



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



Année: 2021

Thèse N°: 45

GENOMIQUE ET METAGENOMIQUE : IMPORTANCE ET APPLICATION DANS LES INFECTIONS BACTERIENNES

THESE

Présentée et soutenue publiquement le : / /2021

PAR

Madame Ghizlan TOUIJER

*Pour l'Obtention du Diplôme de
Docteur en Médecine*

Mots Clés : Génomique; Infection; Métagénomique; Résistance; Séquençage

Membres du Jury :

Monsieur Mimoun ZOUHDI

Professeur de Microbiologie

Monsieur Yassine SEKHSOKH

Professeur de Microbiologie

Monsieur Ahmed GAOUZI

Professeur de Pédiatrie

Madame Saïda TELLAL

Professeur de Biochimie

Madame Mariama CHADLI

Professeur de Microbiologie

Président

Rapporteur

Juge

Juge

Juge



إلا ما علمتنا إنك أنت العليم الحكيم
اللهم علمنا ما ينفعنا وأنفعنا بما علمتنا
وزدنا علماً وأرنا الحق حقاً وأرزقنا إتباعه
وأرنا الباطل باطلاً وأرزقنا إجتنابه
وأجعلنا ممن يستمعون القول
فيتبعون أحسنه وأدخلنا برحمتك
في عبادك الصالحين



UNIVERSITE MOHAMMED V

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

RABAT

1. 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 :

<i>Doyen</i>	Professeur Mohamed ADNAOUI
<i>Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et Estudiantines</i>	Professeur Brahim LEKEHAL
<i>Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération</i>	Professeur Toufiq DAKKA
<i>Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie</i>	Professeur Younes RAHALI
<i>Secrétaire Général</i>	Mr. Mohamed KARRA

* Enseignants Militaires

1 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

2. PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne - *Clinique Royale*
Anesthésie -Réanimation
Pathologie Chirurgicale

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne - *Doyen de la FMPR*
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. TAZI Saoud Anas

Gynécologie -Obstétrique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZAD Rachid

Anesthésie Réanimation- *Doyen de FMPO*
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique *Méd. Chef Maternité des*

Orangers

Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie- *Dir. du Centre National PV Rabat*
Chimie thérapeutique__

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale *Doyen de FMPT*
Anesthésie Réanimation
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

* Enseignants Militaires

Mars 1994

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

EMPA

Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la

Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale - Directeur du CHIS
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Chirurgie Générale
Gynécologie -Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie Inspecteur du SSM
Pédiatrie
Traumatologie – Orthopédie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Néphrologie
Cardiologie Directeur HMI Mohammed V

* Enseignants Militaires

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BIROUK Nazha
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Neurologie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie *Directeur Hôp. Ar-razi Salé*
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Neurologie *Doyen de la FMP Abulcassîs*
Abdesslam Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUAMAR 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. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie *Directeur Hôp. My Youssef*
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

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. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie - *Directeur Hôp. Cheikh Zaid*
Urologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJILIL Maria

Anesthésie-Réanimation
Neurologie

* Enseignants Militaires

Pr. BENAMAR Loubna
 Pr. BENAMOR Jouda
 Pr. BENELBARHDADI Imane
 Pr. BENNANI Rajae
 Pr. BENOUECHANE Thami
 Pr. BEZZA Ahmed*
 Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
 Pr. BOUMDIN El Hassane*
 Pr. CHAT Latifa
 Pr. DAALI Mustapha*
 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. KABIRI EL Hassane*
 Pr. LAMRANI Moulay Omar
 Pr. LEKEHAL Brahim

Est.

Pr. MEDARHRI Jalil
 Pr. MIKDAME Mohammed*
 Pr. MOHSINE Raouf
 Pr. NOUINI Yassine
 Pr. SABBAH Farid
 Pr. SEFIANI Yasser
 Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 Pr. AMEUR Ahmed *
 Pr. AMRI Rachida
 Pr. AOURLARH Aziz*
 Pr. BAMOU Youssef *
 Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 Pr. BENZEKRI Laila
 Pr. BENZZOUBEIR Nadia
 Pr. BERNOUSSI Zakiya
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *

Néphrologie
 Pneumo-phtisiologie
 Gastro-Entérologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Rhumatologie
 Anatomie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie - **Directeur Hôp. Univ. Cheikh Khalifa**
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie Générale **Directeur Hôpital Ibn Sina**
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique ***V-D chargé Aff Acad.***

Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie **Dir.-Adj. HMI Mohammed V**
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie

* Enseignants Militaires

Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

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

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 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. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre *
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

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

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. BAHIRI Rachid
 Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 Pr. HAJJI Leila
 Pr. HESSISSEN Leila
 Pr. JIDAL Mohamed*

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Rhumatologie *Directeur Hôp. Al Ayachi Salé*
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Biophysique
 Cardiologie (mise en disponibilité)
 Pédiatrie
 Radiologie

* Enseignants Militaires

Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*

Rhumatologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio - Vasculaire. *Directeur Hôpital Ibn Sina*

Marr.

Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
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. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie - Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
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 *

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique

* Enseignants Militaires

Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHERKAOUI Naoual *
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 Pr. EL BEKKALI Youssef *
 Pr. EL ABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Nouredine
 Pr. HADADI Khalid *
 Pr. ICHOU Mohamed *
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LOUZI Lhoussain *
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed *
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 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

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali *
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BJJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. BOUI Mohammed *

* Enseignants Militaires

Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio-vasculaire
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologie biologique
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie-orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Médecine interne
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie ***Directeur Hôp.des Spécialités***
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie

Pr. BOUNAIM Ahmed *

Pr. BOUSSOUGA Mostapha *

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. LAMSAOURI Jamal *

Pr. MARMADE Lahcen

Pr. MESKINI Toufik

Pr. MESSAOUDI Nezha *

Pr. MSSROURI Rahal

Pr. NASSAR Ittimade

Pr. OUKERRAJ Latifa

Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha

Pr. AMEZIANE Taoufik*

Pr. BELAGUID Abdelaziz

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

Decembre 2010

Pr. ZNATI Kaoutar

Chirurgie Générale

Traumatologie-orthopédie

Chirurgie Vasculaire Périphérique

Hématologie clinique

Chirurgie Générale

Microbiologie

Médecine interne

Gynécologie obstétrique

Rhumatologie

Gastro-entérologie

Pédiatrie

Pédiatrie

Chimie Thérapeutique

Chirurgie Cardio-vasculaire

Pédiatrie

Hématologie biologique

Chirurgie Générale

Radiologie

Cardiologie

Pneumo-Phtisiologie

Anesthésie réanimation

Médecine Interne *Directeur ERSSM*

Physiologie

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

Anatomie Pathologique

* Enseignants Militaires

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil *
Pr. BENCHEBBA Driss *
Pr. DRISSI Mohamed *
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL OUAZZANI Hanane *
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. RAISSOUNI Maha *

Chirurgie pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Traumatologie-orthopédie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique
Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
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 JAOUDI Rachid *
Pr. EL KABABRI Maria
Pr. EL KHANNOUSSI Basma
Pr. EL KHLOUFI Samir
Pr. EL KORAICHI Alae
Pr. EN-NOUALI Hassane *
Pr. ERRGUIG Laila

Pharmacologie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique et Bromatologie
Traumatologie orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologique
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie

* Enseignants Militaires

Pr. FIKRI Meryem
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed *
 Pr. LATIB Rachida
 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 *

AVRIL 2013

Pr. EL KHATIB MOHAMED KARIM *

MARS 2014

Pr. ACHIR Abdellah
 Pr. BENCHAKROUN Mohammed *
 Pr. BOUCHIKH Mohammed
 Pr. EL KABBAJ Driss *
 Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
 Pr. HARDIZI Houyam
 Pr. HASSANI Amale *
 Pr. HERRAK Laila
 Pr. JANANE Abdellah *
 Pr. JEAIDI Anass *

Radiologie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique *Vice-Doyen à la Pharmacie*
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Chirurgie Thoracique
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Thoracique
 Néphrologie
 Biochimie-Chimie
 Histologie- Embryologie-Cytogénétique
 Pédiatrie
 Pneumologie
 Urologie
 Hématologie Biologique

* Enseignants Militaires

Pr. KOUACH Jaouad*
Pr. LEMNOUER Abdelhay*
Pr. MAKRAM Sanaa *
Pr. OULAHYANE Rachid*
Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
Pr. SEKKACH Youssef*
Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Génycologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Médecine Interne
Généologie-Obstétrique

DECEMBRE 2014

Pr. ABILKACEM Rachid*
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila
Pr. BEKKALI Hicham *
Pr. BENAZZOU Salma
Pr. BOUABDELLAH Mounya
Pr. BOUCHRIK Mourad*
Pr. DERRAJI Soufiane*
Pr. DOBLALI Taoufik
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*
Pr. EL MARJANY Mohammed*
Pr. FEJJAL Nawfal
Pr. JAHIDI Mohamed*
Pr. LAKHAL Zouhair*
Pr. OUDGHIRI NEZHA
Pr. RAMI Mohamed
Pr. SABIR Maria
Pr. 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.

AOUT 2015

Pr. MEZIANE Meryem
Pr. TAHIRI Latifa

Dermatologie
Rhumatologie

PROFESSEURS AGREGES :

JANVIER 2016

Pr. BENKABBOU Amine
Pr. EL ASRI Fouad*
Pr. ERRAMI Noureddine*
Pr. NITASSI Sophia

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

JUIN 2017

Pr. ABBI Rachid*
Pr. ASFALOU Ilyasse*

Microbiologie
Cardiologie

* Enseignants Militaires

Pr. BOUAYTI El Arbi*
Pr. BOUTAYEB Saber
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim
Pr. HAFIDI Jawad
Pr. OURAINI Saloua*
Pr. RAZINE Rachid
Pr. ZRARA Abdelhamid*

Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Oncologie Médicale
Oncologie Médicale
Anatomie
O.R.L
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Immunologie

NOVEMBRE 2018

Pr. AMELLAL Mina
Pr. SOULY Karim
Pr. TAHRI Rajae

Anatomie
Microbiologie
Histologie-Embryologie-Cytogénétique

NOVEMBRE 2019

Pr. AATIF Taoufiq *
Pr. ACHBOUK Abdelhafid *
Pr. ANDALOUSSI SAGHIR Khalid *
Pr. BABA HABIB Moulay Abdellah *
Pr. BASSIR RIDA ALLAH
Pr. BOUATTAR TARIK
Pr. BOUFETTAL MONSEF
Pr. BOUCHENTOUF Sidi Mohammed *
Pr. BOUZELMAT Hicham *
Pr. BOUKHRIS Jalal *
Pr. CHAFRY Bouchaib *
Pr. CHAHDI Hafsa *
Pr. CHERIF EL ASRI Abad *
Pr. DAMIRI Amal *
Pr. DOGHMI Nawfal *
Pr. ELALAOUI Sidi-Yassir
Pr. EL ANNAZ Hicham *
Pr. EL HASSANI Moulay EL Mehdi *
Pr. EL HJOUI Aabderrahman *
Pr. EL KAOUI Hakim *
Pr. EL WALI Abderrahman *
Pr. EN-NAFAA Issam *
Pr. HAMAMA Jalal *
Pr. HEMMAOUI Bouchaib *
Pr. HJIRA Naoufal *
Pr. JIRA Mohamed *
Pr. JNIENE Asmaa
Pr. LARAQUI Hicham *
Pr. MAHFOUD Tarik *

Néphrologie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
Radiothérapie
Gynécologie-obstétrique
Anatomie
Néphrologie
Anatomie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Traumatologie-orthopédie
Traumatologie-orthopédie
Anatomie Pathologique
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Anesthésie-réanimation
Pharmacie Galénique
Virologie
Gynécologie-obstétrique
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Anesthésie-réanimation
Radiologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
O.R.L
Dermatologie
Médecine Interne
Physiologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale

* Enseignants Militaires

Pr. MEZIANE Mohammed *
Pr. MOUTAKI ALLAH Younes *
Pr. MOUZARI Yassine *
Pr. NAOUI Hafida *
Pr. OBTEL Majdouline
Pr. OURRAI Abdelhakim *
Pr. SAOUAB Rachida *
Pr. SBITTI Yassir *
Pr. ZADDOUG Omar *
Pr. ZIDOUH Saad *

Anesthésie-réanimation
Chirurgie Cardio-vasculaire
Ophtalmologie
Parasitologie-Mycologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pédiatrie
Radiologie
Oncologie Médicale
Traumatologie Orthopédie
Anesthésie-réanimation

** Enseignants Militaires*

2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

3. 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 .BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie-chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. YAGOUBI Maamar	Environnement,Eau et Hygiène
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

Mise à jour le 11/06/2020

KHALED Abdellah

Chef du Service des Ressources Humaines

FMPR

** Enseignants Militaires*



Je dédie cette thèse

A DIEU le Donateur gracieux

*Aucun mot ne peut exprimer ma gratitude vers vous,
Merci d'avoir accepté mes prières et d'avoir pardonné mes péchés,
C'est avec votre pouvoir que j'ai pu réaliser mon rêve, Merci d'être
toujours à mes côtés et de veiller sur moi,*

اللهم لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك





A MES CHERS PARENTS,

Maman, NAZHA BELKHOV, Merci de m'avoir appris d'être forte dans toutes les situations difficile, de donner à chaque chose sa vraie valeur, et de se relever après chaque échec et de réessayer encore et encore jusqu'à réussir, Maman, tes prières m'ont toujours secouru pour bien étudier et réaliser mes rêves. Ma chère, aucune dédicace ne pourrait exprimer ce que tu mérites et la fierté que je ressens d'être ta fille bien aimée.

Mon cher Papa, HASSAN TOUIJER J'ai eu l'honneur d'être ta fille ainée et de porter ton nom,

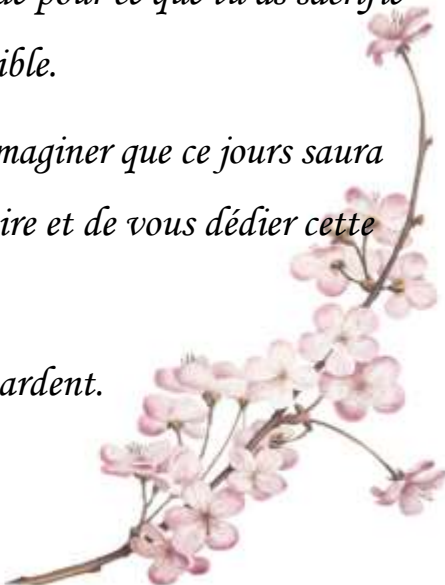
Merci de m'avoir mis dans son monde, de m'avoir protégé, de m'avoir soutenu, et de m'accepter pour ce que je suis,

On dit toujours que le père est le premier amour de sa fille, je t'aime Papa, et je sais qu'aucune dédicace ne peut exprimer ma gratitude pour ce que tu as sacrifié pour qu'on mène une vie paisible.

Mes chers parents, sans vous je n'aurai jamais pu imaginer que ce jours saura réel, c'est pour cela la moindre chose que je peux faire et de vous dédier cette thèse

Qu'Allah le préservateur, vous gardent.

Je vous aime.



A ma sœur IBTISSAM TOUIJER,

Tu es la petite de la maison, la fille la plus adorable, merci d'avoir accepté mes caprices et de me fournir ton aide pour réaliser ma thèse malgré mon mauvais caractère,

Je te souhaite tous le bonheur du monde et de mener une vie paisible avec ton fiancé Zaid.

A MA GRAND MERE HABIBA JETTI,

Vous êtes l'ainée de notre famille, Merci de nous avoir fourni ta tendresse, ta chaleur et ton sincère amour,

Dieu seul sait que ta place est très spéciale dans mon cœur.

Qu'Allah vous garde pour nous, et vous accorde une longue vie avec une bonne santé.

A Mon FRERE OUADIE TOUIJER

Que Dieu te garde et t'aide à réaliser tes rêves,

Et qu'il te guide dans le bon chemin

Je t'aime tant,

QU'ALLAH vous protège.





A MES ONCLES et MES TANTES paternelles et maternelles

Merci à Dieu de m'avoir donné une famille merveilleuse,

Malgré la distance entre nous, vous étiez toujours présent dans les moments difficiles, merci d'avoir prié pour moi et d'être des membres de la famille Touijer et Belkhou,

Je vous adore, Qu'Allah vous surveille, vous protège et pardonne vos péchés

A MES COUSINS et COUSINES:

On a partagé des bons et des mauvais moments ensemble, il y en a certain avec qui j'étais très proche et d'autre non, mais cela n'a jamais été important car l'essentiel c'est qu'on est une seule famille,

Je remercie Dieu de tout mon cœur de vous avoir dans ma vie

Qu'Allah vous garde et vous montre le bon chemin.





*A MES NEVEUX ET MES NIECES: REDA, ADAM, AMIR, MERJEM,
NIHAD,*

*Vous êtes les petits adorables de notre famille,
J'espère qu'un jour vous pourriez suivre le même chemin et devenir des médecins
et que vous lisez ma thèse et ce dédicaces que j'ai écrit pour vous avec toute mon
affection*

*Mes petits, je vous adore et je vous aime beaucoup
Que Dieu, vous accorde la paix dans votre vie*





*À MES AMIES : DR LABIBA SBIKI, DR FADOUA RHAIB, DR SALMA
BOUCHAMA, DR SALIMA SERROUKH, DR NOUREL HOUDA
SEGHROUCHNI, DR SALMA SBIAA, DR SOUHAILA LOUGHZAIL,
SAFAE NYAZI, AFAT TRICHA, SARA JALDI,*

Et toutes celles que j'ai oublié de mentionner,

Ces mots ne seront pas suffisants pour exprimer mes sentiments vers vous,

*Parmi vous, elle y en a certaine avec qui j'ai étudié la médecine, donc on a ri et
pleuré ensemble surtout en préparant les examens, mais elle y en a d'autre avec
qui j'ai partagé la vie, sa beauté et sa dureté,*

*Je remercie Dieu de nous avoir réunis un jour, d'avoir partagé nos connaissances,
et d'être l'une à côté de l'autre dans les meilleurs et les pires moments.*

Qu'Allah vous donne le pouvoir de réaliser vos rêves et vos projets.





A mon cher ami Dr SIMOHAMED MOUMNI

*Dieu m'a donné une chance de vous connaître, de vous avoir à mes côtés dans
beaucoup de moments,*

Merci pour ce que vous avez fait pour moi, et pour votre soutien et votre aide

Qu'Allah vous garde et protège votre petit.

A MES AMIS : DRACHRAF BENABDELLAH, ZAID ET SAAD JALDI

*Pour moi vous n'êtes pas seulement des amis, mais vous êtes mes frères et des
personnes que j'ai toujours trouvées à mes côtés dans mes moments difficiles*

Les mots ne seront jamais suffisants pour exprimer mon affection

Que Dieu vous protège.





Finally, I dedicate this thesis

To all people who participated in its realization

To all my professors and to all those who shared their knowledge and wisdom

To all the readers who will one day read this thesis,

*To all who are sick, that God will heal you and make you forget your
sorrows*

And to all people that I forgot to mention





Remerciements



À notre Maître et Président de jury

Monsieur le Professeur MIMOUN ZOUHDI

*Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Rabat et Chef de service de Microbiologie au CHU Ibn SINA de
Rabat.*

*Nous avons l'honneur de vous avoir comme président de jury de ce travail, Merci
de l'avoir accepter*

Merci de trouver dans cette thèse, ma gratitude la plus sincère





À notre Maître et rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur YASSINE SEKHSOKH

*Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Rabat*

*Merci d'être présent à chaque instant durant la réalisation de ce travail que vous
m'avez confié,*

*Merci pour votre accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité votre aide,
pour votre disponibilité et vos encouragements*

Veillez croire, à ma vive reconnaissance.





