarement de distinguer les origines bactériennes et virales dans les infections respiratoires hautes ou basses [47].

Dans notre étude 161 patients sur 690 avaient une CRP >5 ng/ml, soit **23,3%**.

3. Procalcitonine

La procalcitonine (PCT) est la pro-hormone de la calcitonine. En 1993 Gendrel et Assicot ont montré pour la première fois que la procalcitonine s'élevait dans les infections bactériennes alors qu'elle restait basse dans les infections virales et les maladies inflammatoires. Depuis cette date, de nombreux travaux sont venus confirmer l'importance de cette protéine comme marqueur des infections bactériennes sévères [46].

La procalcitonine a une sensibilité du même ordre que celle de la CRP (86% versus 88,4%), mais une spécificité très supérieure pour différencier pneumonies virales et bactériennes (87,5% versus 40%) [45 - 46].

Dans notre série, sur les 684 patients, 191 avaient une procalcitonine >5ng/ml, soit **27.9%**.

C. Analyse microbiologique

1. Hémoculture :

L'hémoculture est l'examen de référence, qui apporte avec certitude le diagnostic et permet, en outre de tester la sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques.

L'identification complète d'un pneumocoque impose de recourir au sérotypage. D'intérêt essentiellement épidémiologique, le sérotypage, nécessitant un grand nombre d'anticorps, est rarement pratiqué dans les laboratoires de diagnostic [20].

Dans notre série, 689 patients ont eu au moins une hémoculture, 14 enfants parmi eux avaient une hémoculture positive, à pneumocoque chez 2 patients. Un agent étiologique a pu être identifié dans 2% des cas.

Ce faible pourcentage peut être expliqué par le faible rendement des autres moyens diagnostiques à savoir la biologie (NFS, CRP, la procalcitonine), l'hémoculture, par l'efficacité des vaccins, et par l'antibiothérapie préalable reçue en ambulatoire avant l'admission de l'enfant.

2. Biologie moléculaire :

a. Apport du séquençage multiplex dans la prise en charge diagnostique des infections respiratoires aiguës chez l'enfant moins de 5 ans

Les infections respiratoires aiguës sont la cause la plus fréquente d'hospitalisation chez les nourrissons et les jeunes enfants. Elles sont typiquement causées par des agents pathogènes viraux ou, plus rarement, bactériens [10]. La détection de ces derniers via des méthodes non moléculaires

manque de spécificité et de sensibilité. De même pour certains types de PCR (PCR monoplexe) [48], la révélation de tous les agents pathogènes reste limitée. D'où le développement des tests multiplex pour une identification rapide et fiable.

Aujourd'hui le séquençage multiplex (Test RespiFinder19) assure la réalisation de test multiplex d'ordre élevé, en un minimum de temps avec une manipulation plus simple. Ici, nous avons démontré que le RespiFinder19 peut détecter et identifier avec précision à la fois des cibles d'ADN et d'ARN provenant d'organismes différents, y compris ceux contenus dans des échantillons de liquide d'aspiration naso-pharyngien. Le test peut également détecter efficacement plusieurs cibles dans un seul échantillon en même temps. Dans ce cadre, nous avons développé et testé la performance d'un panel cliniquement pertinent de pathogènes respiratoires, comprenant à la fois 15 virus (*Adénovirus*, *Rhinovirus*, *influenza A et B*, *Influenza A H5N1*, *Parainfluenza 1,2,3 et 4*, *RSV-A et B*, *corona 229 E*, *Corona NL63*, *Corona OC43* et *hMPV*) et quatre bactéries atypiques (*Bordetella pertussis*, *Clamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae*), comme nous avons montré les bonnes performances du système par rapport aux méthodes de laboratoire standard.