A notre Maître et juge de thèse

Monsieur le Professeur AHMED GAOUZI

*Professeur de Pédiatrie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de
Rabat*

Je vous remercie d'avoir accepté d'être parmi les jurys de cette thèse

*J'ai été toujours très touché par votre attention, votre amabilité et votre
chaleureux accueil,*

Que ce travail soit l'expression de ma gratitude vers vous et mon cordial respect





A notre Maître et juge de thèse

Madame MARIAMA CHADLI

*Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Rabat*

Votre présence parmi les jurys de cette thèse nous honore

*Par ce remerciement, je vous exprime mon admiration pour vos compétences et la
qualité de vos cours.*





A notre Maître et juge de thèse

Madame SAIDA TELLAL

Professeur de biochimie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de

Rabat

*Un grand honneur pour moi que vous soyez parmi les membres de jury de ma
thèse*

Par ce travail, je vous exprime ma profonde reconnaissance et ma grande estime





Liste des abréviations

ABREVIATIONS

3'OH	Extrémité libre d'un oligonucléotide
A	Adénine
ADNc	ADN complémentaire
ADNct	ADN libre circulant
ARG	Gènes de résistance aux antibiotiques
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATB	Antibiotique
BAL	Lavage bronchoalvéolaire
BET	Bromure d'éthidium
BMR	Bactéries multirésistantes aux antibiotiques
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
C	Cytosine
COVID-19	Maladie à coronavirus 2019
CRISPR-Cas9	Courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées
CRP	Protéine C réactive
CUSL	cliniques universitaires Saint-Luc
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
DGGE et TGGE	Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DPNI	Diagnostic prénatal non invasif
dTTP	Thymidine triphosphate
E	Enveloppe
EDTA	Acide Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
FiO2	Fraction inspirée en oxygène
FISH	Hybridation fluorescente in situ
G	Guanine
HapMap	Map of Human Genetic Variation
HCQ	Hydroxychloroquine

IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-10	Interleukine 10
IL6	Interleukine 6
ITS	Espaceur transcrit interne
ITS	Séquençage transcrits internes
LCR	Liquide céphalorachidien
M	Membrane
MLST	Multilocus sequence typing
mNGS	Séquençage métagénomique de nouvelle génération
N	Nucléocapside
NGS	Séquençage de nouvelle génération
OMS	Organisation mondiale de la santé
P32	Phosphorus-32
Pb	Paires de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFGE	Electrophorèse à champ pulsé
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PPi	Pyrophosphate
RAPD	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe
Rep-PCR	Repetitive sequence based polymerase chain reaction
RNAse	Ribonucléase
RT-PCR	La réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel
S	Spike
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
Sars-cov2	Nom officiel du nouveau coronavirus identifié le 9 janvier 2020
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aigu
SDS	Sodium dodécyl sulfate
T	Thymine
taq	ADN polymérase thermostable
TDM	Tomodensitométrie
TIGR	The Institute for Genomic Research
T-RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux
UCSC	Université de Californie à Santa Cruz
UMCG	Centre médical universitaire de Groningen
USI	Unité de soins intensifs
UV	Ultraviolet



Liste des illustrations

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison des méthodes de test pour le diagnostic des maladies infectieuses 59

Tableau II : Liste des bactéries résistantes aux antibiotiques faite selon l'OMS en 2017 77

Liste des figures

Figure 1 : Le génome..... 5

Figure 2 : Chronologie de la génomique humaine 12

Figure 3 : Chronologie de la métagénomique montrant les progrès des études sur les communautés... microbiennes de Leeuwenhoek à NGS..... 17

Figure 4 : Représentation des deux premiers cycles d'une PCR..... 32

Figure 5 : Etat comparatif de la symptomatologie clinique de l'infection par Coronavirus au début et au cours de la maladie 47

Figure 6: Protocole du Maroc dans la prise en charge des cas déclaré positifs 50

Figure 7 : La structure du sars-cov2 [..... 52



Sommaire

<i>Introduction.....</i>	1
.....	4
<i>Génomique</i>	4
1. Définition du génome :.....	5
2. Définition de la génomique :	6
3. Historique de la génomique :	6
4. Génomique fonctionnelle :.....	12
5. Génomique structurale :.....	13
.....	14
<i>Métagénomique.....</i>	14
1. Définition :	15
2. Historique :	15
3. Révolution de la métagénomique :	19
<i>Principales techniques d'analyse des anomalies génomique : Techniques d'analyse des acides nucléiques : les outils de base.....</i>	22
1. Extraction des acides nucléiques :	23
2. Enzymes de restriction :	25
3. Polymérases :	25
3.1. ADN polymérases ADN dépendantes :	25
3.2. ADN polymérases ARN dépendantes : transcriptases inverses :.....	26
4. Électrophorèse :.....	26
5. Southern blot :	27
6. Northern blot :	29
7. PCR, RT-PCR :	29
9. Séquençage par méthode de Sanger :.....	33
10. Pyroséquençage :	34
<i>Séquençage de nouvelle génération.....</i>	37
1. Introduction :	38
2. Principales étapes du processus de séquençage de nouvelle génération :	39
3. Principales étapes d'analyse associées au séquençage de nouvelle génération :.....	40

4. Principales stratégies et applications du séquençage de nouvelle génération :	42
5. Conclusion :	43
<i>Application clinique et importance médicale de la génomique et Métagénomique dans les infections virales : infection par le virus SARS-Cov-2</i>	
1. Introduction :	45
2. Modes de transmission :	45
2.1. Transmission par gouttelettes :	45
2.2. Transmission aérienne :	46
2.3. Transmission par des surfaces infectées :	46
2.4. Autres modes de transmission :	46
3. Présentation clinique :	47
4. Méthodes de diagnostic du COVID-19 :	48
4.1.RT-qPCR :	48
4.2.Imagerie thoracique du COVID-19 :	48
6. L'importance de la supplémentation en minéraux et vitamines face au covid-19 :	50
6.1.Le rôle du zinc dans le protocole du COVID-19 :	50
6.2.Le rôle de la vitamine D dans la protection de l'infection virale :	51
6.3.Le rôle de la Vitamine C dans la réponse immunitaire :	51
6.4.Le rôle des acides gras oméga-3 sur la réponse immunitaire :	51
6.5.Le rôle de la supplémentation nutritionnelle dans le COVID-19 :	52
7. SARS-CoV-2 génomique et métagénomique :	52
8. Conclusion :	54
<i>Application clinique et importance médicale de la génomique et Métagénomique dans les infections bactériennes :</i>	
1. Application du séquençage métagénomique de nouvelle génération au diagnostic clinique des maladies infectieuses :	57
1.1. Introduction :	57
1.2. Avantages du séquençage métagénomique de nouvelle génération pour la détection des agents pathogènes :	58
1.3. Limitations du séquençage métagénomique de nouvelle génération pour la détection des agents pathogènes et solutions potentielles :	61
1.4. Application du séquençage de nouvelle génération en microbiologie clinique et prévention des infections :	64

1.5.	Séquençage de nouvelle génération en microbiologie clinique :	66
1.6.	Utilité clinique du séquençage métagénomique de nouvelle génération :	68
1.6.1.	Infections du système nerveux central :	68
1.6.2.	Infections sanguines :	69
1.6.3.	Infections respiratoires :	69
1.6.4.	Infections gastro-intestinales :	70
1.6.5.	Infections oculaires :	70
	Conclusion :	70
2.	Impact du séquençage métagénomique de nouvelle génération sur la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques :	71
2.1.	Introduction :	71
2.2.	Définition de la résistance bactérienne : plagiat copier-coller d'un texte français :	72
2.3.	Historique de la résistance aux antibiotiques : texte traduit de l'anglais :	72
2.4.	Origine de la résistance aux antibiotiques : traduit à partir d'un texte anglais :	74
2.5.	De la résistance naturelle à la résistance acquise texte français copier-coller :	75
2.6.	Analyse métagénomique d'échantillons environnementaux : texte anglais :	77
2.8.	Conclusion :	80
		81
	<i>Conclusion</i>	81
		84
	<i>Résumés</i>	84
		88
	<i>Bibliographie</i>	88



Introduction

Durant la dernière décade, l'analyse génomique a été transformée suite à la progression du séquençage de nouvelle génération (NGS), ce dernier a permis l'utilisation de nouvelles alternative pour diagnostiquer les maladies infectieuses.

Au cours de ce siècle, les maladies infectieuses ont représenté les principaux défis de la science médicale. Les connaissances sur l'évolution, la transmission et la pathogénicité de ces maladies ont été augmenté suite au développement important de la génomique et la métagénomique et de nombreuses études ont démontré que la sensibilité humaine vis-à-vis des infections est due à la génétique.

De plus, aujourd'hui les connaissances sur l'épidémiologie moléculaire, l'évolution et la virulence des agents pathogènes, et leur résistance aux médicaments aux vaccins et aux antibiotiques ont été développé [1].

Watson et Crick ont publié en 1953 la structure d'ADN, après cela, les travaux scientifiques ont évolué dans la compréhension de l'impact de gènes uniques sur des maladies monogéniques.

Mais, c'est en Avril 2003 que le développement de la génomique a été révolutionné suite à la publication de la séquence du génome humain [2].

Ces approches, ont permis l'identification du rôle de plusieurs gènes clés dans le domaine des maladies infectieuses et cancéreuses.

Cependant, les récents progrès du domaine de NGS ont été la base de la métagénomique, la détection du microbe pathogène responsable dans un échantillon humain clinique ainsi que la détection de nouveaux agents pathogènes représentent ses principaux avantages [3].

Ainsi, l'analyse de microbiome a été révolutionnée par la métagénomique, qui a permis la bonne interprétation de la relation hôte-microbe et le potentiel thérapeutique de la modification du microbiote.

La coopération entre les milieux médicaux et de la recherche, l'industrie et les organismes de réglementation a été imposé par la rapide évolution de la métagénomique pour pouvoir développer des solutions afin d'incorporer la métagénomique dans l'arsenal diagnostique des maladies infectieuses [3].

Donc, cette thèse développerait la génomique, la métagénomique et leurs applications et importance dans :

-  l'infection par le Sars-cov2
-  les infections bactériennes
-  la résistance aux antibiotiques



1. Définition du génome :

La totalité des gènes compris dans les chromosomes représente le génome qui correspond à l'ADN existant dans les cellules.

Les nucléotides adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et la thymine (T) sont les quatre bases azotées qui forme l'ADN, ils sont organisés d'une façon pour établir le code génétique. La découverte de l'enchaînement des nucléotides et la cartographie du génome est effectuée par le séquençage de l'ADN.

La taille du génome varie selon les organismes de quelques milliers à plusieurs millions de paires de bases et jusqu'à présent il existe presque 25 000 génomes chez l'Homme.

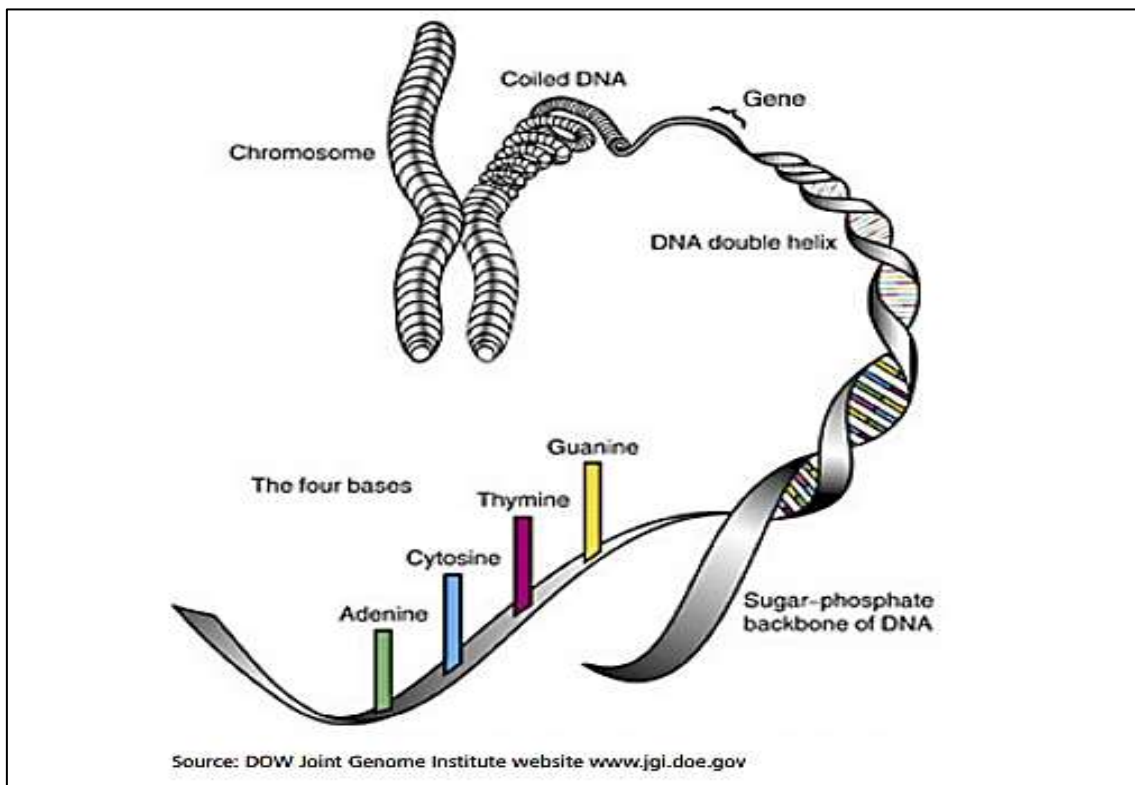


Figure 1 : Le génome [4]

2. Définition de la génomique :

Les applications de la biologie dans les sciences de la vie ont été révolutionnées par la génomique, et c'est le séquençage des génomes de diverses espèces, qui a fait un pas pour comprendre les fonctions biologiques des gènes, en n'oubliant pas le rôle des techniques d'étude du polymorphisme et de l'expression des gènes dans cet avancement [5].

En 1977, Sanger et al ont publié la première séquence d'un génome, c'était celle du bactériophage phiX174, et en 1989, Tom Roderick a annoncé le terme génomique pour toute science étudiant les génomes. Cette science aurait pour objet l'identification des gènes d'un organisme vivant [6].

Durant les 18 années qui suivent, il y a eu le séquençage de beaucoup de génomes de virus, chloroplastes et mitochondries, mais c'est en 1995, que l'équipe américaine du TIGR dirigée par Craig Venter a publié le séquençage du premier génome bactérien de la bactérie *Haemophilus influenza* [7].

3. Historique de la génomique :

- ❖ **1871** : la découverte de l'existence de nucléine et de protéines associées, dans un noyau cellulaire par Friedrich Miescher ;
- ❖ **1904** : La proposition de la théorie de l'hérédité suit à La découverte de la production des chromosomes par paire appariées, une héritée de la mère et l'autre du père par Walter Sutton et Theodor Boveri ;
- ❖ **1910** : La découverte des cinq bases nucléotidiques, l'adénine, la cytosine, la guanine, la thymine et l'uracile par Albrecht Kossel lui

ont permis de recevoir le premier prix Nobel de physiologie à la médecine ;

- ❖ **1950** : L'élaboration du schéma d'appariement des bases A, C, G et T par Erwin Chargaff et sa découverte de l'existence de quantités égales des concentrations de thymine et d'adénine, de cytosine et de guanine. Ce qui a fait la proposition que A s'associe à T et que C s'associe à G ;
- ❖ **1952** : Alfred Hershey et Martha Chase ont effectué des expériences pour montrer que c'est l'ADN qui porte l'information génétique et non pas la protéine ;
- ❖ **1953** : La découverte de la structure en double hélice de l'ADN par James Watson et Francis Crick, grâce à l'aide de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins ;
- ❖ **1961** : Le « code pour la vie » a été déchiffré cette année par Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana et ses collègues, ils ont déterminé la méthode de lecture des lettres d'ADN, cette méthode est la lecture en blocs de trois appelés « codon », ce dernier détermine un acide aminé qui a été ajouter à la protéine durant la synthèse ;
- ❖ **1968** : Les études de Nirenberg et Khorana sur le code génétique et celle de Holley sur le séquençage de la première molécule d'ARNt ont permis à ces chercheurs de partager le prix Nobel de physiologie et de médecine ;
- ❖ **1977** : La technique de séquençage de l'ADN qui a été utilisé pour séquencer le premier génome complet du virus phiX174 a été développée par Frederick Sanger et son équipe.

- ❖ **1980** : Les méthodes innovantes de séquençage de l'ADN ont été la cause du partage du prix Nobel de chimie par Fred Sanger, Wally Gilbert et Paul Berg ;
- ❖ **1983** : James Gusella et son équipe ont localisé le gène responsable de la maladie de Huntington à l'hôpital général Massachussets, USA ;
A la Cetus corporation en Californie aux Etats-Unis, le Dr Kary Mullis a développé la réaction de polymérisation en chaîne PCR qui est une méthode d'amplification d'ADN ;
- ❖ **1985** : La technique de profilage d'ADN a été développée par Alec Jeffreys,
La somme du nombre de séquences répétitives courtes de séquence d'ADN détecté dans 10 régions spécifiques du génome représente le profil d'ADN ;
- ❖ **1990** Le lancement du projet du génome humain, ce projet a pour but de séquencer en 15 ans les 3 milliards de lettres d'un génome humain ;
- ❖ **1992** : La révélation des méthodes qui vont tester les embryons existant encore dans l'utérus pour les maladies génétiques par exemple la fibrose kystique et l'hémophilie par des équipes américaines et britanniques ;
- ❖ **1993** : L'ouverture du centre de Sanger à côté de Cambridge ;
- ❖ **1995** : L'achèvement de la première séquence du génome de la bactérie *Haemophilus influenza* ;
- ❖ **1996** : Le séquençage du génome de la levure, *Saccharomyces cerevisiae* a été complété par une équipe internationale.

La naissance du premier animal cloné Dolly the Sheep au Roslin de l'Université d'Edimbourg ;

❖ **1998** : La publication du génome du ver nématode, *C.elegans* par John Sulston et Bob Waterston ;

❖ **1999** : Le séquençage du premier chromosome humain, le chromosome 22, ceci fait partie du projet de génome humain ;
Le navigateur du génome « Ensemble » a été lancé ;

❖ **2000** : L'achèvement du séquençage complet du génome de l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* ;
Le lancement de l'UCSC Genome browser par l'université de Californie à Santa Cruz ;

❖ **2001** : la première ébauche de la séquence du génome humain a été publié ;

❖ **2002** : l'International Mouse Genome Sequencing Consortium a terminé le projet qui avait pour but de finir le séquençage complet du génome de la souris qui a été le premier mammifère à être séquencer ; son génome est plus petit que le génome humain de 14% mais il le ressemble à plus que 95%.

Le projet international HapMap a été lancé, ce projet a pour but la production d'un catalogue de variations génétiques humaines courantes du génome dans son intégralité ;

❖ **2003** : La confirmation de la possession des humains de 20 000 à 25 000 gènes après l'achèvement du projet du génome humain.
Malgré qu'il reste 2 ans pour la fin du projet, le séquençage du génome humain a été effectué avec une précision de 99.99%.
Le lancement du projet ENCODE par le National Human Genome

Research Institute qui a pour but l'identification et la caractérisation des gènes du génome humain ;

- ❖ **2004** : La publication du projet du génome du rat, ce génome est plus grand que le génome de la souris mais plus petit que celui de l'humain.
- ❖ **2005** : La publication du rapport HapMap (Map of Human Genetic Variation) dans Nature, et l'achèvement du génome du chimpanzé ;
- ❖ **2007** : La production de séquençage d'ADN a connu une hausse de 70 fois en un an suite à l'introduction de la nouvelle méthode de séquençage d'ADN ;
- ❖ **2008** : Le premier projet qui a pour but le séquençage entier des génomes de 2500 personnes a été lancé, son nom est 1000 projets de génomes. Les coûts de séquençage ont connu une baisse suite aux plates-formes de NGS ;
- ❖ **2009** : La publication de l'achèvement du première analyse des génomes du cancer, même celle du cancer du poumon et le mélanome malin ;
- ❖ **2010** : Le lancement de UK10K qui effectue la comparaison des génomes de 4000 personnes en bonne santé et de 6000 personnes ayant des maladies génétiques par Wellcome Trust.
Nature a connu deux publication : la publication de l'article pilote du « 1000 projets de génome » et la publication de génome néandertalien ;
- ❖ **2012** : La description des régions actives du génome humain, ainsi que la confirmation que ce génome contient 20 687 gènes codant pour les protéines a été publié dans 30 articles de recherche par

l'étude ENCODE ;

- ❖ **2013** : La décision de ne pas accorder de brevet à l'ADN d'origine naturelle par la cour suprême des Etats-Unis,
L'achèvement du génome du poisson zèbre ;
- ❖ **2014** : 1000 dollars est le nouveau coût du séquençage d'un génome
- ❖ **2015**: Mettre en place et prospecter les conditions de l'accès au diagnostic génétique dans la France, c'est la plan France Médecine génomique pour 2025 qui a été adressé à l'Alliance Aviesan ;
- ❖ **2018**: 100 000 génomes de patients ayants des maladies rares ou le cancer ont été séquencé, c'est ce qui a achevé le projet 100K génomes ;
- ❖ **2020** Le séquençage du génome du virus Sars-Cov-19 à cause de l'apparition de la pandémie de Covid-19 [8].

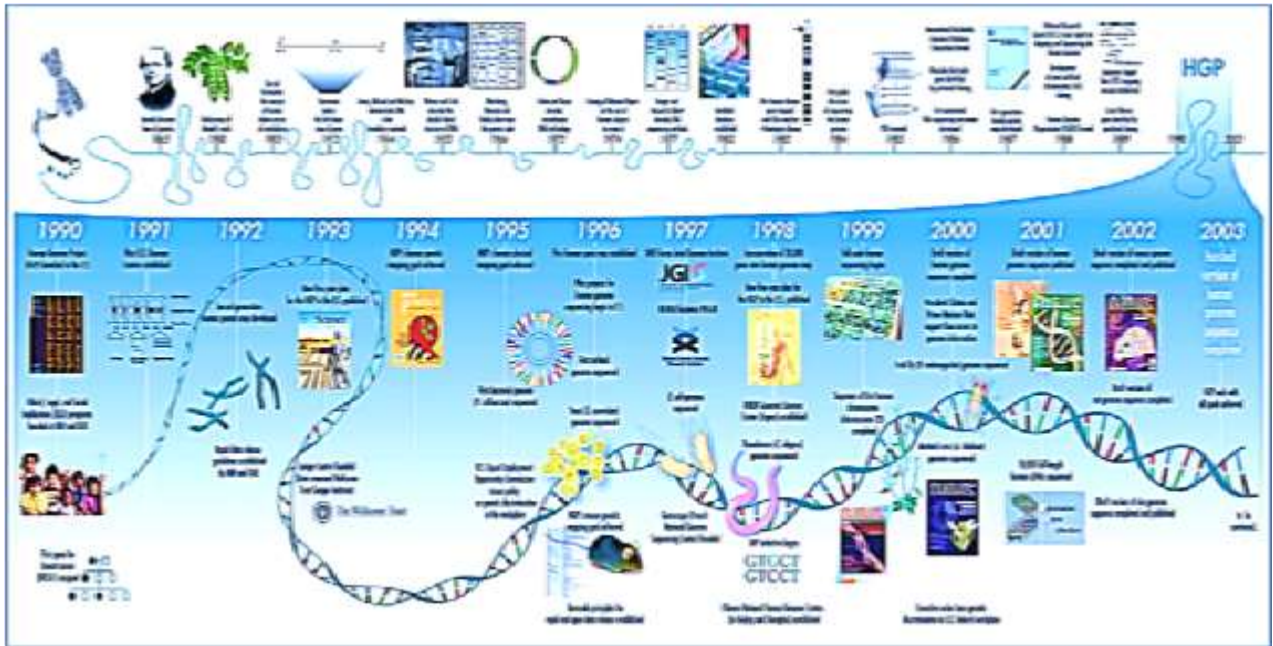


Figure 2 : Chronologie de la génomique humaine [9]

4. Génomique fonctionnelle :

La génomique fonctionnelle se définit par la totalité des techniques nécessaires pour étudier un grand nombre de gènes simultanément, ce qui entraîne une économie d'échelle ; le plus important pour ces techniques est d'étudier le tous et non pas la somme des parties. La transcription des gènes peut se faire en variantes manières en codant un nombre important de différentes protéines.

Des modèles quantitatifs de cellules et d'organismes ont été développés par les études sur la génomique fonctionnelle, médicalement parlant, l'identification de nouvelles cibles plus les médicaments va devenir facile grâce à cette discipline.

Les recherches sur la génomique fonctionnelle ont pour but la compréhension de la fonction de tous les gènes. Mais ce but représente seulement une première étape vers les objectifs visés par les biologistes.

La dernière décade a connu des progrès dans la génétique par l'achèvement de la localisation et l'identification des gènes individuelle, et la détermination des fonctions biologique de ces gènes une par une.

Il existe deux principales applications de la génomique fonctionnelle :

- ✚ Les modèles quantitatifs de cellules et organismes qui vont donner à la biologie des capacités prédictives et qui ont caractérisé la chimie et la physique vont être développé ;
- ✚ Sélectionner, parmi l'ensemble impressionnant de gènes et de voies biochimiques, ce qui peut servir comme cibles a des antibiotiques et des médicaments contre les principales maladies humaines.

5. Génomique structurale :

La structure des gènes et des autres parties du génome est analysé par la génomique structurale, cette dernière aide à annoter les génomes et à identifier les séquences informatives qui sont les séquences régulatrices et répétées, les éléments transposables et les gènes avec ou sans introns qui code des protéines ou des ARN fonctionnels.



1. Définition :

L'analyse de l'ADN génomique de l'intégralité d'une communauté microbienne s'effectue par la métagénomique. Elle se base sur l'isolement direct de l'ensemble des acides nucléiques qui sont dans un échantillon extrait d'un environnement donné sans isolement ou culture de microorganismes [10,11]

La métagénomique est composée du préfixe « méta » qui est un mot grec qui signifie « au-delà », il représente la discipline de l'ADN génomique dérivé d'un seul microorganisme ou d'une cellule unique [12].

2. Historique :

L'étude de la communauté microbienne a connu la passation du premier rapport de microbe réalisé par Leeuwenhoek et leurs organismes oraux en 1676, à la caractérisation par les nouvelles technique moléculaire.

Suivant la méthode de Robert Koch, des chercheurs pionniers ont essayé d'isoler les organismes invisible en commençant par l'utilisation des nutriments en phase solide par exemple les tranches de pomme de terre ou de la gélatine pour pouvoir compter et visualiser les micro-organismes après les avoir cultiver et isoler. Ces méthodes d'isolement ont été la cause de la compréhension de la physiologie des micro-organismes.

L'étude des micro-organismes et ces interactions été effectué à l'aide d'un important outil qui est le microscope.

La nette amélioration de la résolution des techniques de microscopie été grâce au techniques de coloration pratiques telles que Gram, Ziehl-Neelson et Schaeffer et Fulton.

Le nombre de micro-organismes obtenus dans les plaques de culture ne correspondait pas au nombre de micro-organismes observés au microscope, cela été un élément clair pour le microbiologiste.

C'est pour cela que les chercheurs ont conclu que les micro-organismes ont besoin de conditions typiques pour leur développement malgré que l'explication de la précédente observation ne fût pas évidente, donc des environnements de production de milieux de culture qui ressemble à des conditions de croissance indigènes ont été émulsés par Winogradsky.

L'Ecologie microbienne est un concept qui est né suite à la révolution de la microbiologie grâce aux idées de Winogradsky et sa contribution en écologie, ce concept consiste à l'étude des micro-organismes et à leurs rôles environnementaux [13].

Les caractéristiques morphologiques, l'augmentation et le tri de quelques profils biochimiques ont été la base de l'étude des micro-organismes. Ces méthodes ont effectué un extrait du monde microbien, malgré cela, elles sont limitées dans la résolution pour d'autres applications.

Les marqueurs moléculaires pour la classification de la vie ont été effectués par de gènes d'ARN ribosomique, ceci était la proposition de Carl Woese à la fin de 1970.

L'étude et la classification des micro-organismes révolutionnés suite à la méthode de séquençage automatisé Sanger a été combinée à la proposition précédente.

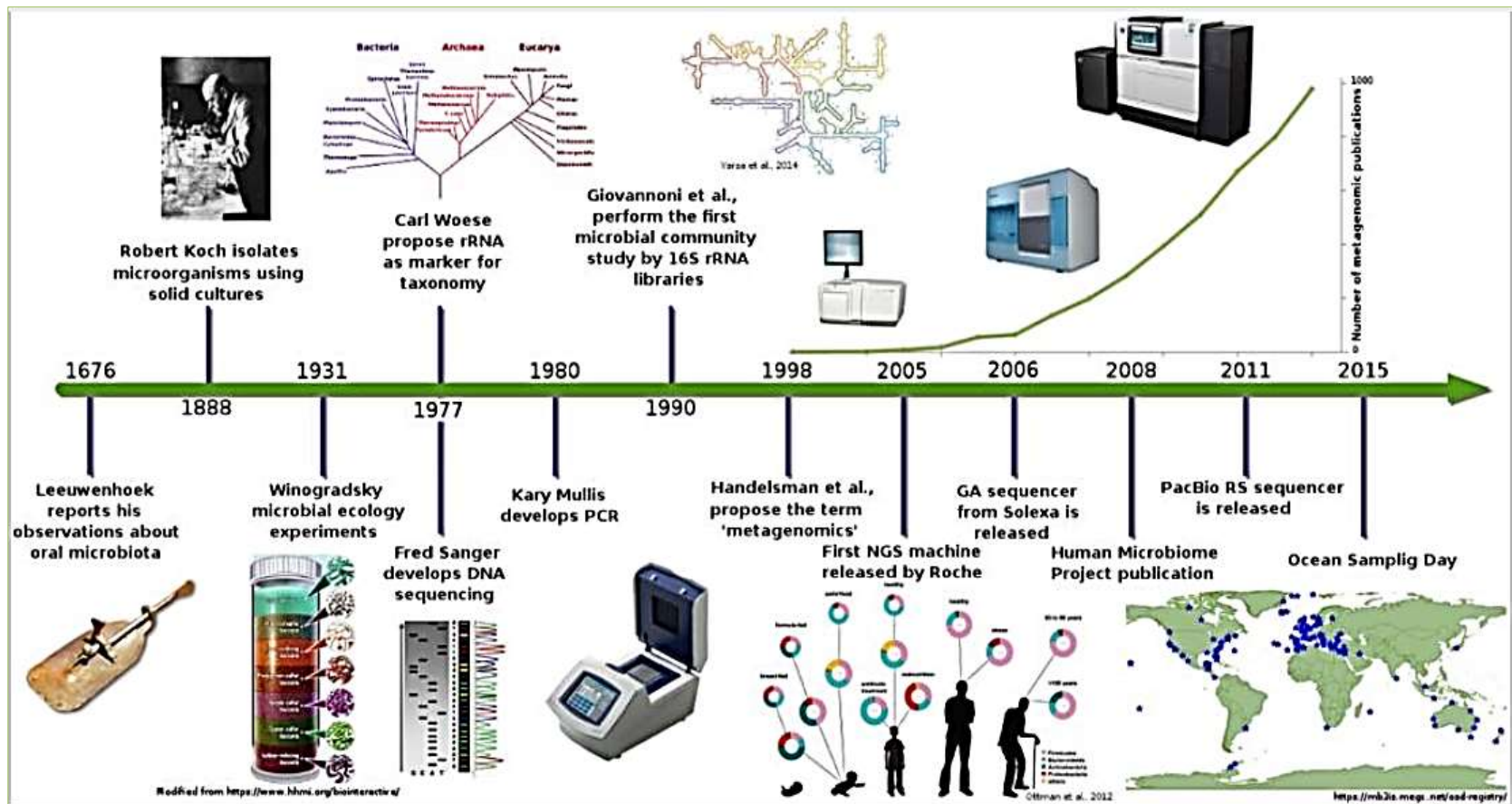


Figure 3 : Chronologie de la métagénomique montrant les progrès des études sur les communautés microbiennes de Leeuwenhoek à NGS [13]

Après plusieurs années, la description de la diversité microbienne a été l'application des progrès des méthodes moléculaires, grâce à ces progrès il a eu accès à un nouveau monde non cultivé de communautés microbiennes.

La réaction en chaîne par polymérase (PCR), le clonage et le séquençage des gènes d'ARNr, l'hybridation fluorescente in situ (FISH), l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGCE), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction et le polymorphisme terminal de longueur des fragments de restriction, ont été les méthodes impacté significativement.

Pourtant, avec toutes ces améliorations, les microbiologistes n'ont pas pu répondre à un grand nombre d'observations en microbiologie, par exemple les observations de la fonction métabolique et écologique des micro-organismes.

L'association du produit hétérologue à une fonction métabolique tel que les nitrogénases, les cellulases, les oxydoréductases, les lactases... d'un clonage de gènes par l'ADN total d'un certain habitat a rendu possible la caractérisation de certaines fonctions dans un environnement particulier.

L'utilisation d'autres micro-organismes en tant que systèmes pour tester la fonction et les rôles des gènes dans la communauté microbienne a développé les méthodes d'expression génique qui sont impliqué dans la possibilité de la caractérisation.

Alors, la biotechnologie a vu le jour, par l'ouverture d'une fenêtre d'opportunité qui a permis la découverte de nouveaux gènes, fonctions et produits métaboliques qui ont une application technologique.

ET après, l'apparition d'une nouvelle discipline appelé l'analyse métagénomique qui est basé sur des produits comme les terragines de

Streptomyces lividians ou des gènes liés à des antibiotiques à large spectre qui ont été clonés par les bibliothèques d'ADN du sol.

Cette analyse métagénomique signifiait la collecte théorique de tous les génomes de membres d'une communauté microbienne dans un environnement spécifique [14]

3. Révolution de la métagénomique :

La métagénomique a révolutionné la recherche actuelle dans le monde des sciences biomédicales et de l'industrie. La fin du XXe et le début du siècle suivant ont connu une ascension énorme surtout avec la découverte de nouveaux microbes et différents produits microbiens ce qui a contourné les méthodes de cultures. C'est grâce à la métagénomique que les biologistes ont découvert les enzymes et les antibiotiques d'origine microbienne, leurs bénéfices sont évidents jusqu'à ce jour [15].

Elle représente une analyse génomique indépendante des cultures des communautés microbiennes [16], Métagénome était le terme utilisé par Rondon et al pour nommer le génome composé de l'ensemble du microbiote dans le sol [17].

Des nouvelles perspectives sur le catalogage des gènes et la compréhension de l'écologie microbienne, ont été créés, grâce au criblage de bibliothèque métagénomique, en donnant accès à la grande diversité microbienne et au vaste pool de gènes en étudiant leurs importances dans différents processus métaboliques et dans la défense immunitaire et en surmontant les difficultés de la culture [18].

Les chercheurs de nouvelles informations sur la diversité microbienne qui

développent leur compréhension des processus vitaux de la vie, ont été encouragés par la métagénomique.

Les applications de la métagénomique ont été bénéfiques pour découvrir des microbes de différentes niches de la biosphère, La compréhension des étiologies des maladies infectieuses et aussi l'origine des souches épidémiques.

L'impressionnante découverte des applications de la métagénomique été la découverte du virome humain, même s'il existe un nombre important de virus nécessaire pour la santé et la maladie, beaucoup d'entre eux n'ont jamais été cultivé en laboratoire. Le crAssphage qui est un virus associé à l'homme représente un exemple important vis-à-vis de cette découverte [19].

Le profil métagénomique ciblé de 39 bières en bouteilles de 5 pays basé sur le séquençage transcrits internes (ITS) d'espèces fongiques a été présenté aux citoyens par le laboratoire communautaire de Hackuarium qui est une organisation à but non lucratif. Les brasseries commerciales contiennent différents espèce de levures sauvages selon une analyse préliminaire. L'accouplement de procédures de laboratoire simples avec les techniques de séquençage de pointe et la métagénomique ciblée, permet le dépistage et la reconnaissance de tous les microbes présenté dans les bouteilles de bières [20].

La distinction du microbiome intestinal parmi des groupes ethniques s'est effectuée par la métagénomique [21].

L'identification des entérotypes parmi trois populations distincts formées par 48 Han chinois, 48 Kazaks et 96 Ouïghours, est une récente application de la technologie basée sur le gène d'ARN 16s, le métagénome du microbiote intestinal et d'une association à l'échelle des génomes hôte. Le résultat de cette

application est que le microbiote intestinal de ces 192 sujets est classé en deux entérotypes différents à savoir Bacteroides et Prevotella, ce qui a clarifié la base génétique du microbiome, donc l'outil de l'établissement du lien entre le microbiome et le cancer était la métagénomique. [22].

En conclusion, la métagénomique a révolutionné le monde scientifique en contribuant et en fournissant des informations et des solutions précieuses pour aider à l'achèvement de l'étiologie complexe des maladies, et à la recherche de nouveaux biomarqueurs en vue de l'amélioration du pronostic et du diagnostic des maladies mortelles.

*Principales techniques d'analyse
des anomalies génomique :
Techniques d'analyse des acides nucléiques :
les outils de base*

1. Extraction des acides nucléiques :

L'extraction des acides nucléiques a été réalisé par plusieurs méthodes selon le type cellulaire utilisé par exemple : la cellule eucaryote; la bactérie; le virus; etc, l'organe de départ, le résultat anticiper et les moyens considéré (PCR, RT-PCR, Southern Blot, CGH-array...etc.).

L'ensembles des tissus congelé ou frais ; le prélèvement de placenta ; les cheveux ; le prélèvement buccales ; la cellule en culture sont la base pour étudier l'ADN qui est tiré des leucocytes circulants obtenu sur anticoagulant EDTA si possible.

Les cellules en culture des nouveaux tissus isolé ou congelé à -80°C ou dans l'azote liquide sont l'origine de l'ARN recueilli. Afin d'inhiber les actions de RNase enzymes ubiquitaire difficiles à inactiver, il est primordiale d'avoir les précautions nécessaires qui sont la vaisselle propre stérile ou le matériel commercialisé RNase free et l'utilisation des gants et de la glace.

Les acides nucléiques peuvent être extrait par plusieurs techniques : l'extraction saline, les colonnes d'affinité composée de silice ; et le lysat leucocytaire. L'absence de protéines de lipides et d'autres constituants cellulaires qui interviennent avec les enzymes de restriction de ligases ou les ADN polymérases améliore la qualité de l'extraction.