Le RespiFinder a été validé dans la série de M. Reijans et al [49], sur 144 échantillons cliniques des adultes et des enfants. Comparé aux résultats de culture cellulaire virale, le test RespiFinder a montré, d'une part, une spécificité de 99,1% pour le *Para-Influenza Virus* type 1 (PIV-1) et le PIV-3, une valeur de 98,2% pour *Adenovirus* et le *Virus Grippal A* (InfA), et 96,4%, 94,6%, 90,1%, respectivement, pour *Métapneumovirus* humain, le VRS et le Rhinovirus.

D'autre part, le test a révélé une sensibilité de 100% pour l'Adénovirus, le Métapneumovirus humain, le Virus Grippal A (InfA), le *Virus Para-Influenza* type 1 (PIV-1), le *Rhinovirus*, le VRS et 80% pour le PIV-3. Dans celle de Carmen Laurent et al [50] fait en 2009, 527 échantillons (écouvillons nasaux) analysés par PCR multiplex (Test Respifinder19), 403 (76,47%) positif. Dans 74 de ces échantillons, une co-infection avec ≥ 2 respiratoires virus a été détectée (14,04%). Les virus ayant l'incidence la plus élevée étaient : *Virus Syncytial* (34,2%), *Rhinovirus* (23,9%), *Coronavirus* (9,3%), et l'H1N1v2009 (7,7%).

Dans notre série, la propagation nasopharyngée de des virus respiratoires était très répandue chez les patients admis, 92% (628/684) des patients étant mono- ou pluri-infectés. Cela a également été observé par d'autres groupes de recherche [51], Le RhiV se classe en premier rang (53%) suivi du RSV (18%), de l'ADV (17%) et en dernier rang l'hMPV (9%), ce qui rejoint les résultats de Laurent et Reijans, en plus de mycoplasmes (1.5%) et *Bordetella pertussis* (0.7%). Bien que le rôle pathogène de certains virus (*RhiV*) soit toujours controversé, le rôle pathogène des autres virus (*RSV*, *hMPV*, *influenza* ou *ADV*) est bien souligné et leur présence est souvent associée à la gravité du tableau clinique.

Dabisch-Ruthe M et al [52], ont comparé la sensibilité analytique du test Respifinder 19 avec le VPR (xTAG Respiratory Virus Panel Fast Assay). Le RVP utilise une PCR multiplex avec des amorces marquées et une hybridation des produits de PCR en une seule étape. La détection a été réalisée en utilisant l'instrument xMAP 100 IS (Luminex Molecular Diagnostics Inc., Toronto, Canada). L'analyse de 100 échantillons de Sécrétions trachéale à été effectuée en parallèle avec le VPR et le RespiFinder-19. Dans cette analyse les virus

respiratoires ont été détectés par le RespiFinder-19 dans 64% des échantillons Secrétions trachéale et par RVP dans 22% des mêmes échantillons. Ces résultats sont comparables à ceux du Raymaekers et al. [10]. Ainsi, Le taux de co-infections dans notre étude (40,4%) était similaire à celui d'autres études [10,52], alors que le taux de détection virale exact ne peut pas être estimé. Malgré le large spectre des virus détectés, certains n'ont pas été inclus dans le panel, comme *Bocavirus*, le type *Coronavirus HKU1* et certaines espèces d'*Enterovirus*.

Cette expérience met l'accent sur la limitation des méthodes de diagnostic non-moléculaires existantes, vu que les examens cliniques et biochimiques ne reflètent pas souvent la gravité de l'infection ni l'agent responsable : 23% uniquement de CRP, 22% de la PCT représentent une valeur élevée par rapport à la normale. En plus 71% des examens radiologiques des poumons sont normaux, et 2% des cas d'hémoculture positive. De ceci découle la nécessité d'introduction du séquençage multiplex dans les laboratoires standards de microbiologie clinique et de virologie. Cependant l'adoption de cette technologie est associée à des difficultés pratiques qui limitent son utilisation de routine. Ceci exige des installations spécifiques ainsi que des formations spécialisées au profit des techniciens biologistes effectuant les tests basés sur la PCR. Par exemple, les emplacements physiquement séparés pour la préparation des échantillons, la formulation des réactifs, la mise en place de la réaction et l'amplification sont nécessaires pour minimiser le potentiel de contamination qui peut conduire à des résultats faussement positifs. Même les plates-formes PCR simples ont des exigences instrumentales qui peuvent mettre en cause la capacité des laboratoires cliniques. Malgré ces limites, le séquençage multiplex

RespiFinder® 19 a déjà démontré son utilité clinique, en particulier pour la détection et l'identification de pathogènes responsables d'infections respiratoires chez les enfants [10 - 49 ; 50 - 52].

En guise de conclusion, le séquençage multiplex (RespiFinder® 19) est une option diagnostique pertinente pour les infections respiratoires aiguës chez les enfants. Ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il assure le diagnostic différentiel des infections respiratoires, telles que la bronchiolite et la pneumonie, qui comprennent un grand nombre de pathogènes potentiels provoquant des signes et des symptômes similaires. De plus, les tests de diagnostic conventionnel pour les pathogènes respiratoires sont limités par une sensibilité médiocre ou un temps d'exécution prolongé ou des tests basés sur la culture. Enfin, l'émergence de nouveaux agents pathogènes pouvant entraîner une maladie grave, comme le SRAS et la grippe porcine de type A (H1N1-2009), exige la disponibilité des tests de diagnostic suffisamment souples pour permettre l'introduction rapide de nouvelles cibles.

Cette étude établit la base de référence pour d'autres recherches concernant les infections respiratoires pédiatriques. La charge élevée des infections respiratoires parmi les enfants marocains, comme détecté dans l'HER, soulève une alarme majeure de santé publique, en particulier en raison d'un taux élevé de létalité associée, et appelle à la mise en place d'une meilleure surveillance et des programmes de prévention pour de telles conditions.



Les infections respiratoires basses de l'enfant posent encore des problèmes difficiles en raison de la diversité des étiologies et des difficultés à les caractériser par les examens paracliniques de routine (La radiographie qui n'apporte pas d'argument sur la cause, les examens biologiques qui manquent de spécificité, et les examens microbiologiques qui sont rarement positifs) pour disposer d'un traitement spécifique.

En conclusion, nous avons montré l'importance d'un nouveau multi paramètre test respiratoire (RespiFinder) basé sur la technique de l'amplification de la sonde multiplex ligand-dépendante (MLPA) pour la détection de 15 virus respiratoires (*adénovirus*, *coronavirus 229E*, *NL63*, *OC43*, *hMPV*, *virus influenza A*, *virus influenza A H5N1*, *virus grippal B*, *PIV-1*, *-2*, *-3 et -4*, *RSV-A et -B*, *rhinovirus*), plus un contrôle d'amplification interne (ICA), et quatre bactéries atypiques (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, et *Bordetella pertussis*). La sensibilité analytique du test RespiFinder correspond à la sensibilité de monodex real-timeRT-PCR. Ce test n'a pas besoin d'équipement spécialisé mais utilise les systèmes de PCR et d'électrophorèse capillaire généralement disponible dans les laboratoires moléculaires. Le dosage peut être effectué dans un jour ouvrable et convient pour implémentation dans un environnement de diagnostic. La mise en œuvre de ce dosage pour les diagnostics de routine permet l'analyse rapide des échantillons pour un large spectre de pathogènes à un coût réduit par rapport aux coûts des tests de RT-PCR en temps réel monoplex.



RESUME

Titre : Apport du séquençage multiplex du liquide d'aspiration bronchique dans la prise en charge diagnostique des infections respiratoires chez l'enfant moins de 5 ans (à propos de 700 cas).

Auteur : AKANOU M'barek

Rapporteur : Pr .TLIGUI. Houssain

Mots clés : Infections – Respiratoires - Séquençage – Multiplex – Enfant

Les infections respiratoires aiguës basses sont considérées comme la majeure cause de consultation à l'Hôpital d'Enfants de Rabat durant les saisons froides. La majorité de ces infections sont d'origine virale et spontanément résolutive, mais l'infection virale est souvent difficile à distinguer de l'infection bactérienne.