Le phénol/chloroforme est la méthode basique de l'extraction des acides nucléiques. La présence d'un détergent comme le dodécylsulfate de sodium (SDS, pour sodium dodécyl sulfate) lyse les cellules. Afin de pouvoir extraire l'ADN une déprotéinisation est réalisée par les biologistes en utilisant la protéinase K dans le tampon de lyse qui est active si le SDS existant, fonctionne

à température élevée entre 56°C et 65°C.

Grâce à ces conditions dénaturantes, d'une part la protéinase K digère bien les protéines, d'autre part, l'inactivation des nucléases endogènes est due à la combinaison de la protéinase K détergeant à une température élevée.

Afin de pouvoir extraire l'ARN, les chercheurs utilisent les sels chaotropiques qui sont l'isothiocyanate de guanidinium trifluoroacétate de guanidinium urée inhibiteurs de RNase et qui sont irremplaçables

Dans la phase aqueuse, l'extraction de l'ADN ou de l'ARN s'effectue par le phénol et le chloroforme, elle permet la purification des acides nucléiques et la récupération de la phase organique en fonction de PH. Après, la précipitation des acides nucléiques s'effectue en présence d'alcool qui est à la suite repris dans l'eau stérile.

4°C est la température idéale de la conservation de l'ADN purifié. Afin de ne pas le dégrader, il faut éviter les successions de congélations-décongélations. Pourtant -8°C est la température de conservation de l'ARN, qui peut être stocké longtemps en additionnant l'inhibiteur de RNase.

La spectrophotométrie à 260nm effectue le dosage de la solution homogène d'acides nucléiques. La mesure de l'absorbance à 280 nm assure significativement par les protéines l'absence de contamination. Le rapport des absorbances A260/A280 qui est un ratio de 1.6 à 1.8 pour l'ADN et 1.8 à 2 pour l'ARN et qui représente une contamination protéique minimale estime la pureté de la solution.

L'électrophorèse en gel d'agarose aide à l'estimation de la qualité de l'extraction des acides nucléiques. L'observation de la bande de haut poids moléculaire pour

l'ADN s'effectue après la coloration par le bromure d'éthidium (BET). La présence d'ARNr 28S et 18S sont les deux bandes observées pour l'ARN [23].

2. Enzymes de restriction :

Les endonucléases de restriction d'origine bactérienne représentent les enzymes de restriction qui coupent l'ADN double brin en clivant les deux fonctions phosphodiester au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques, et qui correspondent à des palindromes, lorsque la séquence se lit dans le sens 5'→3', elle est la même sur les deux brins.

Deux types de coupure sont générés par les enzymes de restriction :

- Blunt end : ce sont des coupures à bouts francs dans lesquelles l'enzyme coupe au même niveau sur les deux brins d'ADN ;
- Cohésive ends : ce sont des coupures à bouts collants dans lesquelles l'enzyme coupe d'une manière décalée l'un par rapport à l'autre sur les deux brins.

Les méthylations constatées au niveau de certaines cytosines précédant une guanine qui empêche la coupure par l'enzyme de restriction et représente une sensibilité vers eux [23].

3. Polymérases :

Les enzymes responsables de la polymérisation des nucléotides au cours de la réplication de l'ADN sont des ADN polymérases.

3.1. ADN polymérases ADN dépendantes :

La formation d'une chaîne d'ADN est catalysée par ces enzymes en utilisant la matrice d'ADN monobrin et l'extrémité 3'OH libre d'un oligonucléotide avec l'existence de magnésium (Mg^{2+}) et de dNTP (désoxyribonucléotides

triphosphates : dATP, dGTP, dCTP et dTTP).

Trois types de réactions enzymatiques peuvent être catalysés par l'ADN polymérase :

- Activité ADN polymérase : cette activité a besoin d'une matrice ADN copiée par extension d'une amorce qui contient une extrémité 3'OH libre ;
- Activité exonucléase 3' → 5' de relecture : elle élimine la totalité de base introduite par erreur dans le brin d'ADN lors de synthèse ;
- Activité exonucléase 5' → 3' : elle élimine les nucléotides fragments accouplés dans le sens 5' → 3' c'est-à-dire l'accouplement en cours de la polymérisation.

3.2. ADN polymérases ARN dépendantes : transcriptases inverses :

Le gène Pol de différents rétrovirus est le code des transcriptases inverse qui permettent de synthétiser l'ADNc qui est l'ADN complémentaire avec la matrice élaboré d'ARNm.

En suivant l'exemple de toutes les polymérases, le fonctionnement d'une transcriptase inverse fonctionne dans le sens 5' → 3' en utilisant l'extrémité OH libre d'une amorce sur laquelle une désoxyribonucléotide par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester est fixé [23].

4. Électrophorèse :

Les macromolécules polyanioniques chargées représentent les acides nucléiques qui peuvent migrer dans un champ électrique. Conformément aux poids des fragments d'ADN ou les molécules d'ARN ; dépendant du nombre ou paires de

bases avec des degrés de résolution variable selon la nature et la densité de réticulation du gel utilisé ; ils peuvent se séparer par l'électrophorèse. Les gels utilisés dont la concentration est différente selon la taille du produit qui serait examiné sont :

- Les gels d'agarose : utilisé pour la séparation des fragments d'acides nucléiques d'une taille de presque 20kb, suite à l'utilisation d'une concentration comprises entre 0.6% et 2% ;
- Les gels de polyacrylamide : utilisé pour la séparation des petits fragments d'ADN d'une à plusieurs centaines de paires de bases (Pb).

La visualisation des acides nucléiques se fait par addition de l'agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET) molécule naturellement non fluorescente, cette molécule qui est intercalé entre les bases de l'acide nucléique existant après illumination à 300nm (UV) une fluorescence orange, est intégré au gel de migration avant ou après migration et qu'on peut avoir sa photographie.

Le logarithme du nombre de paires de bases du fragment inverse proportionnellement la migration des acides nucléiques c'est-à-dire que plus le fragment migre rapidement plus il est petit. Ses importantes applications sont : la séparation des petits fragments d'ADN ou de produit d'amplification par la PCR, le séquençage par gels dénaturants et la purification d'oligonucléotide de synthèse [23].

5. Southern blot :

Dans l'année 1975, Edwin Southern a décrit le Southern blot qui est l'une des essentielles méthodes de la biologie moléculaire. Cette méthode, permet l'étude d'un fragment d'ADN particulier au milieu du génome après le

transfert des fragments d'ADN d'un gel d'électrophorèse sur une membrane. Les fragments d'ADN par la suite sont immobilisés et peuvent être étudiés

Au départ, plusieurs enzymes de restriction ont avalé l'ADN génomique double brin de haut poids moléculaire. C'est alors que l'électrophorèse a séparé les fragments de taille distincte. La présence de beaucoup de fragments, et en ajoutant le bromure d'éthidium au gel pour le voir sous les UV ont donné un aspect de frottis qui permet l'assurance d'une bonne digestion de l'ADN.

Un traitement alcalin était nécessaire pour le gel d'agarose afin de dénaturer les fragments d'ADN double brin en ADN simple brin.

Le phénomène de capillarité sur un support solide qui est la membrane de nitrocellulose ou de nylon était la cause du déplacement (blotting) de l'ADN. Cette membrane été traité premièrement par la préhybridation pour saturer les sites de fixation non spécifique de la sonde sur la membrane.

La séquence complémentaire s'additionne et s'hybride de façon particulière à la sonde marquée (radioactive ou froide), lors de l'étape d'hybridation. Afin d'enlever les fixations non spécifiques de la sonde, ils doivent être obligatoirement lavées par des solutions plus ou moins stringentes pour affaiblir les séquences appariées sachant qu'une solution est peu stringentes lorsqu'elle est riche en sels, et stringentes dans le cas contraire.

Ensuite, le type de marqueur de sonde utilisé à savoir l'autoradiographie ou la chimiluminescence aide à révéler le signal.

La séquence nucléotidique homologue à une séquence (ADN) représente la sonde qui s'hybride d'une manière stable et spécifique par ré-adjonction entre les bases complémentaires.

Pour que le fragment d'ADN génomique (ou d'ARN) correspondant puisse se visualiser, la sonde a été antérieurement marquée. Il y a des sondes radioactives marquée la plus part du temps avec isotope radioactif P32 ou froides (système avidine-biotine, digoxigénine marqué par un fluorophore ou couplée à une révélation chimioluminescente).

Les remaniements de l'ADN (délétions, insertions de plus de 150-330PB, inversions) sont mis en évidence par la technique semi-quantitative qui effectue aussi les cartographies de restriction [23].

6. Northern blot :

La dérivée du Southern blot est le Northern blot représente une technique de biologie moléculaire qui s'adapte à l'analyse d'un ARN spécifique au sein des ARN totaux

L'électrophorèse en un gel d'agarose dénaturant suivi d'une migration sur une membrane inactive bifurque les ARN totaux. Cette électrophorèse est effectué dans un milieu dénaturant (formaldéhyde) pour expulser les liaisons hydrogène éventuelles entre molécules ou dans les molécules d'ARN.

Dans le cas de transcrits multiples, la révélation d'une ou plusieurs bandes après autoradiographie s'effectue en utilisant une sonde moléculaire spécifique complémentaire de l'ARN recherché. Cette méthode semi quantitative a permis de clarifier la diminution ou l'absence d'un ARNm, de définir la taille normale ou anormale ou d'identifier les transcrits alternatifs [23].

7. PCR, RT-PCR :

Parmi les démarches les plus utilisées pour détecter et quantifier l'ARNm est la réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps

réel (RT-PCR) grâce à sa haute sensibilité, reproductibilité et large plage dynamique.

Le « gold standard » pour étudier l'expression génique pour plusieurs biologistes est la RT-PCR qui valide les résultats d'expériences de puces à ADN, qui peut aussi quantifier avec deux manières :

- Qualifier absolument : elle précise le nombre de copies sur la base de la fabrication d'une courbe standard avec des nombres ou des concentrations de copie connues ;
- Qualifier relativement : en mesurant l'expression des gènes par rapport à un échantillon de calibrateur et l'écrire sous forme d'une différence de n fois par rapport au calibrateur.

Amplifier *in vitro* une petite séquence d'ADN qui existe entre deux oligonucléotides de synthèse (appelés amorces ou primers) en utilisant une ADN polymérase thermostable qui s'appelle la Taq polymérase est la base de la PCR, qui est une méthode importante de biologie moléculaire et qui permet d'obtenir une énorme quantité de matériel nucléaire (amplicons) en utilisant une très petite quantité d'une séquence d'ARN ou d'ADN.

Les amplifications en chaîne sont effectuées par l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) sans la dénaturation de l'enzyme par les hautes températures atteintes dans l'étape de dénaturation. L'augmentation du rendement et la réaction de l'ADN en éliminant les plupart des structures secondaires est due à la température élevée qui réduit à la fin les risques d'arrêt prématuré de l'ADN polymérase.

En précédant la réaction d'amplification, l'amplification des séquences

d'ARN est devenue possible, cette réaction est celle de transcription inverse qui transforme l'ARN en ADNc simple brin qui sera recopié lors du 1^{er} cycle d'amplification.

Après avoir effectué les réactions d'amplification, la vérification de la qualité du produit obtenu est importante et s'élabore facilement par électrophorèse en gel d'acrylamide ou d'agarose et coloration par le bromure d'éthidium [23].

8. PCR en temps réel : application de la PCR à l'analyse quantitative :

Dès son apparition, La méthode la plus utilisée pour détecter l'ADN et l'ARN est devenue la PCR qui attire les analyses quantitatives par sa nature exponentielle. L'amplification et la détection spécifique d'une séquence est possible par une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques.

Le domaine de la quantification des acides nucléiques est bouleversé à cause du développement de la PCR. Exploiter la cinétique de la réaction est la base de la PCR quantitative.

L'apparition des produits d'amplification ; à cause de l'émission d'une quantité de fluorescence proportionnelle à la quantité de cible primordialement existante dans l'échantillon à analyses ; est suivie constamment par un appareil c'est ce qui a réalisé la PCR en temps réel.

Lors de la PCR en temps réel, chaque cycle marque l'émission de fluorescence qui peut dessiner la courbe qui reflète la cinétique de la réaction et identifier le cycle pour lequel elle est supérieure au seuil de détection de l'appareil c'est-à-dire plus grand que le bruit de fond, ce cycle se trouve dans la

phase exponentielle de la PCR en respectant la relation : $N_f = N_0 (1 + e)^n$.

Donc, la rapidité du cycle est nettement dépendante de la quantité de cible existante dans l'échantillon à quantifier. En utilisant les solutions de concentrations connues, il est nécessaire de tracer une droite d'étalonnage et alors, d'évaluer une solution de concentration inconnue.

Malgré que Cette méthode soit élaborée pour la quantification, elle est aussi utilisée pour analyser qualitativement les acides nucléiques à cause de l'exploitation des sondes ou d'amorces caractéristiques de fragments d'ADN sauvages ou mutés [23].

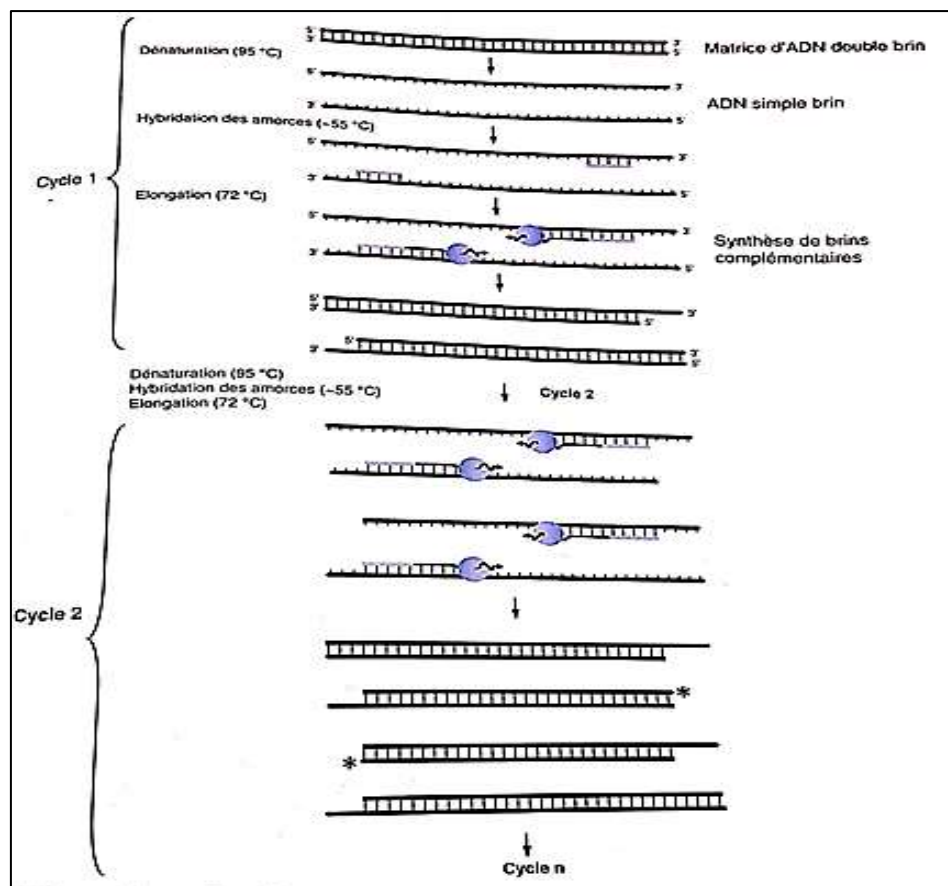


Figure 4 : Représentation des deux premiers cycles d'une PCR [23]

9. Séquençage par méthode de Sanger :

Frederick Sanger en 1977 a rapporté la méthode enzymatique qui a effectué le séquençage de l'ADN qui est un ADN simple brin crée en dénaturant le produit PCR ou en clonant dans un vecteur d'un fragment d'ADN génomique ou d'ADNc.

A l'exclusion du groupement hydroxyle en position C'3 du désoxyribose, l'extrémité 3'OH libre d'un oligonucléotide, de dNTP, de didésoxyribonucléotides (ddNTP) semblables aux dNTP normaux ont été la cause de la réalisation de la synthèse d'un nouveau brin d'ADNc par la Taq polymérase.

La chaîne d'ADN en croissance intègre les ddNTP en établissant une liaison phosphodiester entre leur C5' et le C3' du nucléotide qui est déjà inclus. Un arrêt de la synthèse de la chaîne est emporté par ddNTP incorporé dépourvu d'hydroxyle en C3'.

La concentration de ddNTP qui est clairement mineur par rapport à celle de son analogue normal dNTP aide à la réalisation de la réaction de séquençage, au niveau de l'intégralité des positions qui contiennent la base en question, la terminaison de chaîne survient au hasard.

Après que la réaction aboutit à sa fin, il y a eu une obtention d'une collection de fragments d'ADN de différentes tailles avec une extrémité 5' commune qui est l'oligonucléotide et une extrémité 3' variable se terminant par un ddNTP. La différence de la taille des fragments, même par un seul nucléotide, peut se séparer par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant.

L'utilisation des ddNTP marqués aide à découvrir les fragments de différentes tailles.

Le séquençage par la méthode de Sanger a connu un progrès exceptionnel en développant les méthodes automatisées qui permet le séquençage fluorescent de l'ADN et qui se sert des amorces ou des ddNTP, qui sont couplées à des molécules fluorescentes.

Le séquençage avec une seule réaction est réalisé par le marquage des 4 ddNTP par 4 différents fluorophores. Le marquage en 3' en incorporant le ddNTP fluorescents qui est le dyeterminators représente les fragments d'extension qui sont détachés en utilisant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Durant l'électrophorèse, L'appareil de séquençage semi-automatique génère les données brutes en détectant en temps réel les fragments fluorescents qui sont le résultat de la réaction de séquençage après excitation des fluorophores par un laser bi-chromatique.

Après cela, il a eu la digitalisation des signaux de fluorescence, leurs données brutes vont être enregistré, traité et puis stocké après leurs transmissions dans l'unité informatique. Et puis La visualisation ou l'impression des données de la séquence s'effectue sous forme d'électrophorégramme [24].

10. Pyroséquençage :

La nouvelle technique du séquençage par synthèse est le pyroséquençage qui révèle en temps réel l'activité de l'ADN polymérase (real time sequencing) en ajoutant un seul nucléotide non fluorescent à la fois, ce qui permet l'addition successive des nucléotides.

Le pyrophosphate est délivré en introduisant dans le brin en cours de synthèse un nucléotide correspondant à celui espéré par la polymérase.

La transformation de l'ATP sulfurylase à l'ATP utilisé par une luciférase cause le pyrophosphate. En conséquence, l'oxyluciférine et le signal lumineux analysé par un capteur seront produits, ce dernier serait recomposé sous forme d'un pic sur le pyrogramme. Ce pic aurait une longueur correspondante au nombre de nucléotides introduits. C'est la taille des pics obtenus qui déterminerait la séquence.

L'analyse de la méthylation de l'ADN (position 5' d'une cytosine appartenant à un dinucléotide de type CpG) après être traité par bisulfite de sodium est due particulièrement au pyroséquençage. La transformation des cytosines en uraciles sans changement des cytosines méthylées s'effectue par le bisulfite de sodium. Ces dernières cytosines peuvent se retenir par l'analyse différentielle d'un ADN sans qu'elle soit nécessairement traitée en bisulfite de sodium.