L'application d'une réaction en chaîne par polymérase multiplex pour détecter les virus dans les sécrétions respiratoires est potentiellement bénéfique, car elle pourrait aider les médecins à éviter de donner des antibiotiques inutilement. Nous décrivons dans ce travail le séquençage multiplex (Test RespiFinder®), basé sur l'amplification de la sonde multiplex ligand-dépendante, ce test est capable de détecter 15 virus respiratoires en même temps et quatre bactéries atypiques dont la bactériologie classique est incapable d'identifier sur les milieux conventionnels.

Le test RespiFinder a été réalisé sur échantillonnage de 684 cas, D'après les résultats de cette étude, la majorité des agents incriminés était des virus à un taux de 93% avec une association allant de 2, 3 à 4 virus en même temps. *Rhinovirus* se classe en premier rang (53%) suivi de *Virus Syncytial* (18%), *Adenovirus* (17%) et en dernier rang, *Metapneumovirus* (9%), en plus de *Mycoplasmes* (1.5%) et *Bordetella pertussis* (0.7%).

Le séquençage multiplex est une technologie qui combine la rapidité, la haute sensibilité avec un très fort débit ce qui permet une détection simultanée des pathogènes responsables de l'infection respiratoire, d'autre part cette technologie peut être utilisée aussi dans le dépistage des infections respiratoires virales asymptomatiques permettant de mieux gérer ce type d'infection et d'étudier leur pouvoir pathogène.

ABSTRACT

Title: Contribution of multiplex sequencing of bronchial aspiration fluid in the diagnostic management of respiratory infections in children under 5 years (about 700 cases).

Auteur: AKANO M'barek

Supervisor: Pr .TLIGUI. Houssain

Keywords: Infections - Respiratory - Sequencing - Multiplex - Child

Acute lower respiratory infections are considered to be the major cause of consultation at Rabat Children's Hospital during the cold seasons. Most such infections are of viral origin and self-limiting, but viral infection is often difficult to distinguish from the bacterial infection.

The application of a multiplex polymerase chain reaction to detect viruses in respiratory secretions is potentially beneficial because it could help doctors avoid giving antibiotics unnecessarily. We describe in this work the multiplex sequencing (RespiFinder® test), based on the multiplex ligation-dependent probe amplification, this test is able to detect 15 respiratory viruses at the same time and four atypical bacteria whose classical bacteriology is unable to identify on conventional media.

The RespiFinder test was performed on a sample of 684 cases. According to the results of this study, the majority of the offending agents were viruses at a rate of 93% with an association ranging from 2, 3 to 4 viruses at the same time. *Rhinovirus* ranks first (53%) followed by *Syncytial Virus* (18%), *Adenovirus* (17%) and lastly, *Metapneumovirus* (9%), in addition to *Mycoplasma* (1.5%) and *Bordetella pertussis* (0.7%).

Multiplex sequencing is a technology that combines speed, high sensitivity with a very high throughput which allows the simultaneous detection capacity of the pathogens responsible for the respiratory infection; on the other hand this technology can be used also in the detection of asymptomatic viral respiratory infections to better manage this type of infection and to study their pathogenicity.

ملخص

العنوان : مساهمة متعدد التسلسل لسائل الارتشاف القصي في تشخيص التهابات الجهاز التنفسي الحادة للأطفال دون سن 5 سنوات (حوالي 700 حالة).

المؤلف : الكنر مبارك

المشرف : حسين تليكي

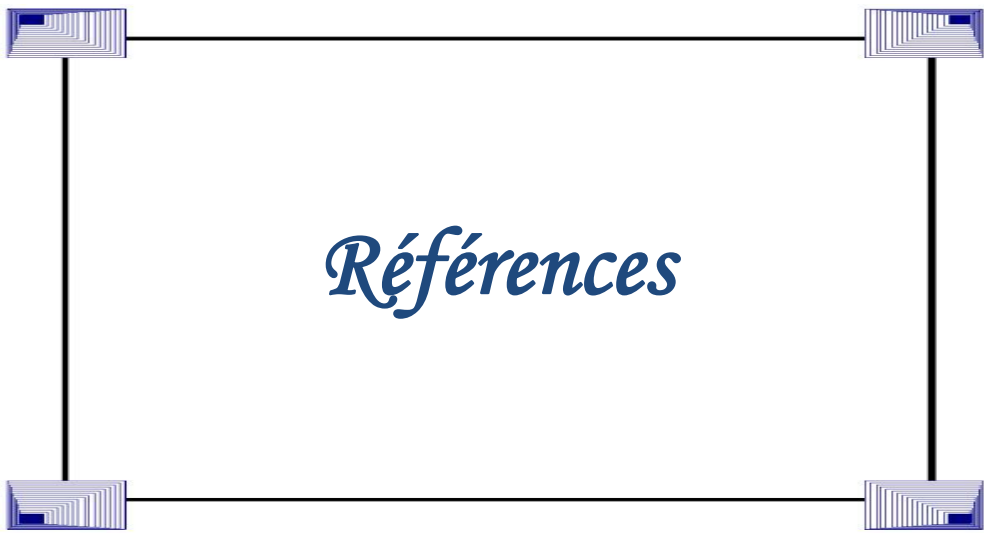
الكلمات الأساسية : التهابات - الجهاز التنفسي - متعدد- التسلسل - الطفل.

تعتبر التهابات الجهاز التنفسي السفلي الحادة السبب الرئيسي للاستشارة بمستشفى الأطفال بالرباط خلال المواسم الباردة. معظم هذه الإصابات هي من أصل فيروسي ذاتية الحل، ولكن العدوى الفيروسية غالباً ما يكون من الصعب التمييز بينها وبين العدوى البكتيرية.

تطبيق تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد للكشف عن الفيروسات في إفرازات الجهاز التنفسي قد يكون مفيداً لأنه يمكن أن يساعد الأطباء على تجنب إعطاء المضادات الحيوية دون داعٍ منها. نصف في هذا العمل متعدد التسلسل (اختبار ريسبي فيندر)، يستند إلى تضخيم مسبار متعدد يعتمد على مربوطات، هذا الاختبار قادر على الكشف عن 15 فيروسات الجهاز التنفسي في نفس الوقت وأربع بكتيريات غير نمطية والتي لا يستطيع علم الجراثيم الكلاسيكي التعرف عليها في البيئات التقليدية.

تم إجراء اختبار ريسبي فيندر على عينات من 684 حالة. وفقاً لنتائج هذه الدراسة، فإن غالبية العوامل المتورطة هي الفيروسات بمعدل 93% مع مزيج من 2، 3 إلى 4 فيروسات في نفس الوقت. يحتل رينوفيروس في المرتبة الأولى (53%) يليه فيروس سينسيتيال (18%) و الأدينو فايروس (17%) وأخيراً ميتابينيوفيروس (9%)، بالإضافة إلى الميكوبلازما (1.5%) وبورديتيلا السعال الديكي (0.7%).

متعدد التسلسل هي التكنولوجيا التي تجمع بين السرعة والحساسية العالية مع التدفق العالي جداً مما يتيح القدرة على الكشف في وقت واحد عن مسببات الأمراض المسؤولة عن التهابات الجهاز التنفسي، من ناحية أخرى يمكن استخدام هذه التكنولوجيا أيضاً في الكشف عن الالتهابات التنفسية الفيروسية بدون أعراض مما يمكن التعامل بشكل أفضل مع هذا النوع من العدوى ودراسة إمرضيتها.