Parmi les nouvelles méthodes de séquençage, on peut citer le pyroséquençage. Le séquençage des acides nucléiques à haut débit peut se faire par le séquençage de type NGS.

Une décennie, était la période nécessaire pour séquencer un génome complet selon la méthode de Sanger. Mais grâce aux machines actuelles qui a un très haut débit, cette longue durée devient quelques jours seulement.

Utiliser des approches massivement parallèles qui permettent le séquençage des centaines de milliers de fragments en même temps est la caractérisation des méthodes de NGS. Le pouvoir d'expliquer, de détecter les variant et d'aligner

les séquences est dû au développement d'outils bio-informatiques [25].

*Séquençage de nouvelle
génération*

1. Introduction :

La séquence d'une ou de plusieurs molécules d'ADN dont la taille est supérieure à un million de bases de paires est déterminée par le séquençage de nouvelle génération NGS, ce dernier est caractérisé par la possibilité d'obtenir de dizaines de milliers à plus d'un milliard de molécules en une seule analyse, cette expérience consiste en la miniaturisation du volume des réactions de séquençage individuelles, ce qui limite la taille des instruments et réduit le coût des réactifs par réaction, en comparant le NGS et le séquençage de troisième génération la miniaturisation de ce dernier, a atteint son extrême en permettant le séquençage d'une seule molécule d'ADN.

L'information de séquence réalisée par la conversion de l'émission de signaux dus aux cycles d'incorporation successifs de nucléotides a été la base de l'énorme génération de données de séquences et c'est ce qui a fondé le NGS. La science a eu recours aux outils bioinformatique pour le traitement et l'interprétation de la grande quantité de données de séquences générées, pour les simplifier analytiquement. Le NGS a accompli l'analyse des listes de gènes c'est-à-dire l'analyse simultanée d'une séquence de centaines de gènes d'intérêt, il a pu même effectuer par l'approche exome l'analyse des séquences de l'intégralité du génome [26].

Durant les années 1970, Allan Maxam et Walter Gilbert des Etats-Unis et Frederick Sanger du Royaume-Uni ont développés les premières méthodes de séquençage qui ont été automatisées par la suite, spécialement la méthode de Sanger qui a augmenté les capacités de séquençage. Ces méthodes qui ont été la base de la résolution de la séquence de molécule d'ADN ont échoué à cause de leurs coûts et de la limitation du débit de quantités de séquences engendrées[27].

2. Principales étapes du processus de séquençage de nouvelle génération :

Les signaux générés par l'incorporation de nucléotides, et qui sont convertis en information de séquence ont des natures différentes, selon les technologies de NGS utilisés. On distingue trois technologies majeures :

- le pyroséquençage de la société roche 454, est fondé au moment de l'incorporation de nucléotides sur l'émission de signaux de photoluminescence
- le séquençage de la société illumina est basé sur la modification de nucléotides par les fluorescent pendant leurs incorporation.
- le séquençage de la société Thermo-Fisher-Ion-Torrent est basé lors de l'insertion de nucléotides, sur la mesure de la différentielle de conductivité et de variation de ph.

Le processus de NGS comporte une succession d'étapes très importantes sont les suivantes :

- 1- La première étape est de fragmenter mécaniquement ou enzymatiquement l'échantillon à séquencer, elle permet d'obtenir des fragments d'ADN de taille conforme aux étapes suivantes ;
- 2- la deuxième étape mélange différents échantillons par l'ajout de courtes séquences nucléotidiques déterminant un code-barres de séquence spécifique pour chacun des échantillons. Ce code sera lu à l'étape de séquençage, et permettra ainsi de remettre les données de séquençage à l'échantillon.
- 3- La troisième étape est l'enrichissement en régions d'intérêt : elle sélectionne les régions cibles à séquencer parmi la totalité des échantillons. Cet enrichissement en régions cibles est permis par

différents méthodes. Ces derniers sont basées sur la capture de séquences par des sondes spécifiques ou sur la technique de PCR par l'utilisation de centaines ou milliers de couples d'amorces qui permettent une amplification sélective et simultanée des séquences d'intérêt.

- 4- La quatrième étape est l'amplification clonale : durant cette étape les fragments d'ADN à séquencer sont amplifiés de manière clonale et isolée, c'est une technique d'amplification clonale en ilots ou clusters sur support solide, ou en microréacteurs faite par des mélanges réactionnels de type micro-micelles répartis dans des micro-puits.
- 5- La dernière étape est basée sur la génération et la détection de signaux consécutifs, d'état variable en fonction de la technologie de séquençage (photoluminescence, fluorescence, variation de PH, etc.) et elle est obtenue par l'incorporation de nucléotides selon le principe de complémentarité, permettant enfin de déterminer la séquence de la région d'intérêt [23,28].

3. Principales étapes d'analyse associées au séquençage de nouvelle génération :

Les principales étapes d'analyse sont les suivantes :

- 1- Etape de détermination de bases : cette étape transforme les signaux engendrés par l'incorporation consécutive de nucléotides, en information de séquence
- 2- Etape de filtration : basé sur l'élimination des lectures de séquence, dont la qualité est inférieure au seuil fixé.
- 3- Etape d'alignement : définit la position des lectures de séquence

engendrées par rapport à la séquence de référence.

- 4- Etape d'analyse de la profondeur de lecture et de la couverture de séquence : la taille de la région d'intérêt à séquencer détermine la profondeur et la couverture de séquençage, l'étape de séquençage et le multiplexage des échantillons définissent la qualité totale des bases. Le nombre de lecture indépendante d'une base définit la profondeur de lecture, Alors que la couverture de séquence est réalisée par le rapport de lectures indépendantes et le nombre total de bases dans la région d'intérêt.
- 5- Etape d'identification : cette étape permet d'identifier les variants de séquence entre les lectures et la séquence de référence, leurs nombre varient en fonction de type d'analyse réalisé dans l'échantillon.
- 6- Etape d'annotation: les données mutationnelles sont interprétées, à travers la compilation d'information des variants identifiées, ces informations sont nombreuses et nécessitent la consultation de base de données. Cette annotation des variants identifiées appliquera ensuite des filtres dont l'objectif est de ne retenir que les variants délétère en lien avec le contexte clinique de l'échantillon analysé [23,29].

4. Principales stratégies et applications du séquençage de nouvelle génération :

Séquencer à l'ordre de 100M de bases, qui est le séquençage à moyen débit ou séquencer à 1000Md de bases, qui est le séquençage à très haut débit est permis par le NGS. Les projets qui nécessitent les hauts débits sont devenus faciles grâce à cette grande capacité de séquençage.

- 1- Analyse du génome dans son intégralité : la capacité de séquençage nécessaire pour le séquençage du génome d'un individu peut être calculée, cette capacité est de 150 GB pour séquencer un génome d'un individu qui a 3 milliard de paires de bases, par exemple presque 7 individus peuvent être séquencés avec un débit de 1000 GB.

La réalisation du séquençage complet du génome est due au non-identification d'une mutation dans les exons des gènes, ou à la localisation des anomalies génomiques dans les introns, ou à la présence des mutations et ou à la suspicion des séquences régulatrices du gène.

- 2- Analyse de l'exome : Le séquençage de l'intégralité du génome est dû au séquençage de tous les exons existant dans le génome. L'exome séquencer représente 30 MB du génome, par exemple l'exome de presque 700 individus est séquencé avec un séquenceur de 1000 GB.

Séquencer l'exome du patient pour chercher des mutations dans les gènes connus ou les nouveaux gènes, a facilité le diagnostic des syndromes polymalformatifs liés aux anomalies de l'embryogenèse.

- 3- Analyse de panels de gènes : L'utilité du NGS est représentée dans les applications de moyen débit. La limitation du séquençage pour un ensemble de gènes intégré dans une pathologie ou plusieurs pathologies

peut être adéquate aux besoins. Un séquenceur à moyen débit permet le séquençage du panel ayant des exons d'une cinquantaine de gènes chez presque 15 patients simultanément.

Le diagnostic et le conseil génétique a progressé grâce à cette analyse simultanée de tous les gènes.

La même analyse concernant des dizaines ou centaines de gènes ciblés peut être conçue dans plusieurs domaines par exemple les domaines des cancers, des maladies neuromusculaires, des surdités ou des rétinites.

- 4- Analyse de transcriptome : L'ensemble des transcrits présent dans un échantillon biologique a été décrit quantitativement et qualitativement par le NGS.

Le DPNI (diagnostic prénatal non invasif) des mutations géniques ou d'aneuploïdies qui est utilisé suite à l'étude de l'ADN libre circulant du fœtus dans le sang maternel représente une autre application du NGS [23,30].

5. Conclusion :

Quelques années ont été suffisantes pour la révolution d'analyse du génome humain par le NGS.

Aujourd'hui, L'implantation du NGS n'est plus limitée sur les domaines de recherche, mais elle est aussi utilisée dans les laboratoires hospitaliers pour des applications diagnostiques.

Prochainement, Le moyen nécessaire ; pour le diagnostic moléculaire en génétique médicale et dans d'autres domaines de médecine ; serait les nouvelles technologies du NGS [23,31].

*Application clinique et importance
médicale de la génomique et
Métagénomique dans les infections
virales : infection par le virus SARS-Cov-2*

1. Introduction :

Décembre 2019, a été marqué par l'apparition d'un nouveau virus SARS-COV-2 en Chine qui était grave et même mortel en particulier chez les personnes ayant des maladies chroniques.

Les symptômes de ce virus sont variables à voir des symptômes légers modérés, sévères ou critiques.

Ce virus a connu plusieurs modes de transmission, principalement la transmission par les gouttelettes respiratoires.

Finalement, pour diagnostiquer le covid-19, on effectue le test PCR sur frottis nasopharyngé ou oropharyngé et dans les cas critiques, on utilise la TDM thoracique [32].

2. Modes de transmission :

Sars-Cov-2 se transmet de plusieurs manières détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

2.1. Transmission par gouttelettes :

Les gouttelettes, les sécrétions respiratoires ou la salive d'une personne; contaminée par le Sars-cov-2; lorsqu'elle tousse, éternue, parle ou chante, constituent un moyen direct de transmission de l'infection, Les gouttelettes respiratoires peuvent atteindre la bouche, le nez ou les yeux d'une personne sensible et entraînent alors l'infection, surtout si le contact est étroit (inférieur à 1 mètre) [33].

2.2. Transmission aérienne :

La transmission aérienne se définit par la propagation d'un agent infectieux due à la dissémination de noyaux de gouttelettes (les aérosols) qui restent longtemps infectieux lorsqu'ils sont suspendus dans l'air. Le Sars-cov-2 peut se transmettre par voie aérienne lors par exemple des interventions médicales engendrant des aérosols, dans les milieux fermés mal ventilés même en absence de ces aérosols [33].

2.3. Transmission par des surfaces infectées :

Le contact des personnes fragiles avec des objets contaminés, par les gouttelettes respiratoires, d'une personne infectée par le Sars-cov-2, et puis toucher le nez, la bouche, ou les yeux, constitue un moyen indirect, de la propagation du virus, mais dans la plus part du temps, cela se produit chez les personnes ayant déjà effectué un contact étroit avec d'autres personnes infectées, ce qui rend difficile la distinction entre la transmission par gouttelettes respiratoire et la transmission par surfaces infectées [33].

2.4. Autres modes de transmission :

Des études ont montré que le sang, le plasma, les urines et les selles des patients infectés par le covid-19, peuvent contenir l'ARN du Sars-cov-2, mais jusqu'à présent, aucune étude n'a confirmé sa transmission ni par le sang-plasma ni par les urines-selles. En ce qui concerne la transmission intra-utérine, les données sont limitées, et pour la transmission par allaitement maternelle, l'OMS a affirmé ce mode en se basant sur des études effectués sur des échantillons de lait maternel de mères infectées et qui ont abouti à l'inexistence d'aucun virus viable , en plus de cela l'OMS encourage la continuité de l'allaitement maternelle même si la mère peut présenter une covid-19

confirmée[33].

3. Présentation clinique :

La figure 5 [32] ci-dessous présente un état comparatif de différents symptômes du Coronavirus 2 au début et au cours de l'infection en pourcentage, par exemple on remarque qu'au début de la maladie, presque 50% de personnes ont de la toux par contre au cours de la maladie presque 80% de personnes l'ont, et cela est appliqué pour tous les types de symptômes.

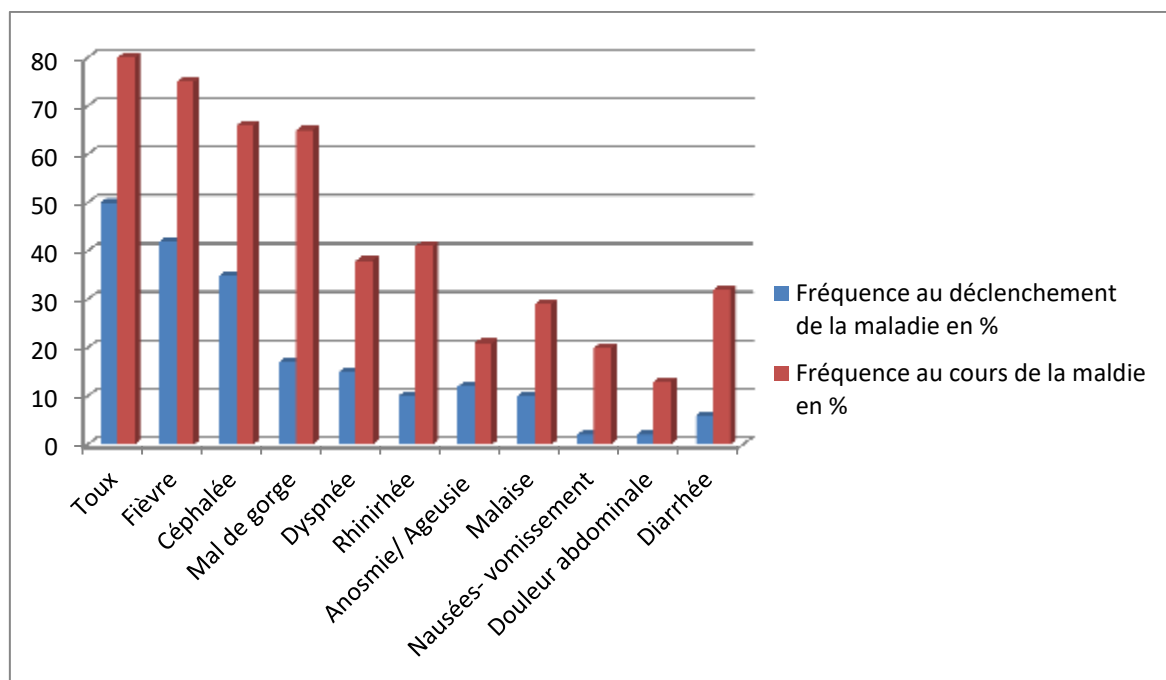


Figure 5 : Etat comparatif de la symptomatologie clinique de l'infection par Coronavirus au début et au cours de la maladie [32]

En ce qui concerne les personnes qui sont déclarés positives, on peut les classer selon cinq catégories :

- Asymptomatique : ils n'ont pas de symptômes mais ils sont PCR+ ;

- Légers : Ils ont des symptômes respiratoires et ou abdominales ;
- Modérée : ils ont une pneumonie sans hypoxémie ;
- Sévère : ils ont une pneumonie avec hypoxémie claire ;
- Critiques : ils ont une détresse opératoire aigue [32].

4. Méthodes de diagnostic du COVID-19 :

La détection rapide et précise du virus est une étape essentielle pour le diagnostic, surtout que la clinique ne peut pas à elle seule confirmer la positivité du cas. Ci-après les méthodes les plus utilisés pour le diagnostic du Covid-19.

4.1. RT-qPCR :

La transcriptase inverse-PCR en temps réel (RTPCR) présente un intérêt majeure pour la détection du SARS-CoV -2 à cause de ses avantages en tant que test qualitatif spécifique et simple et d'une sensibilité adéquate pour le diagnostic d'une infection précoce, mais, il existe un problème important dans ce test c'est le risque d'obtenir des faux résultats, par exemple des personnes suspects qui ont eu des signes cliniques typiques du COVID-19 et des images de tomodensitométrie (TDM) spécifiques et n'ont pas été diagnostiqués positivement. Ainsi, un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection au COVID19 et ne doit pas être utilisé comme un seul critère pour les décisions de traitement ou de prise en charge des patients [34].

4.2. Imagerie thoracique du COVID-19 :

L'imagerie thoracique en particulier la TDM thoracique est très importante pour détecter et prendre en charge les lésions pulmonaires causées par le coronavirus, sachant que sa sensibilité est élevée mais avec une spécificité moyenne, elle présente une valeur pronostic dans la prise en charge des

personnes malades surtout que le test RT-PCR peut donner des faux positifs ou négatifs. [35].

5. Traitement :

La prise en charge des patients déclarés COVID-19 positif est surtout symptomatique. Les formes légères peuvent être prises en charge à domicile, alors que les formes graves nécessitent l'hospitalisation. Au Maroc on a pu suivre le protocole lancé par le ministère de la santé le 5 Août 2020 (Figure 6) [36] qui a précisé :

- les cas à transférer en réanimation sont ceux avec :

- + Des troubles de conscience et neurologiques,
- + Polypnée supérieure à 30 cycles par minute,
- + Tension artérielle systolique inférieure à 90 mm Hg,
- + Fréquence cardiaque supérieure à 120 battements par minute,
- + saturation en oxygène inférieure à 92 pourcent sous 4 litre par minute d'oxygène [36].

-les conditions de prise en charge des patients asymptomatique à domiciles : ceux âgés de moins de 65 ans, qui ne souffrent pas de maladies psychiques ou de maladies chroniques à savoir « asthme, HTA, diabète, cardiopathie, cancer...etc. » qui ont une chambre individuelle bien aérée et bien sûr qu'ils vont suivre toutes les précautions recommandées [36].

▪ Traitement de première intention :	
Chloroquine 500 mg X 2/j, pendant 7 jours Ou Sulfate d'hydroxychloroquine 200 X3/j pendant 7 jours	En association avec l'Azithromycine 500 mg à J1, puis 250 mg /jour de J2 à J7
▪ Traitement de deuxième intention : Association Lopinavir/Ritonavir : 400mg X 2 par jour pendant 7jours.	
▪ Antibiothérapie : Non systématique, indiquée si surinfection bactérienne.	
Amoxicilline + acide clavulanique, 3g par jour Ou Moxifloxacine 400mg/j en une seule Ou Levofloxacine 500 mg/j en une seule prise	
▪ Nébulisation : à utiliser si besoin, avec les précautions nécessaires en matière de prévention des infections liées aux soins.	
▪ Héparine à bas poids moléculaire, si alitement.	
Avant le démarrage du traitement, il est nécessaire de réaliser un bilan minimum qui comprend les examens suivants : NFS, CRP, Glycémie, urée, créatininémie, transaminases, ECG, Radiographie thoracique.	

Figure 6: Protocole du Maroc dans la prise en charge des cas déclaré positifs [36]

6. L'importance de la supplémentation en minéraux et vitamines fasse au covid-19 :

6.1. Le rôle du zinc dans le protocole du COVID-19 :

Plusieurs études ont démontré que le zinc joue un rôle important dans la réduction de la gravité des infections respiratoires dues au coronavirus, de la fréquence et de la durée de la maladie après son administration [37,38].

Au Maroc, l'utilisation du zinc dans les procédures thérapeutique a montré une grande efficacité que le protocole lui-même chez les patients qui n'ont pas besoin d'être pris en charge en unité de soin intensif.