- [1] **Imane Jroundi, Chafiq Mahraoui, Rachid Benmessaoud, et al.** The epidemiology and aetiology of infections in children admitted with clinical severe pneumonia to a university hospital in Rabat, Morocco. *Journal of Tropical Pediatrics* Advance Access published February 25, 2014
- [2] **Jroundi I, Benmessaoud R, Mahraoui C, et al.** Antibiotic usage prior and during hospitalization for clinical severe pneumonia in children under five years of age in Rabat, Morocco. *Antibiotics* 2013;2:450–64
- [3] **Liu, L.; Johnson, H.L.; Cousens, S.; Perin, J.; Scott, S.; Lawn, J.E.; Rudan, I.; Campbell, H.; Cibulskis, R.; Li, M.; et al.** Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012, 379, 2151–2161.
- [4] **Kronman, M.P.; Hersh, A.L.; Feng, R.; Huang, Y.S.; Lee, G.E.; Shah, S.S.** Ambulatory visit rates and antibiotic prescribing for children with pneumonia, 1994–2007. *Pediatrics* 2011, 127, 411–418.
- [5] **O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al.** Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009; 374:893–902.
- [6] **Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, et al.** Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009;374:903–11.
- [7] **Obaro SK, Madhi SA.** Bacterial pneumonia vaccines and childhood pneumonia: are we winning, refining, or redefining? *Lancet Infect Dis* 2006;6:150–61.
- [8] **Falade AG, Ayede AI.** Epidemiology, aetiology and management of childhood acute community-acquired pneumonia in developing countries—a review. *Afr J. Med M ed Sci* 2011;40:293–308.

- [9] **Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, Meyers L, Nilsson K, Jones DE, et al.** (2011) FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection: Development and Application to Respiratory Tract Infection. PLoS ONE 6(10): e26047
- [10] **Raymaekers M, de Rijke B, Pauli I, Van den Abeele A-M, Cartuyvels R:** Timely diagnosis of respiratory tract infections: Evaluation of the performance of the Respifinder assay compared to the xTAG Respiratory Viral Panel assay. J Clin Virol 2011, 52(4):314–316.
- [11] **SIDIBE D.** Pneumopathies bactériennes dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré .Thèse de médecine, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d’Odonto-Stomatologie du Mali 2006, n° --, 15p
- [12] **OMS.** Les infections respiratoires aiguës, W H O /ARI, 90 :17.
- [13] **TAYTARD A.** Méfaits et bienfaits du climat : le « coup de froid » est-il une réalité pathogénique ? In « temps, espace et infections » . Editions EDK, Paris, 2002 : 115-117
- [14] **NAJIM R.** Les infections respiratoires récidivantes chez l’enfant. Thèse de médecine, Faculté de Médecine et de Pharmacie Fès 2013, n° 043/13, 11p, 12p, 13p
- [15] **WAYOFF M, JANKOWSKI R.** Mécanismes de défense des voies aérienne. In : « Infections des voies aériennes hautes et basses ». PIL Edit. Pour ABBOTT, Paris, 1997 : 29-52
- [16] **REINERT P.** Infections à répétition : facteurs d’adaptation ou rôle délétère ? In « temps, espace et infections ». Editions EDK, Paris, 1997 : 13-17
- [17] **COHEN R, BEGUE P, REINERT P.** flore rhinopharyngée de l’enfant normal. In : « la colonisation microbienne des voies respiratoires ».Eurotext, Paris 1999 : 17-25.

- [18] **LARABI I , LOUADJ Z.** Les Pneumopathies Bactériennes Chez L'Enfant. Mémoire de fin D'Etudes, Université ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEN Faculté de médecine 2014-2015, 15p
- [19] **Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard-Alex Gaüzère.** Infections respiratoires aiguës Actualités 2016. Diplôme de médecine tropicale des pays de l'océan indien
- [20] **LAHLIMI F. E.** Pneumonies De L'enfant À propos de 270 cas, Thèse de médecine, Faculté de Médecine et de Pharmacie de MARRAKECH, 2013, N° 27, 49p.
- [21] **OMS :** Programme de lutte contre les infections respiratoires aiguës, Genève. Infections Respiratoires Aiguës chez l'enfant : Prise en charge dans les petits hôpitaux des pays en développement. Manuel à l'usage des médecins et autres personnels de santé qualifiés
- [22] **Baky S.** Etude des IRA En milieu Communautaire Chez les Enfants de Moins de 5 Ans dans les régions de Kayes, Sikasso, Segou et Mopti. Thèse de médecine, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako 2010,n°-- ,15p,16p,17p,18p
- [23] **V. Marchac.** Différence de diagnostic des infections broncho-pulmonaires virales ou bactériennes chez l'enfant, Archives de pédiatrie 14 (2007) 202–206.
- [24] **Tessa Wardlaw, Emily White Johansson (UNICEF), Matthew Hodge.** La pneumonie de l'enfant : un fléau oublié, 2006. Produit par la Division de la Communication de l'UNICEF. ISBN : 978-92-806-4049-6
- [25] **James M. Heather, Benjamin Chain.** The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, Division of Infection & Immunity, UCL Cruciform Building, Gower Street, London, 6 November 2015

- [26] **Mehdi Kchouk, Jean-François Gibrat and Mourad Elloumi.** Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation
Published date: March 06, 2017, 0974-8369
- [27] **Amy Rogers, M.D., Ph.D.** DNA Sequencing: Sanger Method (Dideoxynucleotide chain termination) URL: www.csus.edu/indiv/r/rogersa/bio181/seqsanger.pdf,
- [28] **Stéphane Le Crom.** Le séquençage à haut débit, Atelier Épигénétique, Université Pierre et Marie Curie, Juin 2012.
- [29] **Rowena F. Stern, Roland G. Roberts, et al.** Multiplex ligation-dependent probe amplification using a completely synthetic probe set. September 2004, 37:399-405
- [30] **Lamoril J, Bogard M.** La médecine génomique, une réalité en pleine évolution Deuxième partie. Ann Biol Clin 2014 ; 72(1) : 25-48
- [31] **C. Coutton, G. Vieville, V. Satre, et al.** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and custom made probes. Guidelines, recommendations and experience at the University Hospital of Grenoble. IRBM 33 (2012) 227–235
- [32] **Analyse mutationnelle du gène du récepteur de la thyroestimuline (TSHR) par séquençage et MLPA.** Institut national d'excellence en santé et en services sociaux, Québec, Canada. (RÉFÉRENCE 2014.01.008).
- [33] **Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide, Part Number 4401661 Rev. C 06/2010.**
- [34] **Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide, Chapitre 5: Calibrate and check Performance Page 99.**

- [35] **Brandon C. Durney Cassandra L. Crihfield Lisa A. Holland.** Capillary electrophoresis applied to DNA: determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009–2014), September 2015, Volume 407, Issue 23, pp 6923–6938
- [36] **Séverine ESCAICH**, séquençage : électrophorèse sur capillaires, Extrait du rapport de Stage. institut cochin paris France.
- [37] Capillary Electrophoresis Products, Applied Biosystems Genetic Analyzer User Guide, by life technologies,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_101553.pdf. page consulté le 29/01/18
- [38] **Applied Biosystems**, MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Part Number AM1840) Protocol, July 21, 2008.
- [39] **Applied Biosystems**, TrueScience™ RespiFinder® Identification Panels, Part Number 4461372 Rev. B 07/2011
- [40] **Carrie Reed , Shabir A. Madhi, Keith P. Klugman, Locadiah Kuwanda, et al .** Development of the Respiratory Index of Severity in Children (RISC) Score among Young Children with Respiratory Infections in South Africa, PLoS ONE 7(1): e27793, Published: January 4, 2012
- [41] **Nair, H.; Simoes, E.A.; Rudan, I.; Gessner, B.D.; Azziz-Baumgartner, E.; Zhang, J.S.; Feikin, D.R.; Mackenzie, G.A.; Moisi, J.C.; Roca, A.; et al.** Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: A systematic analysis. *Lancet* 2013, *381*, 1380–1390