6.2. Le rôle de la vitamine D dans la protection de l'infection virale :

La supplémentation de la vitamine D joue un rôle sur l'immunité, malgré qu'il n'y a pas encore des études concrets mais cette supplémentation peut baisser les cytokines pro-inflammatoires ce qui pourra contribuer à la réduction de la mortalité chez les patients Covid-19 positifs en détresse respiratoire [38].

6.3. Le rôle de la Vitamine C dans la réponse immunitaire :

La vitamine C a été très recommandée par le protocole marocain car beaucoup d'études cliniques ont démontré qu'un apport de 1g/jour de vitamine C augmente la réponse immunitaire surtout chez les personnes âgées qui sont sensibles aux infections. D'autre étude ont également démontré que la vitamine C joue un rôle dans la septicémie secondaire à la pneumonie, observée dans COVID-19, c'est pour cela la supplémentation en vitamine C est une option judicieuse chez les personnes carencées en micronutriments qui sont à risque d'infection au COVID-19 pour aider à la prévention et au soutien des réponses immunitaires [38].

6.4. Le rôle des acides gras oméga-3 sur la réponse immunitaire :

Les acides gras oméga-3 ont des effets favorables sur la réponse immunitaire, ils exercent des effets antiviraux en inhibant la réplication du virus de la grippe. Son utilisation peut améliorer l'oxygénation chez les patients atteints du Covid-19 mais malgré cela, l'utilisant doit prendre ses précautions car il existe des preuves qui montrent une augmentation contre-intuitive du stress oxydatif et de l'inflammation en raison de la sensibilité accrue des membranes cellulaires aux dommages [38].

6.5. Le rôle de la supplémentation nutritionnelle dans le COVID-19 :

Une alimentation équilibrée en nutriment et vitamines C, D et E est très bénéfiques pour diminuer les infections respiratoires virales et réduire les symptômes. Ainsi que l'utilisation des minéraux (le zinc par exemple) aide à supprimer la réplication virale. Durant l'infection Covid19, un apport alimentaire équilibré donne des résultats positifs, cependant, les recherches doivent être approfondies en termes de dosage de ces vitamines et minéraux pour protéger le patient [38].

7. SARS-CoV-2 génomique et métagénomique :

La recherche chinoise a effectué le séquençage génomique du Sars-cov-2 pour montrer qu'il est un virus à ARN simple brin appartenant à la famille bêtacoronavirus et qui a environ 30 000 bases contenant 15 gènes. Sa structure contient une enveloppe (E), une membrane (M), des protéines de spike (S) et des protéines de nucléocapside (N) [32,39].

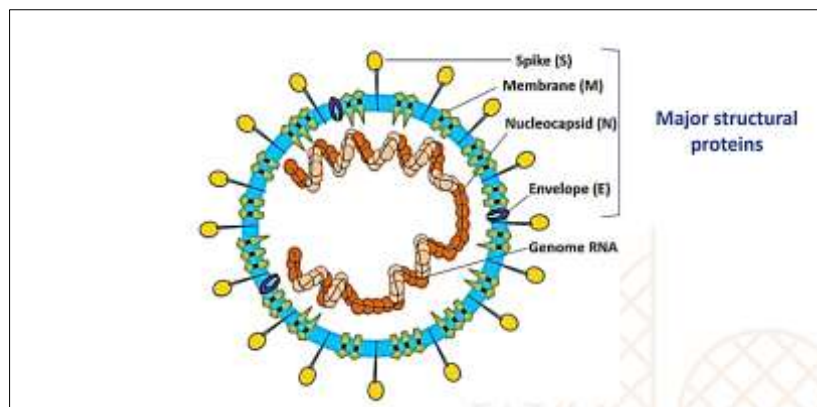


Figure 7 : La structure du sars-cov2 [39]

Un exemple pertinent de la menace des virus qui peuvent infecter l'être humain est la pandémie de Sars-Cov-2 apparu en 2020. Elle a été prouvée que la métagénomique est importante pour identifier le nouveaux coronavirus par séquençage métagénomique viral en le testant par des échantillons cliniques contenant Sars-CoV2, Sars-CoV et Mers-CoV [40].

Le séquençage sans hypothèse des acides nucléiques dans un échantillon a été permis par le séquençage métagénomique de nouvelle génération (mNGS). La classification des lectures NGS à l'aide de Centrifuge et de Génome détective a attribué des lectures aux plus proches parents des coronavirus émergents. Une faible identité de nucléotides 81% et d'acides aminés 84% pour le SRAS-CoV-2 associée à une couverture génomique d'à peu près 98%, étaient indicatives d'un nouveau coronavirus apparenté [40].

La combinaison des échantillons cliniques et la base de données de référence simulée a conduit à l'évaluation des performances d'un protocole de séquençage métagénomique pour identifier les virus émergents. Des nouveaux virus se détecte grâce à des charges élevées et faibles de SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV dans les échantillons cliniques à l'aide l'utilisation des séquences de référence créées avant l'émergence de ces virus. Les lectures de séquences ont été attribuées aux plus proches parents de ces virus et assemblées avec des séquences hétérologues à de «nouveaux» consensus génomiques. Un nouveau virus a été apparu grâce à la faible identité des génomes consensus avec des génomes étroitement apparentés. En Plus de cela, presque tout le génome du nouveau virus a été capturé à l'aide des sondes ciblant des séquences de virus vertébrés existant avant la pandémie de coronavirus de 2020. Cela a été validé par l'utilisation des virus

émergents avec une identité nucléotidique de plus de 76% de leurs plus proche parents, cette approche n'est pas valide pour les nouveaux virus qui sont moins étroitement liés [40].

Des recherches ont montré une croissance de 100 à 10 000 fois la sensibilité pour détecter le virus connus en utilisant les sondes de capture conçue par l'abordage de la variation de séquence en conservant les séquences mutantes ou variantes [41].

L'utilisation du séquençage métagénomique est devenue fréquent dans les laboratoires de diagnostic tel qu'une approche sans hypothèse pour les maladies infectieuses suspectées dans les cas non diagnostiqués, ce séquençage a détecté des agents pathogènes présents dans la base de données de référence, mais qui n'ont pas été testés par des méthodes de routine en raison d'associations rares ou inconnues avec une maladie spécifique, ou les tests de routine ont échoué.

De plus, des nouveaux pathogènes qui ne sont pas encore présent dans les bases de données ont été détectés par le mNGS. Les rapports sur des outils de découverte bioinformatique spécifiques décrivent généralement l'algorithme, une analyse in silico et des études de validation sur les performances des outils de découverte de virus à l'aide d'échantillons cliniques. L'utilisation de protocoles de découverte de virus dans les laboratoires de diagnostic peut contribuer à une vigilance accrue vis-à-vis des virus émergents et donc aider à la surveillance et à la préparation à une pandémie [40].

8. Conclusion :

Pour conclure, la métagénomique est la méthode la plus favorisé pour la détection des agents pathogènes connus et inconnus présents dans les échantillons sans avoir besoin d'amorces PCR spécifiques aux agents

pathogènes. Précisément en ce qui concerne la pandémie Sars-Cov-2, qui a des symptômes ressemblant à ceux des maladies respiratoires causée par d'autre virus. Et sachant que l'identification rapide de la cause probable des patients hospitalisés souffrant d'infections respiratoires est essentielle pour leurs prises en charge [42].

*Application clinique et importance
médicale de la génomique
et Métagénomique dans les infections
bactériennes :*

1. Application du séquençage métagénomique de nouvelle génération au diagnostic clinique des maladies infectieuses :

1.1. Introduction :

La dernière décade a connu la progression du séquençage de nouvelle génération de l'ADN, en effet il a transformé l'analyse génomique et il a créé de nouvelles applications dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Les grandes bases de données de génomes et de séquences de gènes ont été développées suite à la révolution de l'impact du NGS sur la microbiologie avec la génération quotidienne de nouvelles séquences génomiques microbiennes

Le domaine progressif de la métagénomique et de l'analyse du microbiome a été créé suite à la capacité d'analyser les communautés microbiennes sans les organismes cultivés, cette dernière a été la cause de la génération de nouvelles importantes connaissances sur la relation entre l'hôte et le microbe.

Cette nouvelle technologie a servi pour diagnostiquer les maladies infectieuses et analyser les pathogènes [43].

Le séquençage est une technique importante pour la détection des pathogènes puisque l'intégralité des agents infectieux contiennent des génomes d'ADN ou d'ARN.

En 2004, le séquençage à haut débit ou de nouvelle génération est devenu une plate-forme technologique intéressante pour détecter et caractériser taxonomiquement les micro-organismes dans les échantillons cliniques des patients, et son coût a connu une réduction de plusieurs ordres de grandeur [44].

1.2. Avantages du séquençage métagénomique de nouvelle génération pour la détection des agents pathogènes :

Le retard du traitement, la prolongation des séjours, la ré-hospitalisation et l'augmentation de la mortalité et de la morbidité sont le résultat du retard du diagnostic de l'infection suspectée chez les patients immunodéprimés suite au cancer ou autre pathologie surtout ceux qui sont dans les unités de soins intensifs. Plusieurs agents pathogènes (les virus, les bactéries, les champignons et les parasites) peuvent être la cause du retard.

L'administration précoce de médicaments antimicrobiens à large spectre ou prophylactiques peut fausser les résultats et limiter la récupération d'organismes à partir d'une culture de routine. Cette limite est aussi due à la lenteur de la croissance des organismes.

La sensibilité de détection de l'agent causal par les tests moléculaires tels que la PCR pour des organismes spécifiquement ciblés est diminuée à cause de la présence d'un agent pathogène rare ou l'utilisation des amorces incompatible avec la souche microbienne impliquée.

Les tests de diagnostic microbien ont connu un changement radical grâce à l'approche de diagnostic sans hypothèse qui permet la détection de presque tous les organismes.

Pourtant, La limite de détection des agents pathogènes occupe les cliniciens qui obtiennent des résultats négatifs la plus part du temps, c'est pour cela qu'ils se demandent toujours si la maladie aiguë a été réellement causée par une infection qui n'a pas été dépisté [44,45].

Le mNGS a plusieurs avantages :

- L'échantillonnage non biaisé qui identifie largement les agents pathogènes connus ou inattendus ou même découvrir de nouveaux organismes ;
- le couplage du mNGS a des approches ciblées, en utilisant les amorces d'ARN ribosomique 16S et les séquences d'espacement transcrites internes permet la détection bactérienne et fongique universelle, et puis l'identification de ces organismes.
- Donner des informations génomiques auxiliaires nécessaires pour tracer évolutivement, identifier les souches et prédire la résistance aux médicaments
- Utiliser les données quantitatives ou semi-quantitatives de la concentration des organismes dans l'échantillon en comptant les lectures séquencées, qui est utile dans les échantillons polymicrobiens ou dans l'implication des agents pathogène dans le processus de la maladie [44,45].

Les avantages et les inconvénients des méthodes utilisées dans le diagnostic des maladies infectieuses essentiellement la PCR direct, la NGS ciblé, la sérologie et la culture sont comparées dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Comparaison des méthodes de test pour le diagnostic des maladies infectieuses [44].

Test de diagnostic	Les avantages	Les inconvénients
PCR direct	*Facile *Rapide *Peu coûteux *Quantitative	*Nécessite des amorces qui ne fonctionnent pas toujours *Limité à une très petite partie du génome
NGS ciblé	*Détection sensible pour certains types d'organismes *Potentiel de quantification *Potentiel à combiner avec 16S NGS	*Préparation de la bibliothèque de séquençage plus complexe, généralement avec plus d'une amplification *Limité à une petite partie du génome *Cher et long *Sujette à la contamination par des espèces environnementales
Sérologie	*Potentiel de diagnostic après une infection aiguë *Peu coûteux	*Peut être négatif au début de l'infection *Faux-négatifs dans les déficiences immunitaires humorales *Faux positifs
Culture	*Capable d'accueillir une grande quantité d'échantillon *Peu coûteux *Bien étudié	*Sensibilité limitée par l'utilisation d'antibiotiques et d'antifongiques *Sensibilité limitée pour les organismes exigeants *Utilisation limitée dans les tests viraux *le résultat prend du temps, en particulier dans les cultures acido-résistantes et fongiques

1.3. Limitations du séquençage métagénomique de nouvelle génération pour la détection des agents pathogènes et solutions potentielles :

La domination des acides nucléiques de presque tous les échantillons des patients par le fond de l'hôte humain représente l'essentiel inconvénient du mNGS.

99% des lectures provenant de l'hôte humain limitent la sensibilité analytique globale pour détecter les pathogènes à cause de séquençage des lectures microbiennes non humaines qui sont rares.

Cet inconvénient inséparable du mNGS non biaisé est affaibli par les méthodes de séquençage ciblé ou d'épuisement de l'hôte, si les séquences bactériennes sont importantes, alors la distinction de la majorité des espèces par ce séquençage ciblé du gène de l'ARNr 16S s'effectuerait en séquençant facilement le fond de l'hôte humaine.

Alors, La combinaison du séquençage ciblé avec le mNGS peut être bénéfique pour les échantillons non stériles par exemple les échantillons qui proviennent d'un lavage bronchoalvéolaire, de selles ou d'abcès polymicrobiens [44].

Une approche différente du séquençage ciblé est utilisée pour les méthodes d'épuisement de l'hôte. La proportion de séquences de fond de l'hôte humain dans les données mNGS serait réduite grâce aux méthodes de déplétion de l'hôte qui ne profite pas des avantages de la cible pathogène connue comme le gène de l'ARNr 16s.

L'avantage du séquençage métagénomique non biaisé a été conservé par

cette approche qui est carrément indépendante du pathogène recherché.

Pour les bibliothèques de séquençage d'ARN, presque tous les fonds de l'hôte sont des séquences d'ARNr humain ou d'ARN mitochondrial, et La proportion de lectures microbiennes non humaines augmenterait indirectement grâce à l'épuisement des séquences hôte humaine, ce qui améliorerait par la suite la sensibilité analytique de la détection des agents pathogènes.

Les méthodes de déplétion qui sont basées sur la ribonucléase (RNase) H ou le clivage CRISPR-Cas9 des séquences ciblées sont hybridées d'une manière soustractive en utilisant les sondes de capture, cette dernière est causée par l'épuisement de l'ARN de l'hôte qui a été développées par plusieurs techniques.

Ces techniques sont dans la plupart du temps pratique pour les bibliothèques d'ARN, ces bibliothèques peuvent avoir une grande proportion de séquences d'ARNr non codantes, mais leurs utilité est faible pour les bibliothèques d'ADN, car il est impossible de cibler l'ensemble du génome d'ADN de l'hôte humain à cause de son coût et son efficacité [44].

Les caractéristiques physiques différentielles entre le signal (pathogène) et le fond de l'hôte humain sont la base des méthodes alternatives qui épuisent l'ADN de fond humain durant la phase préanalytique.

Il existe une approche qui consiste à ce que les globules blancs humains soient lysé sélectivement par la saponine ou d'autres réactifs chimiques, Ensuite, à l'aide de la désoxyribonucléase (DNase) le génome humain libéré est traité, donc l'ADN microbien qui est préservé dans les capsides virales ou les parois cellulaires microbiennes s'enrichie. La prévalence relative du fond microbien qui peut être le résultat de la contamination microbienne des réactifs utilisés

pour l'épuisement peut s'augmenter par l'enrichissement c'est pour cela il doit avoir une mise en garde à cette approche.

Une autre approche qui est différente de l'autre est le ciblage de l'ADN ou l'ARN acellulaire du modeste poids moléculaire et l'élimination du contenu génétique de poids moléculaires élevé qui s'associe la plus part du temps au matériel génomique humain. L'accomplissement de cette approche s'effectue à l'aide des méthodes comme la centrifugation et ceci avec une séparation physique des compartiments cellulaires et acellulaires des échantillons cliniques.

Malgré Les lectures microbiennes après l'élimination de micro-organismes intacts ou intracellulaires par exemple le virus lymphotrope à cellules T humaines ou *Listeria monocytogènes* peuvent subir au risque de diminution, l'enrichissement relatif de l'agent pathogène par rapport aux lectures humaines utilisant cette procédure a été démontrée par beaucoup d'études [44].

L'analyse et l'interprétation des résultats peuvent devenir difficiles à cause de la détection des contaminants microbiens existant dans l'échantillon, les réactifs utilisés pour le traitement ou dans l'environnement du laboratoire, ceci représente un inconvénient potentiel du mNGS.

Par négligence, lors de la collecte de routine des échantillons cliniques, les biopsies de sites présumés stériles dans le corps peuvent être contaminées par la flore cutanée durant l'aspiration à l'aiguille fine ou la flore buccale au cours des procédures de lavage bronchoalvéolaire.

Donc, afin de garder un environnement de test aussi stérile sans présence d'acide nucléique, il est nécessaire de respecter strictement les procédures de contrôle de la qualité des réactifs et des flux de travail.

Il est aussi essentiel d'utiliser des contrôles négatifs, d'évaluer les réactifs et les tests périodiques par balayage afin de ne pas générer des faux positifs par la contamination croisée du laboratoire et des échantillons.

Aussi, il faut que le laboratoire soit habitué à la flore microbienne qui est présente fréquemment dans la gamme d'échantillons cliniques pour chaque type d'échantillon à tester [44].

1.4. Application du séquençage de nouvelle génération en microbiologie clinique et prévention des infections :

Le succès du traitement, le rétablissement et la sécurité des patients sont basé essentiellement sur l'identification et la caractérisation des micro-organismes responsables de l'infection.

Mais les laboratoires de diagnostic n'arrivent pas encore à cultiver toutes les espèces bactériennes avec succès, et les tests moléculaires utilisables n'ont pas la capacité de détecter les caractéristiques génétiques émergentes des agents pathogènes disséminer chez l'homme les animaux et même l'environnement.

Cependant la vie des patients hospitalisés se met facilement en danger à cause des agents pathogènes non reconnus qui peuvent créer des éclosions à l'hôpital [46].

Durant les deux dernières décades, la technologie a connu un développement rapide des méthodes de diagnostic moléculaire, ces dernières ont joué un rôle important dans les laboratoires de microbiologie médicale : elles ont minimisé le délai nécessaire entre la réception de l'échantillon et le résultat final, et même elles ont détecté des pathogènes non cultivables.

Mais la connaissance des espèces pathogènes susceptible d'être présents

dans l'échantillon à l'avance est très importante pour la réussite de ces méthodes moléculaires. L'analyse séquentielle des gènes ou de l'ensemble du génome des agents pathogènes est l'une des principales méthodes moléculaire utilisées dans les laboratoires de microbiologie médicale [46].

Les analyses de séquence sont d'une grande utilité, ils permettent l'identification des bactéries par des analyses de séquence de l'ADNr 16s, l'identification des champignons par des analyses de séquence de l'ADNr 18s de la région de l'espaceur transcrit interne (ITS), la détection de mutations dans les génomes viraux ou bactériens qui conduisent à une résistance aux antiviraux et aux antibiotiques, et enfin la relation génétique des bactéries ou des virus.

Une amplification de chaque gène ou région génomique, en utilisant des amorces spécifique, est une étape essentielle qui précède le séquençage de Sanger, ce dernier peut être utilisé pour l'identification des agents pathogènes dans le matériel clinique, mais cette méthode est devenu problématique surtout avec un matériel clinique plus complexe et avec plusieurs espèces par exemple l'échantillon des matières fécales, dans de tels cas l'identification d'agents pathogènes spécifiques est difficile voire même impossible et les résultats obtenus ne sont pas fiables, en plus le délai nécessaire entre l'échantillon et le résultat est très long avec un cout très élevé .

Le NGS est la méthode la plus demandé par les microbiologistes cliniques ou les spécialistes des maladies infectieuses en collaboration avec les microbiologistes moléculaires et les praticiens du contrôle des infections. Son introduction pour le diagnostic de routine était en 2014 par l'hôpital universitaire de Groningen, l'un des plus grands hôpitaux des Pays-Bas, son laboratoire de microbiologie clinique reçoit plus de 1500 échantillons par an

pour un séquençage de nouvelle génération dont la plupart des indications sont le génotypage de micro-organismes hautement résistants et les enquêtes sur des épidémies [46].

1.5. Séquençage de nouvelle génération en microbiologie clinique :

Beaucoup de laboratoires de microbiologie médicale utilisent le NGS pour la gestion des épidémies, l'exploration moléculaires des cas, la distinction et l'observation des agents pathogènes, la caractérisation rapide des bactéries par la région ARNr 16S-23S, dans la taxonomie, dans la métagénomique des approches sur des échantillons et la définition de la transmission de micro-organismes zoonotiques de l'animal à l'homme.

Afin d'étudier un large éventail de caractéristiques d'agents pathogènes l'utilisation du NGS en une seule étape est idéal, ce dernier s'applique au large éventail d'agents pathogènes. Pour pouvoir deviner la gravité de la maladie, la cause de l'infection et pour évaluer les risques au début de la maladie il est nécessaire de connaître le profil de virulence du pathogène. Comme l'existence des facteurs de virulence n'est pas limité à un gène particulier, le NGS peut contribuer substantielle à sa détermination en utilisant plusieurs outils en ligne [46].

Les nouveaux gènes de résistance chez les bactéries, dans les collections de souches actuelles et au même temps dans ceux qui sont historiques sont détectés à l'aide du NGS qui est utilisé aussi pour identifiées les nouvelles variantes de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG), pour savoir si les gènes sont réellement responsables du profil de résistance aux antibiotiques observé, il y a eu recours à d'autre expériences [46].

Le NGS ciblé de la région du cluster ARNr 16S-23S est utilisé pour une identification bactérienne rapide dans un échantillon clinique

L'aperçu du microbiome complet est fourni en détectant sans culture à partir du NGS un nombre théoriquement illimité d'agents pathogènes.

La détection de l'intégralité des micro-organismes tels que les bactéries, virus, et champignons peut s'effectuer par le NGS.

Pourtant, La combinaison de compétences en bio-informatique et de ressources informations sont nécessaire pour analyser l'énorme ensemble de données mais, ces compétences ne sont pas présentent dans la majorité des laboratoires de microbiologie médicale. En plus le délai d'exécution des approches métagénomique est de 4 à 5 jours.

L'approche sans culture qui utilise le NGS ciblé est parfaite pour combler l'écart entre les méthodes conventionnelles (culture et PCR) et la métagénomique en détectant et identifiant les espèces bactériennes.

En comparant le NGS ciblé avec la métagénomique, on peut dire que le NGS est plus rapide, non compliquer et pas couteux, alors il est convenable de l'utiliser dans les laboratoires de diagnostic dans un court laps de temps.

La présence de la séquence du gène de l'ARNr 16S dans toutes les bactéries, l'a rendu un marqueur génétique fiable, au cours du temps son rôle n'a pas changé, cette séquence peut être utilisé immédiatement sur le matériel clinique tous les jours. Pourtant une identification sans équivoque n'est pas toujours obtenue à cause des similitudes de séquence élevées dans ce gène entre quelques espèces bactériennes [46].

Ces derniers temps, une approche innovante de l'ARNr 16S-23S du NGS

sans culture s'est développée afin de découvrir et déterminer les espèces bactériennes dans des échantillons cliniques. Cette approche est supérieure par rapport aux méthodes d'identification habituellement utilisées, et l'exacte identification des agents pathogènes dans les échantillons d'urine qui ont aussi été déterminé en tant que la raison des infections des voies urinaires avec la culture conventionnelle.

De plus, cette méthode aide à reconnaître simultanément beaucoup d'agents pathogènes dans des matériels cliniques, qui sont restés antérieurement incultes et négatifs à la PCR. Cette méthode aura un grand impact clinique et effectuera des effets clairs sur le traitement des patients, sans oublier qu'elle améliorera le traitement antibiotique.

Finalement, les laboratoires de microbiologie clinique pourront utiliser le NGS dans leur laboratoire de diagnostic de routine et accompagner les développements technologiques et bio-informatiques essentiels afin qu'au futur, mettre en œuvre la métagénomique dans le diagnostic [46].

1.6. Utilité clinique du séquençage métagénomique de nouvelle génération :

1.6.1. Infections du système nerveux central :

Parmi les étiologies des infections cérébrales, la méningite et l'encéphalite, qui ne sont pas toujours diagnostiquées. Même si les agents pathogènes potentiels sont nombreux, et les tests diagnostiques sont approfondis, dans certains cas les agents pathogènes sont négligés. Le mNGS a été utilisé pour l'identification de l'agent étiologique dans plusieurs cas avec la confirmation diagnostique aux tests conventionnels, et certaines de ces infections se sont avérées répondre au traitement. Actuellement plusieurs rapports de cas

confirment que le mNGS permet l'identification des bactéries, des virus, des champignons et de parasites à partir de LCR et tissu cérébral [44].

1.6.2. Infections sanguines :

Plusieurs rapports de cas et études préliminaires ont démontré que l'ADN ou l'ARN de pathogènes sans les cellules circulants dans le sang et qui sont issus des agents pathogènes circulant ou non circulants peut s'associer à l'infection.

La détection de L'ADN pathogène des patients à grand risque qui ont un traitement antimicrobien peut s'effectuer par le séquençage. Donc pour le diagnostic des infections chez les patients qui ont une septicémie à culture négative, le test mNGS est devenu trop recommandé.

Pourtant, Les volontaires sains qui sont évalués par NGS ont été rapportés par les acides nucléiques bactériens, ceci à provoquer des interrogations sur la contamination potentielle et la signification clinique de l'ADN détecté dans le plasma [44].

1.6.3. Infections respiratoires :

Plusieurs patients prennent une antibiothérapie suite à une pneumonie non diagnostiquée, ce qui limite le rendement des tests basés sur la culture. L'analyse du mNGS peut être compliquée par la présence de la flore buccale qui dans certaines cas peut être pathogène.

Par contre les analyses statistiques quantitatives ou semi-quantitatives peuvent faire la distinction entre l'infection et la colonisation, le mNGS et le séquençage de l'ARNr 16s ont permis l'identification de pathogène en utilisant des technique quantitatives. Pour les cas non confirmés par Les tests conventionnels, une évaluation clinique est nécessaire pour déterminer

l'importance des organismes détectés par le mNGS [44]

1.6.4. Infections gastro-intestinales :

En utilisant le mNGS les microbiologistes ont analysé le microbiome des selles et ont diagnostiqué des maladies cliniques associées, par exemple la diarrhée. Le mNGS a été utilisé pour identifier l'agent pathogène potentiel chez les patients atteints de cholécystite aiguë. La détection de gène de β lactamases a spectre étendu a été corrélé avec les profils de sensibilité des échantillons en culture, ce qui indique que le NGS peut être utilisé pour donner des informations sur la résistance aux antimicrobiens du pathogène concerné [44].

1.6.5. Infections oculaires :

Même si le volume des échantillons oculaires est très limité, le mNGS permet de tester une liste plus longue d'agents pathogènes, surtout avec les méthodes conventionnelles, et c'est grâce aux mNGS que les patients avec des infections oculaires connus ou inconnus y compris les infections intraoculaires de rubéole ont été diagnostiqués [44]

Conclusion :

La détection de l'agent pathogène dans le diagnostic des maladies infectieuses est effectué grâce au séquençage métagénomique de nouvelle génération directement à partir d'échantillons cliniques, ce qui a permis une prescription plus personnelle et plus adéquate afin d'éviter la résistance aux antibiotiques. Quelle est donc l'impact du mNGS sur la résistance bactérienne ?

2. Impact du séquençage métagénomique de nouvelle génération sur la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques :

2.1. Introduction :

LE XXe siècle a été révolutionné par la découverte des antibiotiques, le premier était le sulfamide suivi par la pénicilline. Mais ces succès ont connu la déception après l'apparition de la résistance bactérienne qui est le résultat de la défense de l'organisme contre l'antibiotique en produisant des enzymes qui inactivent les antibiotiques, en modifiant leurs cibles d'action, leurs perméabilité et en formant un biofilm vis-à-vis de l'antibiotiques.

Le phénomène de la résistance aux antibiotiques est devenu une menace en causant des problèmes dans le traitement des patients. Selon l'OMS, il est devenu un problème majeur de santé publique, malgré les efforts des laboratoires pharmaceutiques, en particulier pharmacologiques dans le développement des solutions afin de limiter cette résistance.

De nos jours, les laboratoires de microbiologie médicale ont abordé de nouvelles méthodes de séquençage d'ADN, leur puissance va révolutionner la microbiologie clinique qui deviendrait important dans plusieurs domaines, mais l'application de ce séquençage a connu des problèmes de méconnaissance des outils informatiques et du vocabulaire associé [47].

2.2. Définition de la résistance bactérienne :

Si la concentration minimale inhibitrice d'un micro-organisme (CMI) est supérieure à celle qui empêche la plupart des autres souches de la même espèce à se développer donc le micro-organisme est résistant.

Et tandis que la concentration atteinte in vivo par un traitement est plus abaissée que la concentration d'antibiotique qu'une souche peut supporter, donc cette souche est considérée comme une souche résistante.

La résistance croisée est définie par la résistance à un antibiotique qui est attribué par la résistance à un autre antibiotique.

A cause des résistances naturelles acquises et accumulées, les bactéries sont sensibles à peu d'antibiotiques, c'est ce qu'on appelle les multi-résistantes c'est-à-dire que ces bactéries résistent à beaucoup d'antibiotiques et classes pharmacologiques d'antibiotiques [48].

2.3. Historique de la résistance aux antibiotiques :

L'année 1937 a connu l'introduction des premiers antimicrobiens efficaces tel que les sulfamides, leur utilisation thérapeutique a été interrompue à cause du développement de mécanismes spécifiques de résistance. A la fin des années 1930, la résistance aux sulfamides a été éliminée mais après plus de 70 ans cette résistance a réapparu.

En 1928, Alexander Fleming a découvert la pénicilline, quelques années plus tard exactement en 1940 et avant d'avoir utilisé la pénicilline en tant que thérapeutique, les deux membres de l'équipe de découverte de la pénicilline ont déterminé une pénicillinase bactérienne.

Après l'énorme utilisation de l'antibiotique, les souches résistantes qui peuvent annuler le fonctionnement de l'antibiotique sont devenues fréquentes, Alors les études de synthèses ont commencé afin de faire un changement chimique de la pénicilline pour éviter le clivage par les pénicillinases (β -lactamases).

Donc, identifier la pénicillinase bactérienne avant d'utiliser l'antibiotique a été intéressant pour les découvertes récentes parce que les nombreux gènes résistants aux antibiotiques représentent les composants des populations microbiennes naturelles, donc la question qui se pose est : est-ce que l'antibiotique est apparu avant la résistance ou le contraire ?

En 1944, la streptomycine a vu le jour, elle est utilisée pour traiter les patients atteints de la tuberculose, les souches mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* qui résistent aux concentrations thérapeutiques de l'antibiotique. Ce streptomycine a été évolué tel que les autres antibiotiques qui ont été découvert et utilisé dans la pratique clinique.

Au cours des années 1950 au Japon, la résistance aux antibiotiques génétiquement transférable a été identifiée accidentellement, ce qui a causé un changement en faisant entrer le concept génétique hérétique qui a la possibilité de disséminées les collections de gènes d'antibiotiques par conjugaison bactérienne dans toute la population d'agents pathogènes bactériens.

Durant les dernières années, il a été découvert que l'échange de gènes représente une propriété universelle des bactéries qui a eu lieu dans les éons d'évolution microbienne.

La conscience du grand intérêt du transfert horizontal de gènes pour évoluer le génome a été augmenté en découvrant l'existence de séquences génétiques bactériennes putatives dans les génomes eucaryotes.

Par la suite, La caractérisation et la réparation d'îles génomiques contenant des gènes de pathogénicité et d'autres groupes de gènes fonctionnels dans divers genres bactériens a été la cause de la divulgation des autres aspects du transfert de gènes. Donc l'objectif primordial de la recherche était le transfert de la résistance aux antibiotiques à médiation plasmidique à cause de son utilité médicale et, plus récemment, pratique [49].

2.4. Origine de la résistance aux antibiotiques :

Parmi les outils pharmaceutiques, les antibiotiques sont les plus essentiels afin de pouvoir contrôler les maladies infectieuses. Pourtant l'utilisation des antibiotiques est l'origine des organismes résistants qui affaiblie leur utilité clinique.

La résistance peut apparaître dans des populations de bactéries par mutation et être entretenu en utilisant la sélection ultérieure ou en obtenant les éléments de résistance latéralement par d'autres organismes.

C'est récemment que la source de ces gènes de résistance ont été assimilés. Un essentiel résistome bactérien a été prouvé, ce résistome représente l'ensemble des gènes de résistance et de leurs précurseurs dans les bactéries pathogènes et non pathogènes.

Différentes ressources ont été la cause de l'apparition de ces gènes, parmi ces ressources il y a l'autoprotection pour les producteurs d'antibiotiques, le transport de petites molécules pour différentes causes (la nutrition et la désintoxication des produits chimiques nocifs), et afin de pouvoir parvenir à d'autres objectifs comme le métabolisme, et prouver une sélectivité fortuite pour les antibiotiques.

Malgré les différentes origines des gènes de résistance, ils ont le pouvoir de se déplacer au sein des populations bactériennes et d'apparaître dans les bactéries pathogènes. Donc il est nécessaire de saisir les processus qui aident à évoluer et désigner les résistances afin de pouvoir gérer les stocks actuels d'antibiotiques et développer des nouveaux [50].

2.5. De la résistance naturelle à la résistance acquise :

Parmi la pluralité des mécanismes qui proviennent de la résistance aux antibiotiques, ils existent :

-  Des mécanismes qui produisent l'enzyme qui change ou détruit l'antibiotique ;
-  Des mécanismes qui rectifient la cible de l'antibiotique ;
-  Des mécanismes qui imperméabilisent la membrane de la bactérie.

Il existe des bactéries qui résistent naturellement aux antimicrobiens. Ce qui est embarrassant, c'est la manifestation de la résistance à certains antibiotiques dans une bactérie déjà délicate.

La mutation génétique qui influence le chromosome de la bactérie peut produire les résistances, cette dernière peut aussi avoir lieu par l'obtention de matériel génétique étranger tel que le plasmide ou le transposon et qui détient un ou beaucoup de gènes de résistance dont la source est une autre bactérie.

Un antibiotique ou une famille d'antibiotiques sont concernés par les résistances chromosomiques. Par contre beaucoup d'antibiotiques ou beaucoup de familles d'antibiotiques sont concernés par les résistances plasmidiques. Ces deux résistances sont l'outil de résistance qui est très courant, elles représentent 80% des résistances acquises [51].

Une liste de bactéries résistantes qui constituent une menace mondiale a été publiée par l'OMS en Février 2017, cette liste est présentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau II : Liste des bactéries résistantes aux antibiotiques faite selon l’OMS en 2017 [52]

Urgence critique	<i>Acinetobacter baumannii</i>	résistance aux carbapénèmes
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	résistance aux carbapénèmes
	<i>Enterobacteriaceae</i>	résistance aux carbapénèmes, production de BLSE
Urgence élevée	<i>Enterococcus faecium</i>	résistance à la vancomycine
	<i>Staphylococcus aureus</i>	résistance à la méthicilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine
	<i>Helicobacter pylori</i>	résistance à la clarithromycine
	<i>Campylobacter</i> spp	résistance aux fluoroquinolones
	<i>Salmonellae</i>	résistance aux fluoroquinolones
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones
Urgence modérée	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	insensible à la pénicilline
	<i>Haemophilus influenzae</i>	résistance à l’ampicilline
	<i>Shigella</i> spp	résistance aux fluoroquinolones

2.6. Analyse métagénomique d’échantillons environnementaux :

Afin de découvrir les gènes résistants naturels au sein des clones recombinants aléatoires dérivés de banques d’ADN bactérien de sols et de sédiments, des méthodes de clonage, de PCR et d’expression géniques ont été utilisées.

Jusqu’au aujourd’hui, seulement *E. coli* qui a été appliqué pour identifier la résistance fonctionnelle car pour l’identifier avec d’autre microbe, elle aura

besoin de l'expression géniques des gènes clones chez un hôte hétérologue et c'est ce qui est probable.

Malgré l'identification de quelques gènes résistants, la question qui se pose toujours est le nombre qui devait être atteint en appliquant une grande gamme de systèmes d'expression et d'hôtes. D'Costa et al et Dantas et al ont montré que le nombre aurait été important en utilisant les approches de séquençage global ultérieures [49].

L'existence de plusieurs gènes et mécanismes potentiels d'antibiotiques dans la nature a été prouvé par différentes études. Mais il y a encore beaucoup d'interrogation sur ce sujet.

Le développement de la résistance clinique en utilisant les fonctions des réservoirs environnementaux est encore douteux, et les importants rôles métaboliques des gènes proto-/quasi résistant dans les populations microbiennes n'ont pas encore découvert.

L'un des gènes putatifs découvert dans les études environnementales et qui a été mobilisé dans des bactéries pathogènes et exprimé sous forme de phénotypes de résistance, n'a presque pas été prouvé.

Donc, c'est quoi les pressions sélectives envers la diversité de gènes résistants sachant que les concentrations de composés antibiotiques sont essentiellement indétectables dans les milieux naturels ? [49].

2.7. Importance du séquençage de nouvelle génération dans la résistance bactérienne :

Afin de détecter et de déterminer les agents pathogènes lors d'épidémies, le

séquençage de nouvelle génération NGS devenu fréquemment utilisé. Cette méthode permet de séquencer vite les génomes complets des pathogènes, elle est devenue efficace envers le génotypage net et l'épidémiologie moléculaire et permet d'identifier la résistance aux médicaments et les traits de virulence [53].

Aujourd'hui, la résistance aux antibiotiques est un souci mondial et elle doit être surveillée en temps réel. Les informations acquises et le nombre de gènes pour la résistance aux antibiotiques seront potentiellement haussés par la hausse du nombre de séquences génomiques.

Sans avoir besoin de trouver les déterminants de la résistance aux antibiotiques, plusieurs génomes séquencés sont devenus libres.

A l'avenir, des différents outils bioinformatiques seront inventés afin d'annoter et de détecter d'une façon rapide les gènes connus codant pour la résistance aux antibiotiques.

Des recherches ont prouvé l'existence d'un grand pool de gènes inconnus codant pour les résistances aux antibiotiques dans l'environnement, c'est pour cela afin de pouvoir trouver des récents gènes de résistance aux antibiotiques, le sol et les animaux doivent être beaucoup étudiés.

La résistance aux antibiotiques est du temps jadis, cette résistance évolue génétiquement de la même manière que les bactéries. De nouvelles astuces sont assurées afin de trouver des nouveaux médicaments car le nombre de bactéries multirésistantes responsables d'infections humaines a beaucoup augmenté. Plusieurs déterminants de la résistance aux antibiotiques sont localisés sur des éléments génétiquement mobiles qui se dispersent aisément parmi les bactéries.