- [42] **N. Bennani Mechita, R. Razine, A. Elmarnissi, L. Lahlou, M. Obtel, et al.** Évolution des Infections respiratoires aiguës basses chez les enfants âgés de moins de 5 ans au Maroc, PM9. Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique Volume 65, Supplément 2, May 2017, Pages S72-S73.
- [43] **Ayieko P, Okiro EA, Edwards T, et al.** Variations in mortality in children admitted with pneumonia to Kenyan hospitals. *PloS One* 2012; 7:e47622.
- [44] **R. Bourayou , F. Zenkhri, D. Pariente, I. Koné-Paut.** Quel est l'intérêt de la radiographie du thorax dans le diagnostic d'une pneumonie de l'enfant en 2011 ? § What is the value of the chest radiography in making the diagnosis of children pneumonia in 2011?, *Archives de pédiatrie* 18 (2011) 1251–1254.
- [45] **Michael Harris, Julia Clark, Nicky Coote, Penny Fletcher, et al.** British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 201, 66, 22 – 34,
- [46] **D. Gendrel. F.Moulin M. Lorrot, E. Marc, S. Guérin, et al.** Procalcitonine et marqueurs de l'infection dans les pneumonies communautaires de l'enfant, Médecine et Maladies Infectieuses. Volume 32, Issue 2, 2002, Pages 88-97.
- [47] **Ajay Gupta, Iolo Doullw.** Management and complications of bacterial pneumonia, *Current Paediatrics*(2003) 13, 382—387.
- [48] **Krause JC, Panning M, Hengel H, Henneke P:** The role of multiplex PCR in respiratory tract infections in children. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111: 639–45

- [49] **Martin Reijans, Gijs Dingemans, Corné H. Klaassen, et al.** RespiFinder: a New Multiparameter Test To Differentially Identify Fifteen Respiratory Viruses, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 2008, p. 1232–1240.
- [50] **Carmen Laurent, Audrey E. Dugué, Jacques Brouard, et al.** Viral Epidemiology and Severity of Respiratory Infections in Infants in 2009 A Prospective Study, August 2012 - Volume 31 - Issue 8 - p 827–831
- [51] **Krunic N, Yager TD, Himsworth D, Merante F, Yaghoubian S, Janeczko R:** xTAG RVP assay: analytical and clinical performance. *J Clin Virol* 2007, 40(Supplement 1):S39–S46
- [52] **Mareike Dabisch-Ruthe, Tanja Vollmer, Ortwin Adams, et al.** Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay, 24 July 2012. 12:163.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضواً في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- ◀ بأن أكرس حياتي لخدمة الإنسانية.
 - ◀ وأن أحترم أسانذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه.
 - ◀ وأن أمارس مهنتي بوانزع من ضميري وشرية في جعل صحة مريض هدي في الأول.
 - ◀ وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي.
 - ◀ وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب.
 - ◀ وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي.
 - ◀ وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي.
 - ◀ وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها.
 - ◀ وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد.
 - ◀ بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسما بشري في.
- والله على ما أقول شهيد .

**مساهمة متعدد التسلسل لسائل الإرتشاف القصي
في تشخيص التهابات الجهاز التنفسي الحادة
للأطفال دون سن الخمس سنوات
(بصدد 700 حالة)**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرفه

السيد: مبارك أكنو

المولد في: 25 يونيو 1991 بتمزيت (تارودانت)

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: التهابات - الجهاز التنفسي - متعدد - التسلسل - الطفل

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: ميمون زوهدي

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

مشرف

السيد: حسين تليكي

أستاذ في علم الطفيليات

أعضاء

السيدة: مريم الصفار

أستاذة في علم الأحياء الدقيقة

السيد: حسين آيت وعمر

أستاذ في طب الأطفال