Il est difficile de déchiffrer le résistome dans les séquences du génome entier car il se peut que la localisation de plusieurs déterminants de la résistance aux antibiotiques chez les transposons et les intégrons manque dans le séquençage, ou car ils sont des séquences d'intervalle [54].

Des études ont prouvé que Le séquençage du génome entier en utilisant le NGS est valorisé par rapport aux autres techniques de typage traditionnelles fondé sur la séquence dans l'enquête dans une épidémie.

Donc l'utilisation du NGS dans la microbiologie clinique va perfectionner énormément les techniques d'épidémiologie moléculaire et de surveillance des maladies infectieuses, et elle va donner un bloc de données nécessaires pour l'amélioration de la compréhension de la biologie des agents pathogènes [55].

2.8. Conclusion :

L'être humain en général ne peut échapper à une menace mondiale qui est le développement et la dispersion de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries mais il peut la borner, et doit lutter activement contre elle afin de pouvoir trouver la bonne manière de traiter le problème de la résistance aux antibiotiques [54]



Quelques années ont été suffisantes pour révolutionner les possibilités d'analyse du génome humain individuel, ceci grâce à la génomique, la métagénomique et le NGS. Leurs applications dans le domaine de recherche médicale, principalement pour diagnostiquer les maladies infectieuses se sont étendues par une implantation graduelle dans les laboratoires hospitaliers. Prochainement, ces nouvelles méthodes vont devenir importantes pour diagnostiquer toutes les maladies infectieuses.

L'exemple le plus pertinent pour ses techniques et le coronavirus, où l'efficacité de la métagénomique a été affirmée dans l'identification du COVID-19 par séquençage métagénomique viral dans les laboratoires de diagnostic sans avoir besoin d'amorces PCR spécifiques aux agents pathogènes.

La capacité d'analyser les communautés microbiennes sans cultiver des organismes a créé le domaine croissant de la métagénomique et de l'analyse du microbiome et a généré de nouvelles connaissances importantes sur la relation entre l'hôte et le microbe. Cette nouvelle technologie est de grande valeur pour le diagnostic des maladies infectieuses et l'analyse des pathogènes.

Les génomes d'ADN ou d'ARN sont contenus dans la plupart des agents infectieux, donc le séquençage représente une approche importante afin de détecter les pathogènes et définir l'étiologie de l'infection suspectée chez les patients hospitalisés gravement malades, ceci pour empêcher les séjours prolongés, les ré-hospitalisations et l'augmentation de la mortalité et la morbidité.

Donc, pour traiter, rétablir et assurer la sécurité des patients, les médecins doivent essentiellement identifier et caractériser les micro-organismes responsables d'infections.

Ce qui préoccupe principalement les médecins est de prendre en charge les patients qui ont des maladies infectieuses, Parfois, cette préoccupation cause des impasses thérapeutiques suite à la résistance aux antibiotiques qui représente le résultat d'une adaptation génomique et protéique des bactéries. Donc l'enjeu primordial de la santé publique est de surveiller la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Actuellement, les facteurs de virulence et/ou des déterminants de la résistance aux antibiotiques d'une souche pathogène sont identifié totalement et rapidement par la génomique, cette dernière a été la cause de la prescription aux patients des traitements plus spécifique et plus convenable pour pouvoir diminuer au maximum les coûts et les durées du séjour hospitalier.

Prochainement, le séquençage du génome de toute bactérie engendrant une infection grave sera effectuer pour faire des prises en charge personnalisées et ceci suite aux grands nombre d'application des nouvelles méthodes de séquençage.



Résumé

Titre : Génomique et métagénomique : importance et application dans les infections bactériennes.

Auteur: TOUIJER Ghizlan

Rapporteur: Pr YASSINE SEKHSOKH

Mots clés: Génomique, Infection, Métagénomique, Résistance, Séquençage

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est une nouvelle méthode qui a pour but l'amélioration de la capacité du diagnostic, l'interrogation et le suivi des maladies infectieuses, il a développé l'analyse génomique par l'inauguration de nouveau moyen de détection des agents pathogènes, surtout que la plupart de ces agents contiennent des génomes d'ADN ou d'ARN.

D'une part, La métagénomique est une technique indépendante de la culture, basée sur les progrès récents dans le domaine des NGS, son avantage réside dans sa capacité à détecter directement le microbe pathogène responsable dans un échantillon humain clinique ainsi que de détecter de nouveaux agents pathogènes. Son efficacité était affirmée dans l'identification du COVID-19 par séquençage métagénomique viral dans les laboratoires de diagnostic sans avoir besoin d'amorces PCR spécifiques aux agents pathogènes.

D'une autre part, l'adaptation génomique et protéique des bactéries ont causé la résistance aux antibiotiques dont la surveillance représente une contribution essentielle pour la santé publique. Pourtant, la génomique était la source pour identifier exhaustivement et rapidement les facteurs de virulence et/ou les déterminants de la résistance aux antibiotiques d'une souche pathogène. Prochainement, il serait peut être possible de séquencer le génome de toute bactérie engendrant une infection sévère afin de faire des prises en charge personnalisées

Pour conclure, l'objectif de cette thèse est l'application du séquençage métagénomique de nouvelle génération au diagnostic clinique des maladies infectieuses, surtout l'infection par coronavirus, les infections bactériennes et la résistance aux antibiotiques.

Summary

Title: Genomics and metagenomics: importance and application in bacterial infections.

Author : TOUIJER Ghizlan

Rapporteur: Pr YASSINE SEKHSOKH

Keywords: Genomics, Infection, Metagenomics, Resistance, Sequencing.

Next generation sequencing (NGS) is a new method which aims to improve the capacity of diagnosis, interrogation and monitoring of infectious diseases, he developed genomic analysis by the inauguration of new means of detection of pathogens, especially since most of these agents contain DNA or RNA genomes.

On the one hand, Metagenomics is a culture independent technique, based on recent advances in the field of NGS, its advantage lies in its ability to directly detect the responsible pathogen in a clinical human sample as well as to detect new Pathogens. It has been shown to be effective in the identification of COVID-19 by viral metagenomic sequencing in diagnostic laboratories without the need for pathogen-specific PCR primers.

On the other hand, the genomic and protein adaptation of bacteria has caused resistance to antibiotics whose surveillance represents an essential contribution to public health. Yet genomics was the source to comprehensively and rapidly identify the virulence factors and / or the determinants of antibiotic resistance of a pathogenic strain. In the near future, it might be possible to sequence the genome of any bacteria causing severe infection in order to provide personalized care.

To conclude, the objective of this thesis is the application of next generation metagenomic sequencing to the clinical diagnosis of infectious diseases, especially coronavirus infection, bacterial infections and antibiotic resistance.

ملخص

العنوان: الجينوميات و الميتاجينوميات: الأهمية والتطبيق في الالتهابات البكتيرية

تأليف: غزلان تويجر

المقرر: الأستاذ ياسين سخسوخ

الكلمات المفتاحية: الجينوميات، العدوى، الميتاجينوميات، المقاومة، التسلسل

تسلسل الجيل التالي هو تقنية جديدة تهدف إلى تحسين القدرة على تشخيص واستجواب ومراقبة الأمراض المعدية وقد طور التحليل الجينومي من خلال تدشين وسائل جديدة للكشف عن مسببات الأمراض خاصة وأن معظم هذه العوامل تحتوي على جينومات الحمض النووي أو الحمض النووي الريبي.

من ناحية أخرى، الميتاجينوم هي تقنية مستقلة عن الثقافة تعتمد على التطورات الحديثة في مجال تسلسل الجيل التالي، تكمن ميزتها في قدرتها على الكشف المباشر عن العامل الممرض المسؤول في عينة بشرية إكلينيكية وكذلك اكتشاف مسببات الأمراض الجديدة. لقد أثبت أهميته في التعرف على الفيروس التاجي الجديد من خلال التسلسل الميتاجينومي الفيروسي في مختبرات التشخيص دون الحاجة إلى بادئات تفاعل البوليميراز المتسلسل الخاصة بمسببات الأمراض.

من ناحية أخرى ، تسبب التكيف الجيني والبروتيني للبكتيريا في مقاومة المضادات الحيوية التي تمثل مراقبتها مساهمة أساسية في الصحة العامة. ومع ذلك ، كان علم الجينوم هو المصدر لتحديد عوامل الضراوة بشكل شامل وسريع و / أو محددات مقاومة المضادات الحيوية للسلالة المسببة. في المستقبل القريب ، قد يكون من الممكن تسلسل جينوم أي بكتيريا تسبب عدوى شديدة من أجل توفير رعاية شخصية.

في الختام ، الهدف من هذه الأطروحة هو تطبيق الجيل التالي من التسلسل الميتاجينومي للتشخيص السريري للأمراض المعدية ، وخاصة عدوى فيروس كورونا والالتهابات البكتيرية ومقاومة المضادات الحيوية.



- [1]. **Infections, Genetics and evolution.** MEEGID. ISSN: 1567-1348
https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/621317?generatepdf=true
- [2]. **La génomique, une révolution en marche. Génome Québec**
http://www.genomequebec.com/DATA/PUBLICATION/4_fr~v~La_genomique_une_revolution_en_marche.pdf
- [3]. **G. Durand.** The inputs of metagenomics in the diagnostic of infectious diseases. December 2017. Pages 100-109 Volume 19. Issues 3–4.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210654517300509?via%3Dihub>
- [4]. **Monitor Deloitte.** Genomics in the UK. septembre2015.
https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/464088/BIS-15-543-genomics-in-the-UK.pdf
- [5]. **Jean-François Hocquette, et al.** The genomics revolution also applies to the bovine genome. May 2007. Volume 16(3):163-169.
https://www.researchgate.net/publication/289359375_The_genomics_revolution_also_applies_to_the_bovine_genome
- [6]. **F. Sanger, et al.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors 1977 Dec; 74(12): 5463–5467.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431765/>
- [7]. **RD Fleischmann, et al.** Whole genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenza Rd.28Jul1995.269 (5223):496-512.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542800>
- [8]. **Timeline:History of genomic.** <https://www.yourgenome.org/facts/timeline-history-of-genomics>
- [9]. **Human genome timeline.** <https://www.pinterest.de/pin/283163895295266759/?lp=true>
- [10]. **Jo Handelsman.** Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. Dec2004.68 (4):669–685.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539003/>
- [11]. **Carola Simon. et Rolf Daniel.** Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. Feb2011. 77(4): 1153–1161. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067235/>
- [12]. **Gilbert JA.et Dupont CL.** Microbial metagenomics: beyond the genome. mars2011. 347-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329209>

- [13]. **Alejandra Escobar-Zepeda, et al.** The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. juin2015.348.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681832/#B108>
- [14]. **Doreen E. Gillespie, et al.** Isolation of Antibiotics Turbomycin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA.septembre2002.68 (9): 4301–4306.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124076/>
- [15]. **Patrick DSchloss.et Jo Handelsman.** Biotechnological prospects from metagenomics. June2003. Volume 14. Issue 3. Pages 303-310.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166903000673>
- [16]. **Francisco Rodríguez-Valera.** Environmental genomics, the big picture. Volume 231. Issue2. February2004. Pages153-158.
<https://academic.oup.com/femsle/article/231/2/153/645871>
- [17]. **Jana Pindjakova.et al.** Gut Dysbiosis and Adaptive Immune Response in Diet-induced Obesity vs. Systemic Inflammation. August2017.1157.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479914/>
- [18]. **Bas E. Dutilh.et al.** A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes 24july2014.5:4498.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111155/>
- [19]. **Sobel J.et al.** BeerDeCoded: the open beer metagenome project. 11septembre2017.6:1676.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29123645>
- [20]. **Chen L.et al.** Gene expression profiling gut microbiota in different races of humans.15march2016.6:23075.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26975620>
- [21]. **Li Jing.et al.** A metagenomic approach to dissect the genetic composition of enterotypes in Han Chinese and two Muslim groups. janvier2018.41 (1):1-12.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29129355>
- [22]. **Pranab K.Mukherjee.et al.** Bacteriome and mycobiome associations in oral tongue cancer. 14novembre2017.8 (57):97273–97289.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5722561/>

- [23]. **Eric Pasmant.et al.** Principales techniques d'analyse des anomalies génétique à l'échelle du gène. Elsevier Masson SAS2016. Vol; 118 – 131.
- [24]. **Strachan tom goodship Judith chimney Patrick.** Genetics and genomics in medicine. 1st ed. Garland Sci Publishers; 2014.
- [25]. **Kaplan JCet Delpech M.** Biologie moléculaire et médecine 3e Ed. Flammarion médecine / science. 2007.
- [26]. **C.Lacoste.a.b .et al.** Le séquençage d'ADN à haut débit en pratique clinique. 2017.24:373-383.
<https://www.em-consulte.com/article/1107813/alertePM>
- [27]. **Benoit Arveiler.et Martin Krahn.** le séquençage de nouvelle génération principe : applications en diagnostic et perspectives. Elsevier Masson SAS 2016.Vol:134-142.
- [28]. **Buermans HP.et den Dunnen JT.** Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochim biophys.1842.2014:1932-41.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092544391400180X>
- [29]. **Oliver GR.et Hart SN.et Klee EW.** Bioinformatics for clinical Next-generation sequencing.2015.61 (1):124-35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25451870/>
- [30]. **Martin Krahn.et al.** Le séquençage de nouvelle génération. appliqué au diagnostic de maladies monogéniques hétérogènes.2016.13:31-33.
https://www.cahiers-myologie.org/articles/myolog/full_html/2016/01/myolog201613p31/myolog201613p31.html
- [31]. **Bertrand Jordan.** Les retombées cliniques du séquençage de nouvelle génération.Med Sci.2014.30.589–593.
https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2014/06/medsci20143005p589/medsci20143005p589.html
- [32]. **Julien De Greef.et al.** COVID-19: infection par le virus SARS-CoV-2.
https://www.louvainmedical.be/sites/default/files/content/article/pdf/yombijc_1.pdf
- [33]. **Transmission du SARS-CoV-2.** Implications pour les précautions visant à prévenir l'infection.Document d'information scientifique (OMS).

- https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333340/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief_Sci_Brief_Transmission_modes-2020.3-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [34]. **Alireza Tahamtan.et Abdollah Ardebili..** Realtime RT-PCR in COVID19 detection. 22 Apr 2020. ISSN: 1473-7159.
<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/14737159.2020.1757437>
- [35]. **Amin Mahsouli.et al.** Imagerie thoracique du COVID-19 2020 mai-juin; 139 (05-06) : 360-367 <https://www.louvainmedical.be/sites/default/files/content/article/pdf/ghayeb.pdf>
- [36]. **Ministère de la santé.** Mise à jour du protocole de prise en charge des cas Covid 19. Août 2020.
- [37]. **Inga Wessels1.et al.** The Potential Impact of Zinc Supplementation on COVID-19 Pathogenesis 10 July 2020
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01712/full>
- [38]. **Hira Shakoore.et al.** Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19? Volume 143, January 2021, Pages 1-9
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378512220303467>
- [39]. **Covid-19 : l'analyse des génomes révélerait une origine double du virus.** 18/03/2020
<https://www.santemagazine.fr/actualites/actualites-sante/covid-19-lanalyse-des-genomes-revelerait-une-origine-double-du-virus-432862>
- [40]. **Ellen C.Carbo.et al.**Coronavirus discovery by metagenomic sequencing: a tool for pandemic preparedness. Volume 131, October 2020, 104594
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665322030336X>
- [41]. **T.Briese.et al.** Virome Capture Sequencing Enables Sensitive Viral Diagnosis and Comprehensive Virome Analysis. 2015 Sep 22; 6(5):e01491-15
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26396248/>
- [42]. **Van Tan.et al.** SARS-CoV-2 and co-infections detection in nasopharyngeal throat swabs of COVID-19 patients by metagenomics Journal of Infection. Volume 81, Issue 2, August 2020, Pages e175-e177.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445320304102>

- [43]. **Brittany Goldberg.et al.** Making the Leap from Research Laboratory to Clinic: Challenges and Opportunities for Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnostics. 1janvier2015. Volume 6 Issue 6 e01888-15.
https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=&httpsredir=1&article=2433&context=smhs_peds_facpubs.
- [44]. **Wei GU.et al.** Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. 24 Jan 2019; 14:319–338.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6345613/>.
- [45]. **Ewing S.et al.** Factors associated with unknown aetiology in patients with community-acquired pneumonia. 2002 20: 1254-1262<https://erj.ersjournals.com/content/20/5/1254.short>
- [46]. **Ruud H.Deurenberg.et al.** Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention Volume 243, 10 February 2017, Pages 16-24
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616316686?via%3Dihub>
- [47]. **C.E. Lemaoui.et al.** Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques Current approaches to fight against antibiotic resistance. Volume 19, Issue 1, March 2017, Pages 12-19
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210654517300030>
- [48]. **Sylvie Carle.** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important <https://core.ac.uk/download/pdf/228563128.pdf>
- [49]. **Julian Davies et Dorothy Davies.** Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. 2010.74(3):417–433. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937522/>.
- [50]. **Gerard D Wright .** The origins of antibiotic resistance. 2012.(211):13-30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23090593/>
- [51]. **Résistance aux antibiotiques.** 22mars2018. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques>
- [52]. **OMS.** 27 février 2017.<https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- [53]. **Enrico Lavezzo.et al.** Genomic comparative analysis and gene function prediction in infectious diseases: application to the investigation of a meningitis outbreak. 19 November 2013 554 (2013). <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-554>

- [54]. **Seydina M Diene .et Jean-Marc Rolain.** Investigation of antibiotic resistance in the genomic era of multidrug-resistant Gram-negative bacilli, especially Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. 11Mars2013. (3):277-96.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23458768/>
- [55]. **Laurent Dortet et al.** Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Janvier2017. Feuille de biologie 354.
[https://www.researchgate.net/publication/316105723_Impact_du_sequencage_d%27ADN_a_haut_debit_sur_la_surveillance_des_epidemies_de_bacteries_multi-resistantes_aux_antibiotiques.](https://www.researchgate.net/publication/316105723_Impact_du_sequencage_d%27ADN_a_haut_debit_sur_la_surveillance_des_epidemies_de_bacteries_multi-resistantes_aux_antibiotiques)

Serment

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.*

قسم أبقر اط

بسم الله الرحمان الرحيم

أقسم بالله العظيم

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

- أكرس حياتي لخدمة الإنسانية.
- وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه.
- وأن أمارس مهنتي بوازع من ضميري وشرفي جاعلا صحة مريض هدي 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 بشرفي.
- والله على ما أقول شهيد.



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس بالرباط
كلية الطب والصيدلة
الرباط



أطروحة رقم: 45

سنة : 2021

الجينوميات والميتاجينوميات: الأهمية والتطبيق في الإلتهابات البكتيرية

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : / / 2021

من طرف

السيدة غزلان تويجر

لنيل شهادة

دكتور في الطب

الكلمات الأساسية : الجينوميات؛ العدوى؛ الميتاجينوميات؛ المقاومة؛ التسلسل

أعضاء لجنة التحكيم:

رئيس	السيد ميمون زوهدي
مشرف	أستاذ في علم الأحياء الدقيقة السيد ياسين سخوخ
عضو	أستاذ في علم الأحياء الدقيقة السيد أحمد كاوي
عضو	أستاذ في طب الأطفال السيدة سعيدة طلال
عضو	أستاذة في الكيمياء الحيوية السيدة مريمة الشادلي
	أستاذة في علم الأحياء الدقيقة